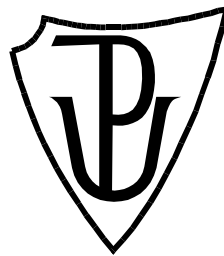


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Charakterizace α - amylasy a její imobilizace na magnetické mikročástice a nanočástice

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Zuzana Chaloupková
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Termín odevzdání:	2. 5. 2013

"Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury."

V Olomouci dne 2. 5. 2013

/vlastnoruční podpis/

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. za odborné vedení a konzultace při vypracování této diplomové práce. Děkuji také Mgr. Michaelle Pečové, Mgr. Kristýně Pospíškové a Mgr. Miroslavu Jořenkovi za pomoc při práci s imobilizací enzymů. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům katedry biochemie za ochotu a spolupráci.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Zuzana Chaloupková
Název práce	Charakterizace α -amylasy a její imobilizace na magnetické mikročástice a nanočástice
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Teoretická část této diplomové práce se zabývá vlastnostmi, přípravou a použitím magnetických mikročástic a nanočástic. Popisuje metody imobilizace enzymů na magnetické mikročástice a nanočástice a jejich uplatnění v biotechnologiích. Dále je zaměřena na klasifikaci α-amylasy a na metody jejich přípravy.</p> <p>Experimentální část se věnuje imobilizaci α-amylasy (<i>Aspergillus oryzae</i>) na magnetické mikročástice (Perloza MT 100, MT 200). Dále je zaměřena na imobilizaci amylasy na magnetické nanočástice potažené chitosanem. U volné a imobilizované α-amylasy byla stanovena vazebná kapacita, teplotní optimum, pH optimum, operační stabilita, funkční stabilita, stabilita při skladování a hodnota K_m.</p>
Klíčová slova	magnetické mikročástice, magnetické nanočástice imobilizace enzymů, α -amylasa
Počet stran	93
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Zuzana Chaloupková
Title	Charakterization of α -amylase and immobilization on magnetic microparticles and magnetic nanoparticles
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc.RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>The theoretical part of this diploma thesis deals with properties, preparation and applications of magnetic microparticles and nanoparticles. It describes immobilization enzymes to magnetic microparticles and nanoparticles and their use in biotechnology. It also describes alpha-amylase classification and their preparation methods.</p> <p>The experimental part is focused on immobilization of α-amylases (<i>Aspergillus oryzae</i>) on magnetic microparticles (Perloze MT 100, MT 200). Is also focused on immobilization of α-amylases on magnetic nanoparticles covered by chitosane. The properties (binding capacity, thermal optimum, pH optimum, operational, function stability, storage stability and K_m value) of immobilized enzyme were investigated and compared with native enzyme.</p>
Keywords	magnetic microparticles, magnetic nanoparticles, enzyme immobilization, α -amylase
Number of pages	93
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1. Úvod	10
2. Teoretická část	11
2. 1. Historie magnetických částic	11
2. 2. Magnetické mikro a nanočástice	12
2. 2. 1. Vlastnosti magnetických částic a jejich chování v magnetickém poli	14
2. 2. 2. Příprava magnetických částic.....	15
2. 3. Úprava povrchů magnetických částic	16
2. 3. 1. Sloučeniny pro úpravu povrchů magnetických částic.....	16
2. 3. 2. Způsoby úpravy povrchů magnetických částic.....	18
2. 4. Imobilizace enzymů na pevné nosiče	19
2. 4. 1. Metody imobilizace enzymů na pevné nosiče.....	21
2. 4. 1. 1. Adsorpce	22
2. 4. 1. 2. Zesítnění	22
2. 4. 1. 3. Zachycení	22
2. 4. 1. 4. Enkapsulace	23
2. 4. 1. 5. Kovalentní imobilizace	23
2. 4. 1. 6. Magnetoliposomy	24
2. 4. 2. Příklady enzymů a dalších biologicky aktivních látek imobilizovaných na magnetických částicích.....	25
2. 4. 3. Aplikace imobilizovaných látek na magnetických částicích.....	26
2. 4. 3. 1. Imobilizované proteiny na magnetických částicích.....	26
2. 4. 3. 2. Imobilizované sacharidy na magnetických částicích.....	27
2. 4. 3. 3. Imobilizované protilátky na magnetických částicích.....	27
2. 4. 3. 4. Imobilizované nukleové kyseliny a oligonukleotidy na magnetických částicích	28
2. 5. Amylasy	29
2. 5. 1. Klasifikace amylas.....	30
2. 5. 2. Organismy produkující amylasy.....	32
2. 5. 3. Charakteristika α -amylas.....	33
2. 5. 4. Látky stimulující aktivitu α -amylas (inhibitory a aktivátory).....	36
2. 5. 5. Optimalizace podmínek produkce α -amylas.....	37
2. 5. 6. Stabilizace α -amylas.....	38
2. 5. 7. Purifikace α -amylas.....	39

2. 5. 8 Modifikace α -amylas a cílená mutageneze	40
2. 6. Metody stanovení aktivity α-amylas	40
2. 6. 1 Metody amyloklastické	41
2. 6. 2 Metody sacharogenní	41
2. 6. 3 Metody chromogenní	42
2. 6. 4 Metody využívající biosenzory	43
2. 7. Imobilizace α-amylas na pevné nosiče	43
2. 8. Průmyslové aplikace α-amylasy	45
2. 8. 1. Přeměna škrobu	45
2. 8. 2. Výroba detergentů	46
2. 8. 3. Výroba paliv na bázi alkoholu	46
2. 8. 4. Papírenský a textilní průmysl	47
2. 8. 5. Potravinářský průmysl	47
3. Experimentální část	49
3. 1. Chemikálie	49
3. 2. Přístroje	50
3. 3 Použité metody	51
3. 3. 1 Obalení magnetických nanočástic chitosanem	51
3. 3. 2 Imobilizace α -amylasy na magnetické mikročástice	51
3. 3. 3. Imobilizace α -amylasy na magnetické nanočástice	52
3. 3. 4. Stanovení aktivity volné a imobilizované α -amylasy	52
3. 3. 5. Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové	53
3. 3. 6. Stanovení vazebné kapacity	53
3. 3. 7. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na pH v univerzálním Britton-Robinsonově pufru	54
3. 3. 8. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na pH v K-P _i pufru	54
3. 3. 9. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na teplotě inkubace	55
3. 3. 10. Stanovení operační stability imobilizované α -amylasy	55
3. 3. 11. Stanovení stability volné a imobilizované α -amylasy při skladování	55
3. 3. 12. Stanovení funkční stability α -amylasy	56
3. 3. 13. Stanovení Michaelisovy konstanty (K _m)	56
4. Výsledky	58
4. 1 Imobilizace α -amylasy na magnetické mikročástice	58
4. 2. Stanovení vazebné kapacity	59

4. 3. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na pH v univerzálním Britton-Robins. pufru	59
4. 4. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na pH v K-P _i pufru	62
4. 5. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na teplotě inkubace	64
4. 6. Stanovení operační stability imobilizované α -amylasy	66
4. 7. Stanovení stability volné a imobilizované α -amylasy při skladování ..	68
4. 8. Stanovení funkční stability α -amylasy	70
4. 9. Stanovení Michaelisovy konstanty (K_m)	70
5. Diskuze	74
6. Závěr	78
7. Použitá literatura	80
8. Seznam použitých zkratk	93

Cíle práce

Teoretická část:

- Provést literární rešerši o magnetických mikro a nanočásticích (příprava, povrchová úprava, použití v praxi) a imobilizačních technikách.
- Dále provést literární rešerši na téma α -amylasa z *Aspergillus oryzae* (struktura a vlastnosti, metody stanovení aktivity, aktivátory a inhibitory, chemická modifikace) a použití α -amylasy v průmyslu.

Experimentální část

- Imobilizace α -amylasy (*Aspergillus oryzae*) na magnetické mikročástice (MT 100, MT 200) a nanočástice obalené chitosanem.
- Stanovení K_m volné a imobilizované α -amylasy (zhodnocení afinity imobilizovaného enzymu v porovnání s volným enzymem).
- Charakterizace imobilizované α -amylasy na magnetických mikročásticích (MT 100, MT 200) a na nanočásticích, srovnání s volnou α -amylasou (stanovení vazebné kapacity, operační stability, pH stability, teplotní stability, stability při skladování, funkční stability, hodnota K_m).

1. Úvod

Magnetické mikro a nanočástice jsou používány a studovány v mnoha oblastech biotechnologie, v medicíně a v přírodních vědách. Jako nanočástice označujeme částice, které jsou větší jak 1 nm a menší jak 1000 nm, mikročástice mají rozměry 1–1000 μm . Na povrch těchto magnetických částic je možné imobilizovat různé biologické molekuly. Magnetické částice jsou připravovány ve většině případů synteticky. Jsou tvořeny magnetickým jádrem (nejčastěji oxidy železa) a funkcionalizační slupkou stabilizující částici a umožňující zavedení funkčních skupin na její povrch, na který lze poté imobilizovat cílovou molekulu.

Často používané jsou i mikrobiální enzymy, rekombinantní technologie mikroorganismů umožňuje připravit enzym požadovaných vlastností. Důležitou třídou enzymů jsou hydrolasy, mezi které patří i α -amylasa (EC 3.2.1.1.) katalyzující štěpení 1,4- α -D-glykosidické vazby uvnitř polysacharidového řetězce amylosy, amylopektinu i glykogenu. Amylasy jsou poměrně rozšířené. Byly nalezeny u savců, mikroorganismů ale i v semenech rostlin. α -Amylasy produkované mikroorganismy jsou používány v papírenském a textilním průmyslu. α -Amylasy produkované plísněmi jsou hojně využívány v potravinářství (pekařství, výroba fruktosových sirupů, pekařství).

V průmyslu jsou používány α -amylasy často vystaveny extrémním podmínkám, např. vysoké nebo nízké hodnoty pH, zvýšená teplota a tlak, oxidační činidla. Pro zvýšení stability se používá chemická modifikace nebo imobilizace, kdy adsorpce a kovalentní navázání jsou nejčastějšími způsoby imobilizace.

2. Teoretická část

2. 1. Historie magnetických částic

První zmínky o magnetických částicích pocházejí ze 4. - 5. století př. n. l. z Egypta a Číny. Tehdy bylo objeveno rozpustné zlato, které bylo používáno v mnoha oblastech (Řezanka et al., 2007). Pro estetické účely se používalo při výrobě rubínového skla a barvení keramiky. Využití mělo také v lékařství při léčbě srdečních problémů, úplavice, epilepsie a nádorů.

Známé jsou „Lykurgovy poháry“ (Obr.1) pocházející asi ze 4. století našeho letopočtu, jejichž část se nachází v Britském muzeu v Londýně (Řezanka et al., 2007). Obsahují nanočástice slitiny na bázi Au - Ag v poměru 3:7. Není známo jakou technologii výroby těchto pohárů a podobných artefaktů římská sklářská používali.



Obr.1: Lykurgovy poháry. Převzato z internetových stránek <http://www.british-museum.ac.uk>.

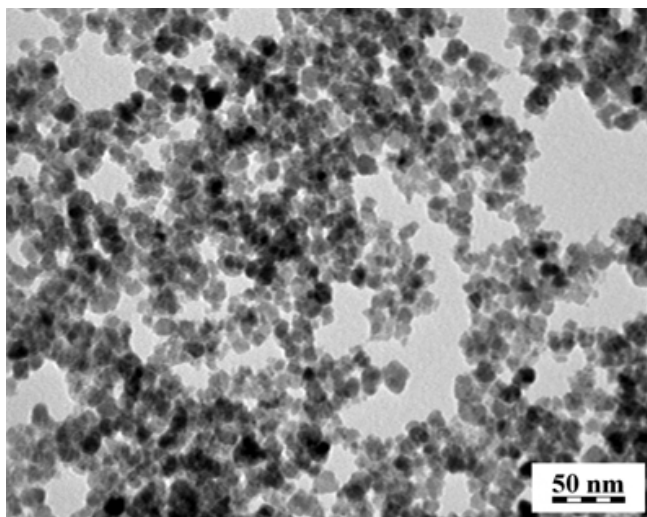
Dalším příkladem je lesklá glazovaná keramika z 13. - 16. století. Zjistilo se, že lesk vyvolává dekorativní kovový film o tloušťce 200 - 500 nm, obsahující stříbrné sférické nanokrystaly. Keramika z italské Umbrie byla v 15. a 16. století pro své nádherné barvy vysoce ceněna po celé Evropě (Řezanka et al., 2007). Tým vědců z univerzity v Perugii vedený Brunem Brunettim zjistil, že glazury renesanční keramiky obsahují částice mědi a stříbra o průměru 5 - 100 nm.

V roce 1857 Faraday získal koloidní zlato redukcí vodného roztoku tetrachlorozlatitanu. V roce 1861 jako první popsal suspenzi obsahující částice o rozměrech 1 - 100 nm Thomas Graham, britský chemik a nazval ji koloidním systémem (Řezanka et al., 2007).

Koncem 20. století už uměli vědci manipulovat s atomy, molekulami a klastry na površích. Miniaturizace struktur konvenční a elektronovou litografií dosahuje teoretického limitu kolem 50 nm. Pro další miniaturizaci musely být vyvinuty alternativní metody.

2. 2. Magnetické mikro a nanočástice

Definice nanočástic není jednotná a pojem zahrnuje několik strukturou rozdílných typů částic. Nanočástice jsou všechny částice větší než 1 nm a menší než 1000 nm (1 μm) (Obr. 2); mikročástice se nacházejí pak v rozmezí 1–1000 μm .

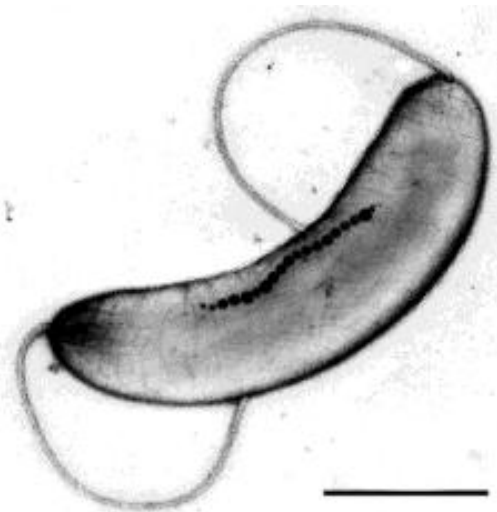


Obr. 2: TEM snímek magnetických nanočástic železa. Převzato z ÚMCH AV ČR

Magnetické nanočástice lze rozdělit na magnetické kapaliny nazývané „ferrofluids“, biogenní magnetické nanočástice a biokompatibilní magnetické nanočástice. Magnetické kapaliny jsou suspenze velmi jemných magnetických částic o průměru 2-20 nm ve vhodné nemagnetické nosné kapalině. Tyto částice bývají označovány jako superparamagnetické. Jsou přitahovány magnetickým polem, ale neudrží zbytkový magnetismus po jejich odstranění z magnetického pole (Šafařík & Šafaříková, 2002).

První zmínky o biogenních magnetických nanočásticích pochází z roku 1975, kdy Blakemore objevil magnetotaktickou bakterii. Magnetotaktická bakterie

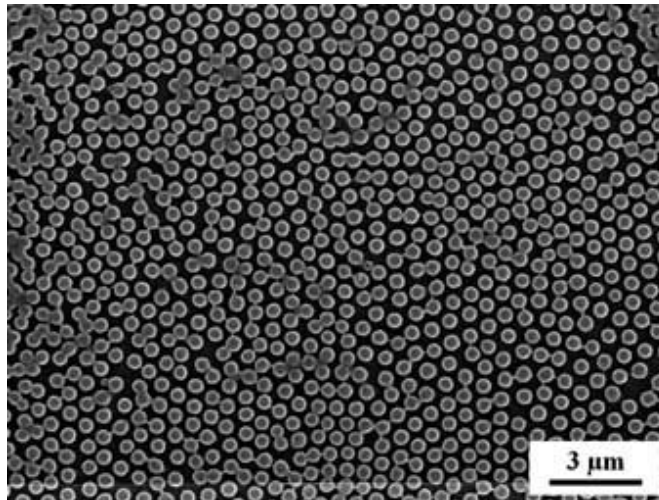
Magnetospirillum magnetotacticum (Obr.3) patří do heterogenní skupiny gramnegativních prokaryot s morfologickou rozmanitostí. Má schopnost syntetizovat ve svých buňkách krystalky magnetitu (Fe_3O_4) o velikosti 50-100 nm a využívá je pro orientaci v magnetických polích. Každý krystalek magnetitu má tato bakterie zabalený do membrány a tvoří tak organelu označovanou jako magnetosom. Bakterie z krystalů vytváří řetízky, které fungují podobně jako střílka kompasu (Blakemore, 1975).



Obr.3: *Magnetospirillum magnetotacticum* - délka úsečky je jeden mikrometr. Převzato z The internet encyclopedia of science.

Biokompatibilní magnetické nanočástice používané především v bioanalytických medicínských stanoveních lze rozdělit do několika strukturních typů. Dělí se na kvantové tečky, dendrimery, kovové a polovodičové nanočástice a magnetické nanočástice. Kvantové tečky jsou monodisperzní anorganické nanokrystalové částice z polovodičového materiálu o velikosti povrchu 2-10 nm² (Parak W. J et al., 2002). Dendrimery jsou vysokomolekulární až makromolekulární struktury skládající se z mnoha větví zvaných dendrony, které jsou pravidelně umístěny kolem centrálního jádra (Stirib S. E. et al., 2002). Kovové a polovodičové nanočástice mají vynikající optické a polovodičové vlastnosti (Katz & Willner, 2004).

Velikost mikročástic se pohybuje v rozmezí 1–1000 μm (Obr.4). K výrobě nosičů jsou používány nejrůznější materiály, nejčastěji oxidy železa – $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a Fe_3O_4 (Li et al., 2007), CrO_2 , čisté kovy – Co, Ni, Fe a jejich slitiny nebo ferity - NiFe_2O_4 , MnFe_2O_4 a CoFe_2O_4 (Wang et al., 2008).



Obr.4: Magnetické mikročástice. Převzato z Macková et al., 2006.

Různé typy magnetických mikro a nanočástic se používají ve velkém množství v odvětvích jako jsou biotechnologie, biologické a chemické vědy (Šafařík & Šafaříková, 1997). Magnetické mikročástice byly používány dříve než nanočástice. Mají stejné užití jako nanočástice, ale jejich nevýhodou je menší povrch ve srovnání s nanočásticemi, proto se dnes pro řadu aplikací místo mikročástic volí nanočástice (Šafařík & Šafaříková, 2002).

2. 2. 1. Vlastnosti magnetických částic a jejich chování v magnetickém poli

Povrch magnetických částic je možné modifikovat různými materiály, které dovolují navázat biologicky aktivní látku a mohou být zároveň biokompatibilní. Vzniklé magnetické jádro se následně stabilizuje obalením syntetickými či přírodními polymery, popř. jinými látkami. V porovnání s objemovými nosiči mají magnetické částice velký povrch a tím lepší vazebnou kapacitu pro biomolekuly jako jsou různé proteiny (enzymy, protilátky), nukleové kyseliny nebo oligonukleotidy. Nejvýznamnější vlastností magnetických částic je schopnost manipulace v magnetickém poli. (Šafařík & Šafaříková, 2009).

Chování magnetických částic v magnetickém poli závisí zejména na velikosti těchto částic. Výzkumy bylo zjištěno, že změny magnetických vlastností částic se uskutečňují v souvislosti se změnou velikosti částic z rozsahu mikrometrů na nanometry. Částice vykazují superparamagnetické chování při dostatečně malých velikostech v rozmezí od 6 do 15 nm, zatímco feromagnetické chování můžeme pozorovat u částic, které mají velikost v rozsahu mikrometrů (Bean et al., 1959).

2. 2. 2. Příprava magnetických částic

Magnetické částice mohou být připraveny různými metodami a lze tak dosáhnout požadovaných velikostí a tvarů a tím i požadovaných chemických a fyzikálních vlastností. Proto při přípravě magnetických částic musíme zvážit jaká bude jejich další aplikace (Shenhar et al., 2005). K metodám umožňujícím přístup k těmto informacím patří především metody elektronové mikroskopie a metody studia povrchů pomocí skenovací elektronové mikroskopie- SEM. Tímto způsobem je možné studovat i kvalitu a charakter obalové vrstvy.

Pro přípravu magnetických částic se používají metody koprecipitace, chemická metoda, polymerační metoda, in situ metoda a metoda zakotvení. Koprecipitace je syntetická metoda založena na srážení částic z vodného roztoku obsahující železnaté a železité soli, kdy je srážení indukováno smícháním roztoku ze zásadou (Guo et al., 2010). Dále je využívána chemická metoda, která je založena na nukleaci a růstu tuhé fáze. Tento proces je nejčastěji vyvolán chemickou redukcí solí kovů. Redukce solí přechodných kovů v roztoku je nejvíce rozšířená metoda pro přípravu koloidních suspenzí kovů a je velmi jednoduše proveditelná. Umožňuje, aby byly v gramových množstvích připraveny koloidní magnetické částice požadované velikosti s malou odchylkou. Za tímto účelem je používán široký rozsah redukčních činidel. Nejčastěji se jedná o hydridy a soli (Yonezawa et al., 2000). Ke kontrole růstu magnetických částic a k jejich ochraně před agregací je používáno velké množství stabilizátorů, kterými jsou donorové ligandy nebo polymery. První reprodukovatelný standardní návod pro přípravu koloidů kovů publikoval Turkevitch (Turkevitch et al., 1951), který také navrhl mechanismus pro tvorbu nanočástic založený na nukleaci, růstu a agregaci a který je stále platný.

Kromě přípravy magnetických mikro a nanočástic kovů lze získat i částice jejich oxidů, sulfidů a selenidů. Jejich využití ale není tak široké jako u částic kovů. Syntéza je většinou prováděna ve vodných roztocích, ve kterých se jako redukční činidlo používá hydrazin nebo hydroxylamin (Cushing et al., 2004). Polymerní magnetické mikro a nanočástice se většinou získávají řízenou polymerací ve vodě působením peroxidu vodíku, tepla nebo ultrazvuku. Lze takto připravit kopolymery alginát sodný- chitosan a anthracen-polyakrylamid (Wang et al., 2005).

Magnetické částice připravené metodou in situ jsou tuhé nebo porézní, obsahující množství funkčních skupin zahrnujících $-NH_2$, $-NO_2$, $-COOH$ a $-OH$. Částice jsou získány bobtnáním v roztoku soli kovu a následnou interakcí mezi funkční skupinou a ionty kovu. Tuto metodu zavedl Ugelstand et al. a získal tak magnetické

mikročástečky připravené metodou in situ, které se dnes prodávají komerčně pod názvem Dynabeads a jsou používány v mikrobiologii, molekulární biologii a imunologii (Ugelstand et al., 1998).

Při metodě zakotvení jsou používány magnetické částice v polymerním roztoku. Nejprve je směs mechanicky míchána, poté je rozptýlena ultrazvukem. Dalšími procesy jsou koagulace, usazování a odpařování. Metoda zakotvení umožňuje poměrně jednoduché získání magnetických částic, avšak výsledné magnetické částice vykazují nepravidelný tvar a přítomnost nečistot (Xia et al., 2011).

2. 3. Úprava povrchů magnetických částic

Vzniklé magnetické částice lze použít přímo, ale pro většinu biologických aplikací se provádí úprava jejich povrchu (Řezanka et al., 2007). Úprava povrchu částic zabrání jejich shlukování a vnesení funkčních skupin. Povrch částice se potahuje polymerní vrstvou, která umožňuje navázání určité látky. Pro navázání této látky musí být splněny podmínky biokompatibility a biodegradace v případě aplikace těchto látek do živého organismu. Vhodně zvolený povrch pak umožní kovalentní vazbu dalších látek v závislosti na tom, jaké funkční skupiny upravený povrch částic nese (Rabišková, 2008).

2. 3. 1. Sloučeniny pro úpravu povrchů magnetických částic

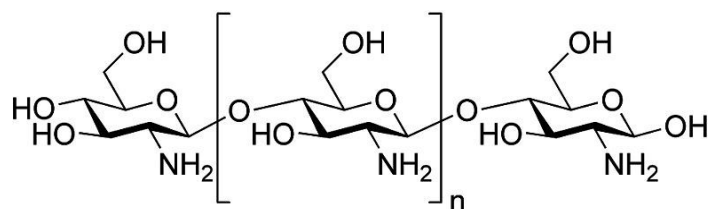
Sloučeniny pro úpravu povrchů jsou látky vnášející aktivní funkční skupiny na povrch magnetických částic, které umožňují navázání požadované látky. Sloučeniny k úpravě povrchu magnetických mikro a nanočástic mohou být organické, anorganické a polymerní (Tab. 1_a, 1_b). Mezi organické sloučeniny patří například kyselina alkansulfonová, kyselina alkanfosfonová, kyselina olejová a kyselina stearová (Gupta, 2005). Nejčastěji používanými anorganickými látkami jsou zlato (Chen et al., 2003), křemík a gadolinium (Gupta, 2005).

Polymerní sloučeniny se dělí na syntetické a přírodní. Mezi syntetické polymerní látky náleží například poly(vinylpyrrolidon) – PVP (D'Souza et al., 2004), poly(ethylen glykol) – PEG (Zhang et al., 2002), poly(vinylalkohol) – PVA (Shan et al., 2003) a fosforylcholin (Denizot et al., 1999). Navzdory jejich širokému používání, vykazují některé nevýhody související s jejich hydrofóbností. Proto se začal používat

hydrofilní materiál (hydrogel) poly-2- hydroxyethylmetakrylát (PHEMA), který je také biokompatibilní, což je důležité v oblasti medicíny.

Příkladem přírodních polymerních činidel jsou dextran (Berry et al., 2003), alginát a želatina (Olsen et al., 2003). Významným přírodním materiálem pro funkcionalizaci magnetických částic je polyaminosacharid odvozený od chitinu – chitosan - (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-Dglukan (Obr. 5). Chitosan je znám svými unikátními vlastnostmi jako biologická rozložitelnost na neškodné produkty, netoxicitu, fyziologická inertnost, antibakteriální vlastnosti a nízká cena (Krajewska, 2004).

Jinými činidly používanými pro zvětšení rozpustnosti ve vodném médiu jsou oleát sodný, dodecylamin a karboxymethylcelulosa (Dresco et al., 1999). Pro úpravu povrchu jemných nanočástic se používá silikagel nebo porézní sklo (Šafařík & Šafaříková, 1995).



Obr. 5: Struktura chitosanu.

Tab.1_a: Přehled organických, anorganických a polymerních látek používaných k povrchové modifikaci magnetických částic.

Činidla	Obalový materiál	Výhody	Zdroje
organické látky	kyselina alkansulfonová		
	kyselina alkanfosfonová	stabilizují koloidní roztoky	Gupta, 2005
	kyselina olejová		
	kyselina stearová		
anorganické látky	zlato		Chen et al., 2003
	křemík	zamezují koagulaci částic	Gupta, 2005
	gadolinium		
polymery- syntetické	PEG	nekovalentní imobilizace PEG na povrch částice zvyšuje biokompatibilitu	Zhang et al., 2002
	PVP	stabilizuje koloidní roztoky	D'Souza et al., 2004
	PVA	zamezuje koagulaci částic	Shan et al., 2003
	fosforylcholin	stabilizuje koloidní roztoky	Denizot et al., 1999

Tab.1_b: Přehled organických, anorganických a polymerních látek používaných k povrchové modifikaci magnetických částic.

polymery- přírodní	dextran	stabilizuje koloidní roztoky přírodní kation aktivní lineární polymer, biokompatibilní, hojně využívaný v zemědělství, medicíně, textilním průmyslu a ošetření vody	Berry et al., 2003
	chitosan	využívaný v zemědělství, medicíně, textilním průmyslu a ošetření vody	Krajewska, 2004
	želatina	krystalizující činidlo, emulgátor, biokompatibilní	Olsen et al., 2003

2. 3. 2. Způsoby úpravy povrchů magnetických částic

Úprava povrchů se v laboratoři provádí několika způsoby. Často používaným způsobem je povrchová úprava magnetického materiálu silanizací. Na povrch magnetického materiálu vneseme potřebnou funkční skupinu. Silanizace je možné provést třemi způsoby (Šafařík & Šafaříková, 1995). Při silanizaci v organickém rozpouštědle se magnetický materiál vnese do roztoku silanizačního činidla rozpuštěného v toulenu. Při odpařovacím postupu se magnetický materiál suspenduje v roztoku silanizačního činidla v acetonu, rozpouštědlo je poté na rotační odparce odstraněno. Posledním způsobem je silanizace ve vodném prostředí, která se provádí ve vodném roztoku silanizačního činidla. Suspenze je zahřívána za specifických podmínek a po promytí vodou je magnetický materiál připraven k dalšímu použití (Šafařík & Šafaříková, 1995).

Další možností je úprava nepolárními organickými činidly. Byla popsána řada metod zabývajících se tímto tématem. Gedanken se zabýval adsorpcí kyseliny alkansulfonové a kyseliny alkanfosfonové na povrch amfotermních Fe_2O_3 nanočástic. Tyto činidla slouží ke stabilizaci koloidní disperze. Sahoo se zabýval úpravou povrchů magnetických částic pomocí kyseliny olejové, dodecylfosfonové, hexadecylfosfonové a dihexadecylfosfonové. Účelem byla stabilizace částic v organickém rozpouštědle (Gedanken et al., 1999).

Při úpravě povrchů magnetických částic anorganickými činidly se na povrch částice nanese vnější kovový obal. Obal může být tvořen výše zmíněnými kovy jako jsou zlato, gadolinium nebo křemík. Tato úprava poskytuje částicím nejen zvýšenou stabilitu, ale také pomáhá při vazbě různých biologických ligandů na povrch částic.

Nejčastěji se pro úpravu povrchu používá zlato a křemík. Částice, které mají povrch upravený křemíkem jsou nejen stabilní, ale poskytují kovalentní vazby se specifickými ligandy. Navíc takto upravený povrch je velmi stabilní i ve vysokých objemech a při změnách pH (Mulvaney et al., 2000).

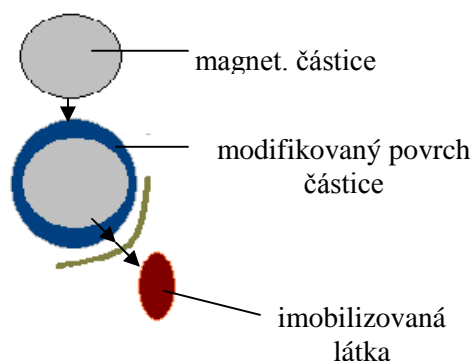
Úprava pomocí polymerů má uplatnění v různých oblastech. Srážení částic v polymerní matici vytváří ochranu před koagulací (Berry et al., 2003). Ungelstadova metoda používá přímé srážení se solemi železa uvnitř pórovitého polystyrenu. Částice získají větší velikost, která je v rozmezí 2,8 až 4,5 μm , a jsou vhodné pro magnetické separace (Ugelstad et al., 1993). Dalším způsobem úpravy povrchů částic je založeno na jednoduchém postupu spočívajícím na smíchání polymerů s magnetickými částicemi (Šafařík & Šafaříková, 1993).

V poslední době jsou dostupné i komerčně připravené vhodné povrchově modifikované magnetické částice. Mezi největší firmy vyrábějící magnetické nosiče patří Invitrogen (mikročástice Dynabeads), Advanced Magnetics (USA) či Miltenyi Biotec (Německo); v České republice je výrobcem celulosových magnetických nosičů firma Iontosorb (Ústí nad Labem). Pro běžné laboratorní účely je ovšem cena většiny těchto produktů vysoká.

2. 4. Imobilizace enzymů na pevné nosiče

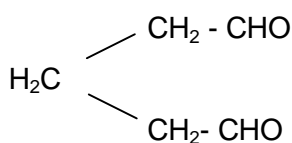
První zmínky o imobilizaci enzymů na pevné nosiče byly zveřejněny už na počátku minulého století, kdy se začalo uvažovat o opětovném použití drahých enzymů. V roce 1916 Nelson a Griffin imobilizovali invertasu na pevný povrch (aktivní uhlí, hydroxid hlinitý), ale takto imobilizovaný enzym se ukázal jako velmi nestabilní (Buchholz et al., 2005). V roce 1971 proběhla první konference enzymového inženýrství kde byl zaveden termín imobilizované enzymy (Katchalski et al, 2000).

Povrchovou úpravou magnetického materiálu se vnese na povrch magnetického materiálu potřebná funkční skupina, která je nezbytná pro následnou imobilizaci cílových látek na magnetické částice (Obr.6). Pokud je příslušná funkční skupina reaktivní, například epoxyskupina, může se přímo na nosič imobilizovat biologicky aktivní látka nebo afinitní ligand. V případě, že na nosiči jsou přítomny jiné, nereaktivní skupiny, jako amino-, sulfohydryl-, karboxy- skupina, je před vlastní imobilizací nutná jejich aktivace (Weetall & Lee, 1989).

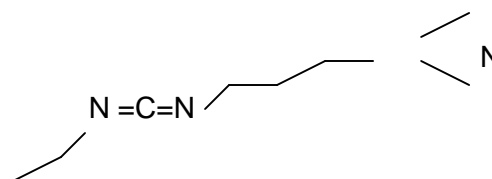


Obr.6: Schéma imobilizace látek na magnetické částice.

Pro aktivaci se používá například disukcinimidylsuberát, glutaraldehyd (Obr.7) a EDC – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid (Obr.8) (Šafařík & Šafaříková, 1995).



Obr. 7: Glutaraldehyd

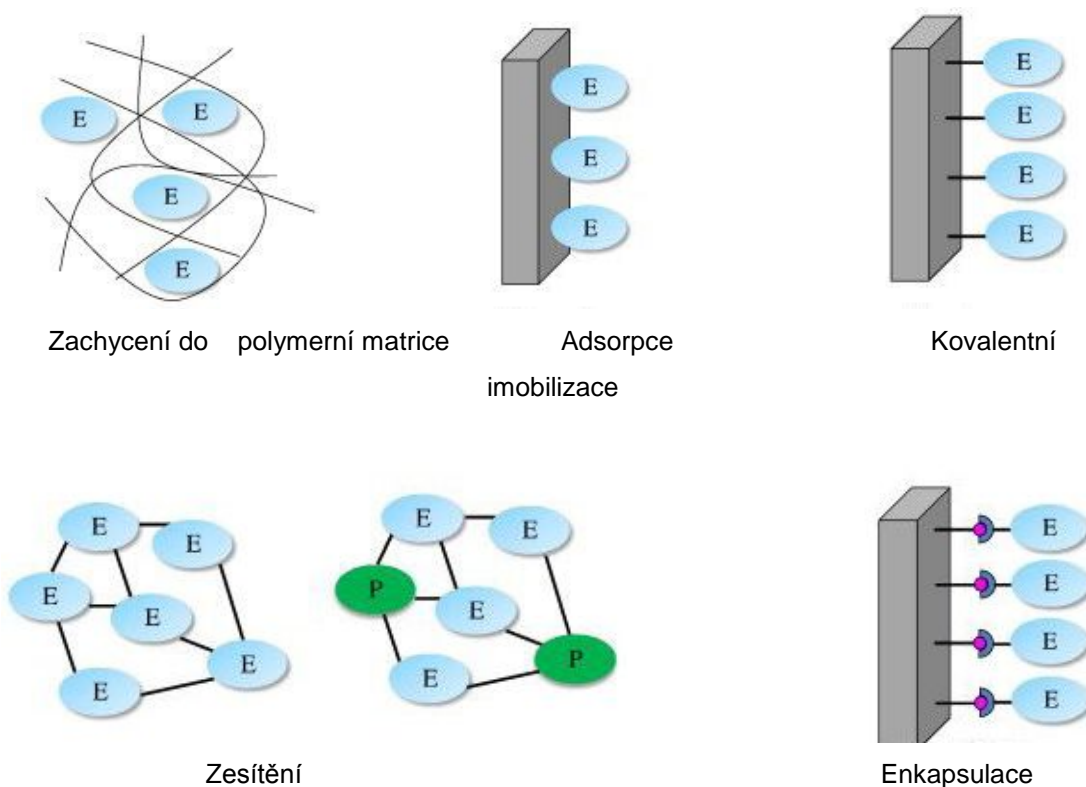


Obr. 8: EDC

Imobilizované enzymy vykazují v porovnání s volnými lepší teplotní i pH stabilitu a termostabilitu. Hlavní výhodou je však možnost opakovaného použití a tím snížení finančních nákladů (Liu et al., 2005). I přes výhody, které sebou imobilizace přináší, je nutné zvážit i některá negativa, jenž jsou s těmito technikami spojena. Při imobilizaci obvykle dochází ke snížení afinity enzymu k substrátu (hodnota K_m je vyšší) a částečné ztrátě katalytické aktivity. Náklady na přípravu ukotveného enzymu mohou být v některých případech dosti vysoké a samotná imobilizace tak ztrácí na efektivitě (Lei et al., 2007).

2. 4. 1. Metody imobilizace enzymů na pevné nosiče

Výhody imobilizovaných enzymů byly již zmíněny dříve. Imobilizace enzymů je založena na omezení volnosti pohybu enzymů, při níž se rozhoduje o materiálu matrice a o metodě imobilizace. Navázání enzymů na nerozpustné nosiče se velmi často provádí přímou adsorpcí či kovalentní vazbou. Při použití bifunkčních, popř. vícefunkčních činidel dochází k zesítnění jednotlivých molekul enzymu. K dalším používaným technikám patří zabudování enzymu do struktury vhodné polymerní matrice nebo jeho uzavření do semipermeabilní polymerní membrány (Sassolas et al., 2012) (Obr. 9).



Obr. 9: Přehled technik používaných k imobilizaci enzymů. Zachycení do polymerní matrice, adsorpce, kovalentní imobilizace, zesítnění, enkapsulace. Převzato z Sassolas et al., 2012.

2. 4. 1. 1. Adsorpce

Imobilizace adsorpcí je nejjednodušší a ekonomicky nejvýhodnější metoda, při níž molekuly s nosičem interagují pomocí iontových, hydrofobních, vodíkových či van der Waalsových interakcí. Pouze první dvě zmiňované přispívají k silnější vazbě enzym – nosič. Metoda adsorpce je založena na smíchání biologické látky s nosičem, na který se má daná látka adsorbovat. Důležité pro správnou adsorpci je použití optimálních reakčních podmínek (pH, teplota, iontová síla aj.). Poté probíhá inkubace a následně je materiál promyt pro zbavení nenavázaných komponent. Výhodou adsorpce je reversibilita, díky níž je umožněno nejen čištění proteinů, ale i znovupoužití nosičů. Nevýhody této metody zahrnují postupnou ztrátu enzymu a nespecifickou vazbu (Mateo *et al.*, 2000).

2. 4. 1. 2. Zesíťení

Při imobilizaci metodou zesíťení není potřeba použít matrici. Enzymy se spojují navzájem do velké třídímenzionální struktury, což je umožněno různými chemickými a fyzikálními metodami. Chemická metoda využívá celou řadu funkčních činidel (glutaraldehyd, bisdiazobenzidin), které vytváří chemické vazby mezi molekulami proteinu a vzniká tak nerozpustná síť (Eldin *et al.*, 2000). Fyzikální metodou může být flokulace, kdy jsou jako činidla používány polyaminy, polyethyleniminy, sulfonáty polystyrenu a různé fosfáty (Bickerstaff, 1997).

2. 4. 1. 3. Zachycení

Imobilizace zachycením je založena na volnosti molekuly enzymu v roztoku jehož pohyb je omezen pouze mřížkou gelu. Velikost pórů v gelu je kontrolována, aby se zabránilo ztrátě enzymu z gelu, ale zároveň musí být umožněn přístup substrátu k enzymu a eliminace produktu ven z gelu. Nejčastěji jsou používány polypeptidy (želatina, kolagen, kasein), polysacharidy (karragenan, alginát, agarosa) a syntetické polymery (polyakrylamid, polyvinylalkohol). Jsou známy dva způsoby zachycení, v prvním dochází k smíchání enzymu s polymerem a následnému zesíťování. Druhý je založen na smíchání enzymu s monomery a následné polymerizaci a zesíťování. V obou případech je enzym zachycen v mřížce (Bickerstaff, 1997). Úpravou podmínek při

polymerizaci lze změnit strukturu sítě, velikost částic a pórovitost polymeru. Pórovitost lze také změnit způsobem sušení, povrchovým napětím rozpouštědla nebo polymerovým složením gelu (Brady et al., 2009).

2. 4. 1. 4 . Enkapsulace

Enkapsulace enzymů může být dosaženo obalením enzymu semipermeabilní membránou. Enkapsulace je jednoduchá, pokud je enzym v roztoku volný. Velké proteiny nebo enzymy nemohou projít dovnitř nebo ven z kapsule, ale malé substráty nebo produkty mohou volně procházet přes semipermeabilní membránu. Jsou používány většinou mikrokapsule od 10 do 100 μm v průměru (nylon, nitrocelulosa) (Bickerstaff, 1997). Komerčně dostupná dutá vlákna a ultrafiltrační membrány jsou odolné vůči chemickým a mechanickým vlivům, proto jsou vhodné k dlouhodobému používání (Monshipouri *et al.*, 1992). Vzhledem k tomu, že nedochází k žádným chemickým interakcím s polymerem, je metoda vhodná pro imobilizaci citlivějších proteinů. K výhodám patří i možnost imobilizace více enzymů najednou (Chang *et al.*, 1996).

2. 4. 1. 5. Kovalentní imobilizace

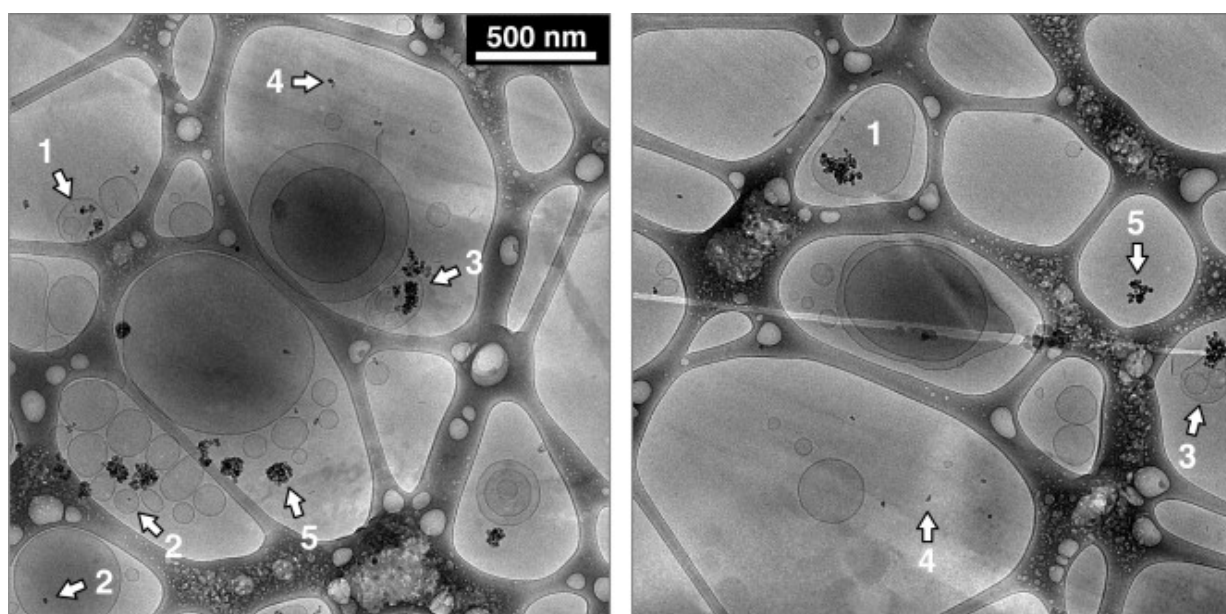
Principem kovalentní imobilizace je chemická reakce funkčních skupin příslušného nosiče a proteinu poskytující pevnou vazbu mezi enzymem a nosičem, a tím dochází ke snížení rizika jeho uvolňování (Cao et al., 2005). Vazby jsou převážně vytvářeny mezi funkčními skupinami nosiče a amino nebo karboxy skupinami, které poskytuje enzym. Využívá se amino skupina z argininu nebo lysinu, karboxylová skupina asparagové nebo glutamové kyseliny, hydroxylová skupina serinu nebo threoninu a thio skupina cysteinu (Bickerstaff, 1997). Před vlastní imobilizací je obvykle nutné funkční skupiny nosiče aktivovat pomocí vhodně zvoleného činidla. Aktivace nosiče nesoucího hydroxyskupinu je prováděna za pomoci epichlorhydrinu. V případě, že nosič obsahuje více hydroxylových skupin se k aktivaci používá bromkyan. Pokud nosič obsahuje karboxylové skupiny provádí se aktivace karbodiimidem (Akkaya et al., 2009).

V případě nosičů nesoucích aminoskupinu je nejčastějším činidlem používaným k aktivaci poměrně levný a běžně dostupný glutaraldehyd. Vlastní aktivace spočívá v tvorbě nestabilní Schiffovy báze mezi aminoskupinou nosiče a aldehydovou skupinou

glutaraldehydu. Druhá aldehydová skupina zůstává volná a lze ji tedy využít pro stejnou reakci s aminoskupinou proteinu. Zpravidla následuje redukce Schiffovy báze pomocí kyanoborohydridu sodného, kdy je jednoduchá vazba stabilnější (Mateo et al., 2007).

2. 4. 1. 6. Magnetoliposomy

Další možností pro imobilizaci biologicky aktivních látek je použití magnetoliposomů (Obr. 10), které mohou být využity zejména pro imobilizaci membránově vázaných enzymů (hovězí cytochrom c oxidasa), kdy se aktivita a stabilita tohoto enzymu po imobilizaci na magnetoliposomy výrazně zvýšila ve srovnání s volným enzymem (De Cuyper et al., 1996).



Obr. 10: Magnetoliposomy. Převzato z Geoffrey et al., 2011. TEM mikroskopie. Magnetoliposomy obsahující zapouzdřené magnetické částice jsou znázorněny pod číslem 1. Pod číslem 2 jsou zobrazeny volné magnetické částice. Číslo 3 znázorňuje natržené magnetoliposomy s vypuštěnými magnetickými částicemi. Pod číslem 4 jsou znázorněny nezapouzdřené magnetické částice a pod číslem 5 shluky částic.

2.4.2. Příklady enzymů a dalších biologicky aktivních látek imobilizovaných na magnetických částicích

Na magnetické částice již byla imobilizována řada látek. Jsou to enzymy, protilátky, DNA, RNA a další. Přehled látek, které byly imobilizovány, jejich zdroje a afinitní ligandy, shrnují tabulky 2, 3, a 4.

Tab.2: Příklady imobilizovaných enzymů na magnetických částicích

Enzym	Zdroj	Nosič	Reference
aminopeptidasa	<i>Arabidopsis</i>	N-1-naftylftalaminová kys.	Tillotson et al., 2001
kaspasa	lidské buňky	agarosa	Yaacob et al., 1994
trypsin	prasečí slinivka	chitosan	Massia et al., 2000
urokinasa	surový přípravek urokinasy	dextran, agarosa, PVA	Vladimír et al., 1999
α -amylasa	prasečí slinivka	alginát	Panyam et al., 2003
lysozym	slepičí bílek	PVA	Šafařík et al., 2001
glukoamylasa	<i>Aspergillus niger</i>	alginát	Ziolo et al., 1992

Tab.3: Příklady imobilizovaných protilátek na magnetických částicích.

Protilátka	Zdroj	Nosič	Reference
polyklonální protilátky	králičí sérum	Dynabeads M-280	Rosensweig et al., 1969
monoklonální protilátky	myší kultura	magnetit	Tadmor et al., 2000
IgG	krevní sérum	karboxyl	Portet et al., 2001

Tab.4: Imobilizace DNA/RNA, albuminu a hemoglobinu na magnetických částicích.

Protein	Zdroj	Nosič	Reference
DNA	tkáň, <i>E.coli</i>	celulosa	Sauzedde et al., 1999
RNA	<i>S. cerevisiae</i>	streptavidin	Jiles, 1991
albumin, hovězí sérum	komerční preparát	PVA, PEG	Khalafalla et al., 1980
hemoglobin	komerční preparát	amin	Lawrence et al., 1992

2. 4. 3. Aplikace imobilizovaných látek na magnetických částicích

Látky imobilizované na magnetické částice byly využity v řadě oborů. Imobilizované biologicky aktivní látky nacházejí uplatnění zejména při analýze proteinů, při purifikaci látek a v biotechnologických procesech.

2. 4 .3 .1. Imobilizované proteiny na magnetických částicích

Při *in vitro* aplikacích, se často proteiny zakotvují na pevné nosiče pro dosažení jejich optimálních vlastností. Díky tomu lze z proteiny manipulovat v magnetickém poli a následně použítý komplex separovat ve vhodném magnetickém separátoru.

V biotechnologických procesech nachází uplatnění zejména proteasy a lipasy. Proteasy štěpí peptidovou vazbu v proteinech a byly imobilizovány na mnoho druhů magnetických nosičů. Na magnetické částice byl imobilizován např. chymotrypsin, který se používá k vsádkové hydrolyze kaseinu (Chen et al., 2001). Druhou významnou skupinu enzymů tvoří lipasy, které produkují různé druhy mikroorganismů. Jejich imobilizace na magnetických nosičích byla využita například k syntéze izoamylacetátu (imobilizovaná lipasa z *Rhizomucormiehe*) (Krishna et al., 2001), k biosyntéze ethylbutyrátu (imobilizovaná lipasa z *Candida antarctica*) nebo k transesterifikaci kukuřičného oleje a tristearinu (imobilizovaná lipasa z *Thermomyces lanuginosa*) (Torres et al., 2002).

V analytické praxi našlo použití magnetických částic s imobilizovaným trypsinem (Massia et al., 2000). Trypsin štěpí proteiny na peptidy. Toho lze využít při peptidovém mapování neznámého proteinu pomocí MALDI-TOF analýzy. MALDI-TOF analýza se používá v proteomice při identifikaci proteinů. Sekvence celé řady proteinů jsou již známy a jsou uloženy v rozsáhlých proteinových databázích. Pouhé stanovení molekulové hmotnosti nestačí. Proto se využívá peptidové mapování. Vzorek proteinu je podroben selektivnímu štěpení trypsinem. Při práci s volným trypsinem dochází k autolytickému štěpení. Trypsin štěpí sám sebe a v analyzované směsi vzniknou štěpy trypsinu, které stanovení ruší. Při imobilizaci trypsinu na nanočástici lze trypsin vytáhnout z roztoku pomocí magnetu včas a tím zmenšit možnost vytvoření těchto štěpů. Směs proteinových fragmentů se analyzuje metodou MALDI-TOF. Hmotnosti peptidů odečtené ze spektra se zanesou do tabulky a porovnají se s databází proteinů pomocí speciálních programů. Výsledkem je seznam proteinů, jejichž štěpením vzniknou peptidy o naměřených hmotnostech (Havliš, 1999). Po imobilizaci na

magnetické částice lze trypsin i jiné proteasy použít ve vyšší koncentraci, což vede ke zkrácení doby nutné ke štěpení. Následující magnetická separace umožňuje odstranění imobilizovaného trypsinu ze směsi proteinů před další analýzou štěpných peptidů (Klučová et al, 2009).

Kromě enzymů imobilizovaných na magnetických nosičích je možné pro katalytické účely využít magneticky modifikované buňky (celobuněčné katalyzátory). Buňky *Saccharomyces cerevisiae*, zabudované do magnetických alginátových mikročástic, nebo modifikované vodnou magnetickou kapalinou, byly použity při rozkladu peroxidu vodíku a konverzi sacharosu na invertní cukr (Šafařík et al, 2009).

2. 4 .3 .2. Imobilizované sacharidy na magnetických částicích

Kovalentní imobilizace sacharidů a jejich derivátů na magnetických částicích není zcela běžná. Příkladem může být 4-aminofenyl- β -D-thioglukopyranosid imobilizovaný na silanizovaných magnetických částicích, které byly následně použity pro afinitní separaci β -galaktosidasy (Dunnill et al, 1974).

Významnější jsou magnetické částice modifikované různými polysacharidy, nebo magnetické polysacharidové částice. Tyto částice je možné po vhodné aktivaci použít při imobilizaci vybraných biologicky aktivních látek a také jako specifické adsorbenty pro afinitní chromatografickou separaci různých látek. Magnetický derivát chitinu nebo chitosanu byl například použit při izolaci lysozymu z vaječného bílku (Šafařík et al, 1993) a také při izolaci lektinu z brambor.

2. 4 .3 .3. Imobilizované protilátky na magnetických částicích

Výhodou imobilizace protilátek na magnetických mikročásticích je možnost odstranění komplexu antigen-protilátka po skončení reakce vhodnou magnetickou separací. Pro stanovení biologicky aktivních látek je možné použít magnetickou modifikaci standardních enzymoimunochemických nebo radioimunochemických postupů (Ronning et al., 1991). Při ELISA metodách jsou specifické protilátky imobilizovány na povrchu stěn zkumavek nebo jamek mikrotitračních destiček a následně dochází k separaci navázaného a volného značeného antigenu. U této techniky byly nalezeny nedostatky, zejména omezená plocha pro imobilizaci protilátek a pomalý průběh reakce. Tyto nevýhody je možné odstranit, pokud je protilátka

kovalentně navázána na magnetické mikro nebo nanočástice, které je možné po skončení reakce spolu s navázaným značeným antigenem přichytit ke stěně nebo na dno zkumavek nebo jamek mikrotitračních destiček pomocí magnetu. Po jejich následném promytí je možné zjistit množství značeného navázaného antigenu (Ronning et al., 1991).

Stanovení některých mikroorganismů, zejména patogenních, případně jejich toxických metabolických produktů, patří mezi základní úkoly potravinářské a klinické mikrobiologie. Při použití tradičních mikrobiologických kultivačních technik je možné získat výsledky nejdříve za 3-4 dny. Pro urychlení mikrobiologického rozboru se používá magnetická separace z analyzovaného materiálu (Olsvik et al., 1994). Magnetické částice nesou na svém povrchu specifické polyklonální nebo monoklonální protilátky, které specificky interagují s vybranými povrchovými strukturami izolovaných mikrobiálních buněk. Komplex imunomagnetická částice-buňka je potom ze systému snadno odstraněn pomocí magnetického separátoru a takto izolované mikrobiální buňky mohou dále projít standardními mikrobiologickými testy, nebo mohou být testovány další metodou, například ELISA nebo PCR (Mansfield & Forsythe, 1995). Jednou z výhod imunomagnetických separací je možnost zachycení poškozených cílových buněk, které nejsou detekovatelné při klasických kultivačních postupech (Hornes et al., 1991).

Pro stanovení pesticidů ve vodách a půdních extraktech je možné využít již zmíněnou metodu ELISA, kdy jsou specifické protilátky imobilizovány na superparamagnetické částice (Lawruk et al., 1992). Mikrobiální buňky, které adsorbují pesticidy nebo chlorované uhlovodíky, je možné imobilizovat na magnetický nosič a použít je při dekontaminaci (MacRae & Evans, 1983).

2. 4 .3 .4. Imobilizované nukleové kyseliny a oligonukleotidy na magnetických částicích

Velmi často se magnetické techniky používají v molekulární biologii při práci s nukleovými kyselinami. Nejčastější aplikací je selektivní separace eukaryotní m-RNA pomocí magnetického nosiče nesoucího imobilizovaný oligodeoxythymidin (komerčně dostupné magnetické mikročástice Dynabeads® Oligo(dT)25). Využívá se skutečnosti, že většina eukaryotní m-RNA obsahuje na 3' konci polyadenylový řetězec a dochází tak k párování bází (Jakobsen et al., 1990). Izolovaná m-RNA se může využít k syntéze c-DNA. Izolace biotinylovaných biologicky aktivních látek pomocí

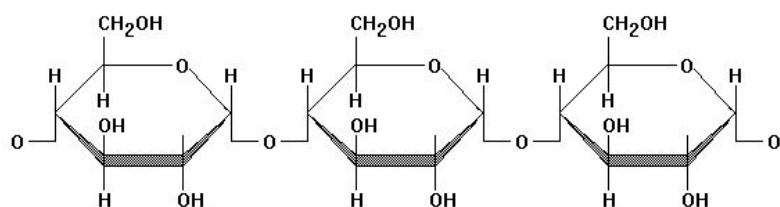
streptavidinu imobilizovaného na magnetické nosiče je často používanou metodou. Magnetické sorbenty byly použity také pro izolaci DNA vazebných proteinů, při izolaci vektorů a při mnoha dalších aplikacích (Húska *et al.*, 2009).

2. 5. Amylasy

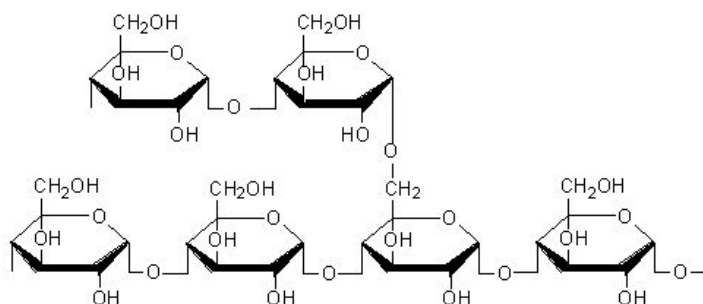
Prvním objeveným enzymem byla diastáza, kterou izoloval Anselme Payene v roce 1833 (Hill *et al.*, 1970). Překvapivě prvním průmyslově vyráběným enzymem byla amylasa izolovaná z plísní, používaná k léčbě onemocnění trávicího ústrojí (Pandey *et al.*, 2000).

Amylasy (1,4- α -D-glukan-glukanohydrolasa; EC 3.2.1.1.) katalyzují štěpení 1,4- α -D-glykosidické vazby uvnitř polysacharidového řetězce, který obsahuje tři a více těchto spojení. Tyto endoamylasy nesou schopnost obejít větvení s vazbou 1,6- α . Hydrolytickým působením α -amylasy na amylosu vzniká maltosa s hydroxylovými skupinami na C1 uhlíku v konfiguraci α . Substrátem amylas mohou být i větvené polysacharidy glykogen. I zde dochází k hydrolýze 1,4- α -D-glykosidických vazeb, zatímco vazby 1,6- α jsou zachovány. Výsledným produktem jsou větvené a nevětvené dextriny. (Zajoncová *et al.*, 2006).

Zdrojem amylas mohou být rostliny, plísně, živočichové a mikroorganismy. Jsou to velice důležité enzymy používané v biotechnologiích. V dnešní době představuje skupina amylas 25 % celkového trhu s enzymy (Rao *et al.*, 1998). Významným substrátem α -amylasy je škrob. Ten je hlavní složkou lidské potravy a je syntetizován v rostlinných buňkách jako nerozpustné granule složené z amylosy a amylopektinu (Obr. 11 a Obr. 12), které mají rozdílnou strukturu i vlastnosti (Souza *et al.*, 2010). Amylosa je tvořena dlouhými nerozvětvenými řetězci, složenými z glukosových zbytků, spojených vzájemně 1,4- α glykosidovými vazbami. Řetězec má strukturu šroubovice. Relativní molekulová hmotnost je v rozmezí 150 až 600 kDa (McKee *et al.* 1996). Amylopektin obsahuje také D-glukosu vázanou 1,4- α glykosidovou vazbou. Rozdílem je, že u amylopektinu připadá na každých 20 až 25 glukosových jednotek jedno rozvětvení, kdy se nový řetězec váže pomocí 1,6- α glykosidové vazby. Počet glukosových jednotek se v molekule amylopektinu liší a obvykle bývá od několika tisíc do milionu (Tester *et al.*, 2004).



Obr. 11. Struktura amylosy. Převzato z Souza et al., 2010.



Obr. 12. Struktura amylopektinu. Převzato z Souza et al., 2010.

Mnoho mikrobiálních amylas je dostupných komerčně a mohou tak plně nahradit chemickou hydrolyzu škrobu v průmyslu, při které se využívají dva druhy α -amylas - zcukrující a zkapalňující. Zkapalňující α -amylasa štěpí řetězce obsahující více jak 15 glukosových jednotek, zcukrující α -amylasa hydrolyzuje tetramery glukosy. Hlavní výhodou při použití mikroorganismů produkujících amylasy je jednoduchá aplikace a možnost získat enzymy požadovaných vlastností. (Souza et al., 2010).

Velké využití mají amylasy zejména v potravinářském, vodárenském, farmaceutickém a papírenském průmyslu.

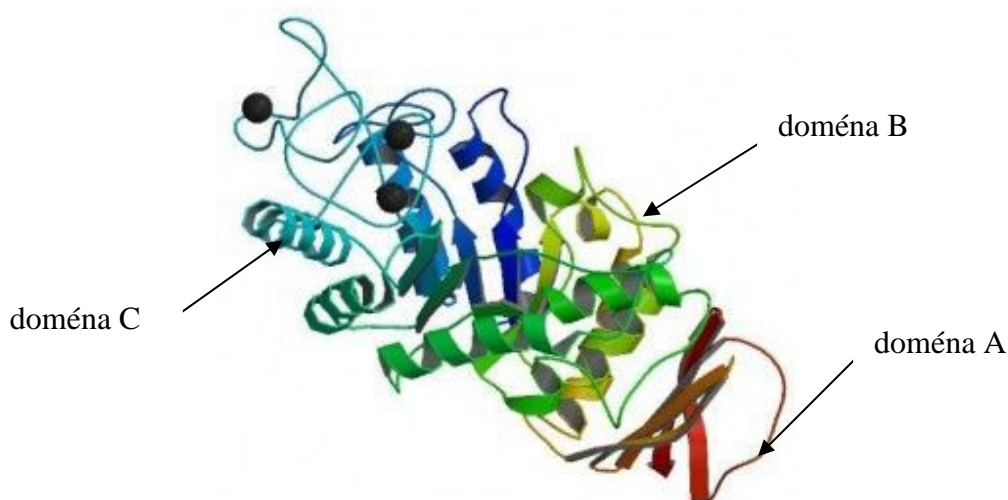
2. 5. 1. Klasifikace amylas

Amylasy lze rozdělit do dvou kategorií – endoamylasy a exoamylasy. Endoamylasy náhodně hydrolyzují α -1,4-glykosidové vazby s rychlou redukcí škrobu a produkují rozpustné dextriny a oligosacharidy. Exoamylasy štěpí glykogen na glukosu (Gupta et al. 2003).

Podle místa působení a vznikajících produktů dělíme amylasy na α , β a γ -amylasy. α -Amylasy jsou extracelulární enzymy atakující α -1,4-glykosidové vazby na kterémkoliv místě polymerů obsahujících tři a více těchto vazeb (Pandey et al., 2000). Jde o endoglykosidasu (1,4- α -D-glukan-glukanohydrolasu, EC 3. 2. 1. 1). Produktem tohoto hydrolytického štěpení jsou větvené a nevětvené α -dextriny. Amylopektin a glykogen jsou štěpeny náhodně na α -1,4-glykosidových vazbách. Vazby 1,6- α -D

zůstávají nedotčeny. Výsledkem štěpení α -amylas jsou větvené i nevětvené oligosacharidy.

Do skupiny α -amylas patří lidská slinná i pankreatická amylasa. α -Amylasy se vyskytují i u rostlin, hub (*Ascomycetes* a *Basidiomycetes*) a bakterií (*Bacillus*). Bakteriální α amylasy jsou evolučně vzdálené od eukaryotních, rentgenostrukturní analýza však prokázala, že se všechny tyto amylolytické enzymy skládají ze tří strukturních domén A, B a C (Obr.13) (Kuriki et al., 2005). Doménu A tvoří osmivláknový β -barel obsahující tři důležité aminokyseliny Asp176, Glu208 a Asp269 (číslování dle *B. subtilis*), účastníci se vlastní katalytické reakce. Doména B, vystupující z domény A, se skládá převážně z β - struktur a několika málo helixů. Doména C se skládá z antiparalelních β - vláken a vytváří motiv řeckého klíče. Předpokládá se, že doména C hraje určitou roli ve stabilizaci domény A, avšak přesná funkce domény C je prozatím neznámá (Souza et al., 2010).



Obr. 13. Struktura α -amylasy. Černé tečky označují katalytická centra (Ca^{2+} ionty). Aktivní místo je značeno zeleně. Převzato z Souza et al., 2010.

β -Amylasy (EC 3. 2. 1. 2.) jsou skupinou amylas syntetizovaných bakteriemi, plísněmi a rostlinami. β -Amylasy katalyzují hydrolýzu α -1,4-glykosidové vazby od neredukujícího konce polysacharidového řetězce (Pandey et al., 2000). Z amylosy tak vzniká maltosa. β - Amylasy patří mezi exoglykosidas (1,4- α -D-glukan-maltohydrolasa, EC 3. 2. 1. 2). Tyto amylasy se nevyskytují v lidské tkáni. (Sivaramakrishnan et al., 2006).

γ - Amylasa hydrolyzuje samostatné glukosové jednotky z neredukujícího konce amylosy nebo amylopektinu (1,4- α -D-glukan-glukohydrolasa, EC 3. 2. 1. 3). Je termostabilní a štěpí polysacharidy na rozdíl od α -amylasy nejen na vazbách 1,4- α -D,

ale i na vazbách 1,6- α -D. γ - Amylasy jsou mnohem účinnější v kyselém prostředí s optimálním pH 3 (Pandey et al., 2000).

2. 5. 2 Organismy produkující amylasy

Amylasy mohou pocházet z různých zdrojů jako jsou rostliny, živočichové a mikroorganismy, avšak dominantní postavení v průmyslu mají zejména α -amylasy získané z bakterií a plísní. Nejvíce používané plísně jako zdroj α -amylas jsou v současné době plísně třídy *Aspergillus* a *Penicillium*, nejvíce *Penicillium brunneum* (Kathiresan et al., 2006). Třída *Aspergillus* produkuje vysoce rozmanité extracelulární enzymy, jejich α -amylasy jsou velice významné a důležité v průmyslu (Jin et al., 1998). Amylasy získané z *A. niger* se používá v potravinářství k výrobě sojové omáčky, organických kyselin (kyselina citrónová a kyselina octová) (Kammoun et al., 2008). Z důvodu tolerance *A. niger* vůči kyselému prostředí (pH < 3) v jehož důsledku je zabráněno bakteriální kontaminaci je vyhledávaným zdrojem enzymů (Djekrif-Dakhmouche et al., 2006).

V průmyslovém procesu degradace škrobu se využívá termostabilních amylolytických enzymů. Termostabilita je důležitou vlastností mnoha bakteriálních enzymů, zejména stabilita termofilních organismů i při vysokých teplotách (100-110°C). Při degradaci škrobu za použití těchto bakterií vzniká dextrosa, glukosa, maltosa a maltodextriny (Asgher et al., 2007). Termostabilní α -amylasu produkují *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. gavealeus*, *B. mesentericus*, *B. myocodes* a další (Bessler et al., 2003). Bakterie jako *Chromobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Haloarcula hispanica*, *Halomonas meridiana* a *Bacillus dipsosauri* produkují α -amylasy jež jsou výrazně termotolerantní a zůstávají stabilní dlouhý čas i při pokojové teplotě (Deutch et al., 2002).

U bakterií patřících k rodu *Bacillus pseudomonas* (aerobní) a *Clostridium* (anaerobní), kmen aktinomycet zahrnující *Streptomyces* sp. a *Rhizopus* sp. patřící k plísním byla zjištěna produkce β -amylas (Fogarty et al., 1990). Plísně i bakterie jsou široce využívány pro produkci α -amylas, ale vzhledem k výhodám, které poskytují, jsou preferovány bakteriální amylasy. Zejména izolace termostabilních amylas je méně náročná u bakterií (Regulapati et al., 2007).

V těžkém průmyslu jsou využívány α -amylasy produkované některými mikroorganismy udržující optimální aktivitu při vysoké salinitě, kdy jsou jiné enzymy inhibovány vysokou koncentrací solí (Gomes et al., 2003). Přehled vlastností vybraných bakteriálních α -amylas a α -amylas produkovaných plísněmi shrnuje tabulka

č. 5. a 6. Z tabulek je zřejmé, že bakteriální amylasy preferují pH spíše neutrální, kdežto plísňové zase mírně kyselé.

Tab. 5. Vlastnosti bakteriálních α -amylas.

Bakterie (zdroj α -amylasy)	Optimální pH	Optimální teplota	Reference
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7.0	33 °C	Tanyildizi et al., 2005
<i>Chromohalobacter sp.</i>	7.0-9.0	65 °C	Prakash et al., 2009
<i>Haobacillus sp.</i>	7.5-8.5	50°C	Amoozegar et al., 2003
<i>Bacillus subtilis</i>	6.5	135 °C	Consula et al., 2004
<i>Halomonas meridiana</i>	7.0	37°C	Coronado et al., 2000
<i>Bacillus dipsosauri</i>	6.1	60°C	Deutch et al., 2002

Tab. 6. Vlastnosti α -amylas produkovaných plísněmi

Houby (zdroj α -amylasy)	Optimální pH	Optimální teplota	Reference
<i>Aspergillus niger</i>	5.5	70 °C	Uguru et al., 2007
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.0-9.0	25-35 °C	Jin et al., 1998
<i>Aspergillus kaawachii</i>	3.0	30 °C	Kajiwara et al., 1997
<i>Cryptococcus flavus</i>	5.5	50 °C	Wanderley et al., 2004
<i>Penicillium fellutanum</i>	6.5	30 °C	Kathiresan et al., 2006
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	5.0	30 °C	Moller et al., 2004

2. 5. 3. Charakteristika α -amylas

Rozmanitost aplikací α -amylas vytváří potřebu hledat nové amylasy s vlastnostmi, díky kterým by byly amylasy stabilnější. Mezi tyto vlastnosti, důležité pro aplikaci α -amylas zejména v průmyslu, patří termostabilita, široký profil pH, přítomnost kovových iontů a vliv substrátu.

Jedním z hlavních faktorů ovlivňující aktivitu α -amylasy je teplota. Je žádoucí aby amylasa byla aktivní i při vysokých teplotách (100-110°C). Při těchto teplotách vykazují enzymy vyšší aktivitu, reakce probíhají rychleji a jejich použití je tak

ekonomičtější. To vede k nepřetržitému hledání termofilních a termostabilních α -amylas (Burhan et al., 2003). α -Amylasy obsahují jeden nebo dva Ca^{2+} ionty přítomné blízko aktivního centra vytvořeného doménami A a B. Tyto vápenaté ionty jsou nezbytné pro vazbu substrátů a následnou stabilitu enzymu. Vazba Ca^{2+} iontu podává informaci o termostabilitě. Saboury (Saboury 2002) popsal existenci 17-ti různých sekundárních vazebných míst pro vápník α -amylasy získané z *B. amyloliquefaciens*, které jsou zodpovědné za stabilizaci enzymu navzdory teplotní denaturaci. Stabilitu α -amylasy za vysoké teploty u rodu *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* a *B. Stearothermophilus* popsal Weemaes (Weemaes et al., 2002). Výsledkem bylo zjištění, že nejstabilnějším z těchto tří zkoumaných enzymů je α -amylasa z *B. licheniformis*. Různé zdroje α -amylasy s významnou termostabilitou jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Tab. 7. α -Amylasy vyznačující se vysokou termostabilitou.

Organismus produkující α -amylasu	Rozsah teploty (°C)	Teplotní optimum (°C)	Reference
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	50-60	55	Aguilar et al., 2000
<i>Bacillus</i> sp. 1-3	65-100	70	Goyal et al., 2005
<i>Pyrococcus furiosus</i>	80-100	100	Vieille et al., 2001
<i>Cryptococcus flavus</i>	50-60	50	Wanderley et al., 2004
<i>Aspergillus tamaris</i>	50-60	55	Moreira et al., 2004
<i>Scytalidium thermophilum</i>	55-65	60	Aquino et al., 2003

Přirozené pH škrobu se pohybuje obvykle kolem 4,5. Extrémní podmínky vyžadují použití enzymů, které jsou rezistentní při vysoké teplotě i nízkém pH. Kyselá hydrolyza peptidových vazeb probíhá mnohem častěji při nízkém pH od C-konce Asp zbytků, obsahujících vazbu Asp-Pro. Tato skutečnost způsobuje, že dusík prolinu je mnohem zásaditější než ostatní zbytky a Asp má vyšší tendenci pro α - β izomeraci při vazbě na N-konec prolinu (Vieille et al., 2001). Hydrolyza peptidových vazeb se nevyskytuje na helikální a beta struktuře (Fontana et al., 1995). Zdá se, že Asp zbytky nebo Asp-Pro vazby, nacházející se mimo helikální a beta strukturu, snadno podléhají hydrolyze při nízkém pH. Stabilitu enzymů výrazně zlepšuje přítomnost látek jako jsou sorbitol, glycerol nebo trehalosa. Navíc jsou enzymy odolné vůči kyselé hydrolyze (Khajeh et al., 2006). pH optimum (kyselá, neutrální nebo bazická prostředí) α -amylasy popisuje tabulka č. 8.

Tab. 8. pH optimum α -amylas organismů produkujících α -amylasy

Organismus produkující α -amylasu	Rozsah pH	pH optimum	Reference
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	4,0 - 6,0	5,5	Aguilar et al., 2000
<i>Bacillus</i> sp. I-3	5,0 - 5,5	7,0	Goyal et al., 2005
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	2,0 - 6,5	5,0	Sudo et al., 1994
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	5,0 - 7,0	6,0	Iefuji et al., 1996

Mnoho amylas je známo svou závislostí na přítomnosti kovových iontů, jmenovitě Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} a dalších (Pandey et al., 2000). Působení vápenatých iontů na termostabilitu α -amylas bylo již zmíněno dříve. Ca^{2+} také zvyšují aktivitu α -amylas rodu *Bacillus* sp. (Burhan et al., 2003). Malhotra et al. popsal existenci termostabilní α -amylasy z *B. thermooleovorans* NP54, která nevyžaduje přítomnost Ca^{2+} iontů pro její aktivitu a produkci (Malhotra et al., 2000). Zn^{2+} působí rozmanitě na různé amylasy. Inhibuje termostabilní α -amylasy z termofilních kmenů *Bacillus* sp., kdy snížení aktivity enzymu naznačuje jeho vysokou termostabilitu (Burhan et al., 2003). Podrobný seznam kovových iontů ovlivňujících pozitivně nebo negativně aktivitu amylasu shrnuje tabulka č. 9.

Tab. 9. Shrnutí působení kovových iontů na aktivitu α -amylas.

Organismus produkující α -amylasu	Kovový iont	Reference	Aktivita
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Ca^{2+}	Kang et al., 2004	+
<i>Vibrio</i> sp.	Mg^{2+}	Najafi et al., 2005	+
<i>Bacillus</i> sp. I-3	Mn^{2+}	Goyal et al., 2005	+
<i>L. manihotivorans</i> LMG 18010	Zn^{2+}	Aguilar et al., 2000	-
<i>Cryptococcus flavus</i>	Fe^{2+}	Wanderley et al., 2004	+
<i>Bacillus</i> sp. I-3	Cu^{2+}	Goyal et al., 2005	-

Substrátová specifita α -amylas byla hodnocena rozpustností škrobu, amylosy, amylopektinu, glykogenu, maltodextrinu a α - a β -cyklodextrinu. Nejlepším substrátem pro α -amylasu z *L. manihotivorans* LMG 18010T je amylopektin. Relativní aktivita zaznamenaná za přítomnosti amylosy jako substrátu je 1,6 krát rychlejší (o 90 %) než za použití škrobu (Aguilar et al., 2000). Přírodní škroby zahrnující kukuřičný škrob (Kunamneni et al., 2005), škrobovou moučku (Yang et al., 2004), obilný škrob (Najafi et

al., 2005) a pšeničný škrob (Iefuji et al., 1996) jsou substráty, které vykazují zvýšení relativní aktivity α -amylasy.

2. 5. 4 Látky stimulující aktivitu α -amylasy (inhibitory a aktivátory)

Aktivitu α -amylasy ovlivňuje mnoho látek. V předchozích kapitolách byl zmíněn vliv vápenatých iontů na zvýšení aktivity amylasy. Pokud dojde k odstranění vápenatého iontu, dochází ke ztrátě aktivity enzymu. Ta však může být částečně obnovena nahrazením vápenatého iontu některým z iontů skupiny lantanoidů, např. Lu^{3+} , Pr^{3+} a Sm^{3+} (Darnall et al., 1973). Aktivitu α -amylasy lze zvýšit i přidáním chloridových iontů, nejčastěji pak přidáním CaCl_2 (0,1 %) a NaCl (0,1 %) (Francis et al., 2003).

Inhibitory amylasy lze rozdělit na dvě skupiny. Do první patří jednoduché neproteinové sloučeniny. Nejběžněji používané jsou 2-deoxyglukosa (*Struthio camelus*), arabitol (*Aspergillus flavus*), EDTA (*Bacillus sp.*), ethylenglykol, glycerol, sorbitol (vše *Aspergillus flavus*), močovina (*Homo sapiens*) a další (Zajoncová et al., 2007). Do druhé skupiny řadíme peptidy a proteiny. Proteinové inhibitory syntetizované rostlinami, např. pšenicí a fazolí, se v poslední době dostávají do popředí zájmu jako léčebné škrobové blokátory v lidském těle. Snižují hladinu krevního cukru, a proto jsou využívány při léčbě *Diabetes mellitus* a obezity. Purifikovaný extrakt z rostlin se dostává do těla společně s potravou, a zabraňuje tak štěpení škrobů α -amylasami vylučovanými do střev buňkami pankreatu (Boivin et al., 1987). Významnou roli hrají tyto proteinové inhibitory také při ochraně kulturních plodin před různými škůdci a patogeny. Byly nalezeny hlavně v obilovinách jako je pšenice, ječmen, žito, ale také luštěninách jako jsou fazole (Melo et al., 1999). Vlivem působení hmyzu a různých patogenů na rostliny dochází k vážným škodám na kulturních plodinách. Rostliny si během vývoje vytvořily určité obranné mechanismy a staly se tak odolnějšími vůči působení těchto škůdců. Obrana je založena na syntéze určitých sloučenin (sekundárních metabolitů) jako jsou antibiotika, alkaloidy, terpeny a některé proteiny (Franco et al., 2002). Enzymové inhibitory jsou důležitou zbraní proti trávicím hydrolázám (α -amylasy a proteinasy) hmyzu a dalších škůdců. Některé druhy α -amylasových a proteinasových inhibitorů přítomných v semenech a vegetativních orgánech rostlin regulují působení fytopatogenního hmyzu.

2. 5. 5 Optimalizace podmínek produkce α -amylas

Pro požadavky průmyslu je důležitá optimalizace různých faktorů zajišťujících nadprodukcí enzymů ve velkém množství (Carlsen et al., 1996). Jsou známy různé chemické a fyzické faktory mající vliv na produkci α -amylas jako teplota, pH, doba inkubace, vlhkost, kovové ionty, fosfáty a další. Vzájemné působení těchto parametrů významně ovlivňuje produkci mikrobiálních α -amylás.

Vliv teploty na produkci amylas souvisí s růstem organismu, a proto teplotní optimum závisí na tom, zda je kultura mezofilní nebo termofilní. Mnoho plísňích produkujících α -amylasy patří mezi mezofilní organismy mající teplotní rozmezí mezi 25-37°C (Ramachandran et al., 2004). *Aspergillus ficuum* produkuje α -amylasu při 30°C (Hayashida et al., 1986). Kvasinky jako *Saccharomyces kluyveri* a *S. cerevisiae* produkují α -amylasu také při 30°C (Moller et al., 2004). Pro termofilní plísňové kultury rodu *Talaromyces emersonii*, *Thermomonospora fusca* a *Thermomyces lanuginosus* je teplotní optimum v rozmezí 50-55°C (Jensen et al., 1992). Bakteriální amylasy jsou produkovány v širokém rozmezí teplot. *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* a *B. stearothermophilus* patří mezi nejběžněji používané z rodu *Bacillus* sp. produkující α -amylasy v teplotním rozsahu 37-60°C (Mishra et al., 2004). Několik termofilních druhů, mezi které patří *Thermococcus profundus* a *Thermatoga maritima*, jsou známy produkcí amylasy při teplotách až 80°C (Vieille et al., 2001). α -Amylasy z *Alteromonas haloplanktis*, původem z antarktidy, jsou aktivní i při nízkých teplotách a projevují produkci α -amylas už při 4°C (Feller et al., 1998).

pH je jedním z důležitých faktorů pro stanovení růstu a morfologie mikroorganismů. Studie ukazují, že plísně potřebují k optimálnímu růstu nepatrně kyselá pH, naproti tomu bakterie neutrální. pH ovlivňuje syntézu a sekreci α -amylas stejně jako jejich stabilitu (Fogarty et al., 1983). Plísně rodu *Aspergillus* sp. jako *A. oryzae*, *A. ficuum* a *A. niger* vykazují významnou produkci α -amylas v rozmezí pH 5,0-6,0 (Carlsen et al., 1996). α -Amylasy produkované kvasinkami mezi které patří *Saccharomyces cerevisiae* a *S. kluyveri* projevují maximální produkci enzymů při pH=5 (Moller et al., 2004). Bakteriální kultury, především pak *B. subtilis*, *B. licheniformis* a *B. amyloliquefaciens* požadují počáteční pH 7,0 (Taniydizi et al., 2005). U hypertermofilních bakterií jako *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* a *Thermococcus profundus* je optimální pH pro produkci amylas rovno 5 (Vieille et al., 2001). Pro *Clostridium thermosulfurogenes* patřící mezi termofilní anaerobní bakterie je pH optimum 7 (Swamy et al., 1996).

Přítomnost kovových iontů významně ovlivňuje produkci enzymů, jelikož většina α -amylas jsou metaloenzymy. Ca^{2+} jsou přítomny v těchto enzymech nejčastěji a

přídavek CaCl_2 výrazně zvyšuje produkci enzymů (Patel et al., 2005). Byly zaznamenány pozitivní účinky CaCl_2 (0,1%) a NaCl (0,1%) na α -amylasu produkovanou kmenem *Amaranthus* (Vishwanathan et al., 2001). Zvýšenou produkci α -amylas vykazuje *Bacillus* sp. I-3 v přítomnosti LiSO_4 (20 mM) a MgSO_4 (1 mM) (Goyal et al., 2005), zatímco FeCl_3 působí na produkci amylasy negativně (Vishwanathan et al., 2001).

Morfologické vlastnosti substrátu, mezi které patří, zda-li je substrát krystalický, amorfní, propustný, jaký má povrch a velikosti částic úzce souvisí s aktivitou enzymu. Mezi těmito parametry hraje významnou roli velikost částic (Pandey, 1991). Menší částice mají větší povrch, avšak vnitřní pórovitost je nižší. U větších částic substrátu platí, že pórovitost je vyšší na úkor saturace povrchu. Z tohoto důvodu je nutné pracovat s odpovídajícími velikostmi částic substrátu v závislosti na jeho růstu (Pandey et al., 1991).

Mezi důležité parametry dále patří vlhkost. Nízká a vysoká vlhkost substrátu působí na růst mikroorganismů a ovlivňuje produkci enzymů. Vysoká vlhkost vede k redukci poréznosti substrátu, změně v struktuře velikosti částic substrátu a redukci objemu. Studie ukázaly, že enzymy výrazně lépe reagují s médiem s vyšší vlhkostí (Ramesh et al., 1990). Termostabilní *B. subtilis* požaduje pro růst a maximální produkci α -amylasy vlhkost 30 % (Baysal et al. 2003). Vlhkost důležitá k produkci α -amylas z *A. oryzae* (pšenice) a *Streptomyces rimosus* (sladké brambory) se pohybuje okolo 65 % (Yang et al., 1999).

2. 5. 6 Stabilizace α -amylas

Teplota, pH i chemikálie tak ovlivňují katalytickou aktivitu enzymů. Funkčnost enzymu je závislá zejména na jeho operační stabilitě a stabilitě při skladování (Fagain, 2003). Z tohoto důvodu, stabilita enzymu a jeho stabilizace může být dosažena přidavkem stabilizujících činidel, pomocí chemické modifikace, imobilizace, proteinového inženýrství a dalších. Mezi zmiňovaná stabilizující činidla patří Ca^{2+} používaný hlavně pro dosažení termostability (Mamo et al., 1999). Bylo doloženo, že působení Na^+ , K^+ , NH_4^+ a hovězího séra na α -amylasu má ochranný účinek (Janeček et al., 1992). Ethylenglykol, propandioly, glycerol, dimethylformamid a dimethylsulfoxid zvyšují poločas životnosti α -amylasy u *B. stearothermophilus* dvojnásobně. Tyto sloučeniny stabilizují enzym navzdory teplotní denaturaci způsobenou interakcí iontů (Brumm et al., 1989). Přídavek polyethylenglykolů o různé molekulární hmotnosti v rozmezí 400-800 Da zvyšuje aktivitu a stabilitu α -amylas získaných z různých druhů

(Yoon et al., 2005). Existuje řada studií porovnávajících různá stabilizační činidla, kde sorbitol poskytuje nejvyšší ochranu proti teplotní denaturaci zvyšováním T_{50} a zabraňuje deaminaci aminokyselinových zbytků (Khajeh et al., 2001). Byla studována teplotní inaktivace α -amylasy z *A. oryzae*. Výsledky ukazují, že teplotní stabilita je udržována lépe v systému maltodextrinů redukujících vlhkost obsaženou ve vodném prostředí (Samborská et al., 2005).

2. 5. 7 Purifikace α -amylas

V řadě procesů je důležitá čistota koncových enzymů a proto jsou enzymy purifikovány. Mnoho enzymů je purifikováno za pomoci chromatografických technik po předchozí izolaci precipitací a membránové separaci. Potřeba efektivního zisku proteinů ve velkém množství má za následek vývoj technik poskytujících rychlost, efektivnost a ekonomický postup používající méně kroků při purifikaci (Amritkar et al., 2004). Purifikační techniky používající jednokrokovou purifikaci α -amylasy popisuje tabulka č. 10.

Tab. 10. Metody jednokrokové purifikace α -amylas.

Metoda	Adsorbent	Výnos v %	Reference
Afinitní adsorpční chromatografie	k. β -cyklodextrin- iminodioctová- Cu^{2+}	95	Liao et al., 2005
Vysokorychlostní chromatografie	PEG4000-vodný dvoufázový systém	73,1	Zhi et al., 2005
Magnetická afinitní adsorpce	magnetické alginátové mikročástice	88	Šafaříková et al., 2003
Další afinitní metody	nerozpustný kukuřičný škrob při 4°C	78	Najafi et al., 2005

2. 5. 8 Modifikace α -amylasy a cílená mutageneze

Jelikož α -amylasy používané v průmyslu bývají vystaveny extrémním podmínkám jako jsou např. vysoké nebo nízké hodnoty pH, zvýšená teplota a tlak, oxidační činidla a detergenty (Nielsen et al., 2000), jsou používány metody, které vedou k jejich stabilizaci. Jedná se zejména o chemickou modifikaci s následnou imobilizací a cílenou mutagenezí.

Jako modifikační činidla jsou používány sloučeniny na bázi sacharidů. Předpokladem je, že cukerné zbytky přirozeně se vyskytujících glykoproteinů mají vliv na jejich zvýšenou stabilitu vůči teplotě a chemickým denaturačním činidlům (Schmid, 1979). Po vnesení sacharidu do molekuly enzymu dochází k tvorbě nových inter- a intramolekulárních vazeb. Sacharidové řetězky zvyšují rozpustnost daného glykoproteinu ve vodě. Modifikace reaktivních skupin proteinu může být prováděna redukujícími disacharidy (maltosa), nízkomolekulárními monosacharidy (glukosa, fruktosa) ale také polysacharidy (škrob, dextran, celulóza). Prvním krokem modifikace α -amylasy β -cyklodextrinem je aktivace cukerné složky pomocí jodistanu sodného. Ten slouží jako oxidační činidlo. Vzniká tak polyaldehyd, který je následně navázán na N-koncovou aminoskupinu a ϵ - aminoskupinou lysinu, což má za následek vznik Schiffovy báze.

Cílená mutageneze umožňuje produkovat proteiny s pozměněnou sekvencí aminokyselin, které mohou vykazovat vyšší stabilitu vůči pH (Fang & Ford, 1998) nebo teplotě (Matthews et al., 1987). Chemická mutageneze pomocí různých chemických činidel, mezi které patří kyselina dusitá nebo ethylmethyl sulfonát (EMS), je využívána zejména u bakterií (Bin et al., 1999). Mutageneze indukovaná chemikáliemi jako N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) nebo UV radiace způsobuje nadprodukcí řetězců, v případě syntézy α -amylasy často zdvojnásobení, dokonce i ztrojnásobení řetězce (Pandey et al., 2000).

2. 6 Metody stanovení aktivity α -amylasy

Aktivita α -amylasy je monitorována stovkami metod popsaných v literatuře. Požadavky na stanovení aktivity amylasy jsou kladeny zejména v oblasti klinické biochemie, kde změněná aktivita enzymu diagnostikuje závažné onemocnění. Podle způsobu detekce stanovení aktivity amylasy jsou metody děleny na amyloklastické, sacharogenní, chromogenní a metody využívající biosenzory (Zajoncová et al., 2006).

2. 6. 1 Metody amyloklastické

Možnosti dosažení vysokého stupně přesnosti a správnosti jsou amyloklastické metody před sacharogenními upřednostňovány. Metody amyloklastické měří změny koncentrace substrátu v reakční směsi. Substrátem je ve většině případů škrob, ale používá se také amylopektin a amylosa. Reakcí vzniká modrý komplex s jodem, na jehož základě se metody nazývají také metody jodometrické. Barevný produkt reakce je pak měřen při 620 nm (Pimstone, 1964).

Změny koncentrace substrátu lze sledovat dále metodami turbidimetrickými, které měří snížení zářivého toku světelného paprsku, k němuž dochází rozptylem světla na částicích rozptýlených v kapalině. K měření jsou používány fotometry nebo spektrofotometry. Při stanovení aktivity amylasy se používá jako substrát amylopektin, který je nerozpustný. Sleduje se rychlost snížení turbidity při 540 nm (Malkus et al., 1977).

Hydrolýza škrobu katalyzována α -amylasou a glukoamylasou může být monitorována před a po jejím průběhu metodou infračervené spektroskopie, kdy můžeme stanovit aktivitu obou zúčastněných enzymů, přičemž je tato hydrolýza monitorována ve střední oblasti infračerveného spektra pomocí Fourierových transformací spektroskopické detekce (Schindler et al., 1998).

2. 6. 2 Metody sacharogenní

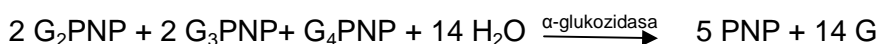
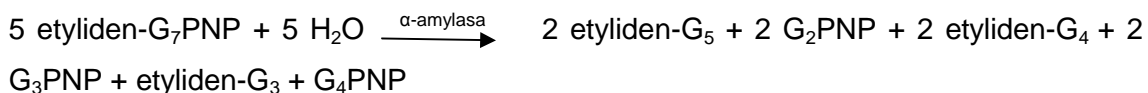
Metody sacharogenní stanovují množství vznikajících redukujících sacharidů, nejčastěji maltosy nebo glukosy, popřípadně dextrinů vzniklých enzymovým štěpením. Nevýhodou je interference endogenní glukosy, která se může vyskytovat v biologických vzorcích. Byla proto navržena metoda, kde se glukosa v roztoku po enzymové reakci α -amylasy rozkládá za přítomnosti dvou enzymů – glukosaoxidasy a katalasy. Glukosaoxidasa přemění glukosu na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku. Ten je ze směsi odstraněn katalasou. Vzniklá směs se poté dialyzuje a maltosa (redukující oligosacharid) reaguje s roztokem měď-neocuproin při 95 °C po dobu 3 minut. Vzniká tak barevný komplex jehož absorbance je měřena při 450 nm (Nashidate et al., 1981).

Sacharogenní metody využívají pro stanovení redukujícího cukru maltosy spektrofotometrickou metodu, která je založena na reakci s 3,5-dinitrosalicylovou kyselinou. Výsledkem je cihlově zbarvený komplex, jehož absorpční maximum je při 540 nm (van Staden et al., 2000).

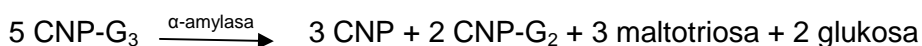
2. 6. 3 Metody chromogenní

Chromogenní metody jsou založeny na tvorbě barevného produktu, který vznikne po hydrolyze polysacharidového substrátu označeného chromogenem. Využívají se syntetické substráty odvozené od maltosy značené 4-nitrofenolem, který je navázán na konec nedefinovaného oligosacharidu jako je maltotreaosa, maltopentaosa, maltohexaosa nebo maltoheptaosa. Velkou nevýhodou těchto umělých substrátů je avšak jejich poměrně vysoká cena, i přes jednoduchost, přesnost a spolehlivost. Hydrolytickým působením α -amylasy na chromogenní substrát 4,6-ethyliden-*p*-nitrofenyl-D-maltoheptaosid (EPS) vznikají nižší oligosacharidy s navázaným 4-nitrofenolem. Po přidání α -glukosidasy do směsi dochází k následnému štěpení na volné oligosacharidy, 4-nitrofenol a glukosu (Obr. 14). Volný 4-nitrofenol absorbuje při 405 nm (Rauscher et al., 1985).

Chromofor může být uvolňován přímo α -amylasou, kdy není zapotřebí žádných pomocných enzymů. Štěpením 2-chloro-*p*-nitrofenyl-maltotriosidu vzniká 2-chloro-*p*-nitrofenyl α -D-maltosid, maltotriosa, glukosa a volný 2-chloro-*p*-nitrofenol (Obr. 15), jehož absorbance se měří při 405 nm (Dupuy et al., 1987).



Obr. 14.: Schéma hydrolytického štěpení EPS (PNP = *p*-nitrofenol, G = glukosa).



Obr. 15.: Schéma štěpení 2-chloro-*p*-nitrofenyl-maltotriosidu (CNP-G2 je 2-chloro-*p*-nitrofenyl-maltotriosid).

2. 6. 4 Metody využívající biosenzory

Princip metody vychází z metod sacharogenních využívajících při katalýze α -amylasy vznik sacharidů. Stanovuje se množství maltosy, která je konečným produktem hydrolýzy škrobů (Zajoncová et al., 2007).

Ke stanovení aktivity α -amylasy se využívá kyslíková elektroda pokrytá enzymovou membránou s α -glukosidasou, na které dochází k štěpení maltosy na dvě molekuly glukosy. Spotřeba kyslíku je pak přímo úměrná aktivitě α -amylasy. V nedávné době byl konstruován průtokový biosenzor pro stanovení aktivity slinné amylasy, který obsahoval předkolonu, ve které byla imobilizována α -glukosidasa štěpící vznikající maltosu na dvě molekuly glukosy, jejíž koncentrace byla poté stanovena na peroxidové elektrodě s glukosaoxidasou (Yamaguchi et al., 2003).

Pro zjišťování vlivu barevných inhibitorů jako jsou benzo(c)fenantridinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin byl konstruován biosenzor, jehož součástí nebyla předkolona. Štěpení škrobu α -amylasou probíhalo konstantní dobu, poté byla aktivita vzniklé maltosy stanovena pomocí peroxidové elektrody, překryté enzymovou membránou s α -glukosidasou, mutarotase a glukosaoxidasou. Vliv škrobového substrátu na stanovení byl eliminován požitím tohoto substrátu jako nosného roztoku (Zajoncová et al., 2007).

2. 7. Imobilizace α -amylasy na pevné nosiče

Katalytická aktivita enzymů úzce souvisí s jejich terciální strukturou a prostorovým uspořádáním. Každá stálá nebo dočasná změna jejich přirozeného uspořádání, způsobená fyzikálními nebo chemickými činidly, ovlivňuje jejich katalytickou funkci. Imobilizace enzymů je jednou z metod pro ochranu a stabilizaci enzymů umožňující jejich opakované použití. Stabilizace spočívá inaktivaci daného enzymu a v zamezení denaturace (Pandey et al., 2000).

α -Amylasy jsou průmyslově využívané enzymy a byly již mnohokrát imobilizovány na nejrůznější nosiče (Tab.11). Imobilizované amylasy lze lehce odstranit z reakčního prostředí a znovu je použít, anebo se mohou uplatnit v kontinuální hydrolýze škrobových substrátů, kdy jsou vystaveny vysoké teplotě. Je tedy důležité, aby α -amylasy byly termostabilní (Bayramoğlu et al., 2004).

Z literatury je známa celá řada případů, kdy imobilizované α -amylasy vykazují menší citlivost vůči teplotě než volné enzymy (Chang & Juang, 2004) Dalším

požadavkem, který je kladen na průmyslové enzymy, je jejich pH stabilita (Bryjak, 2003).

Tab.11.: Přehled různých technik používaných k imobilizaci α -amylas.

Zdroj amylasy	Nosič	Aktivita po imobilizaci (%)	Reference
<i>Bacillus</i> sp.	kopolymer butylakrylátu a ethylen glykoldimethakrylátu aktivovaný glutaraldehydem	79,2 %	Bryjak, 2003
	mikro částice polyhydroxyethylmethakrylátu		Arica et al., 1995
<i>B. subtilis</i>	Ca ²⁺ - alginátové gelové kapsle	90 %	Konsoula et al., 2006
	sodná sůl bis(2-ethylhexyl) sulfosukcinátu	60 %	El-Batal et al., 2005
<i>B. licheniformis</i>	kopolymer polyhydroxyethyl metakrylátu a glycidyl metakrylátu	76 %	Tanyolaç et al., 1998
	nitrocelulosoová membrána s navázaným barvivem Cibacron Blue F3GA	80 %	Bayramoglu et al., 2004
<i>A. oryzae</i>	membrána s poly(ethylenglykol dimethakrylát-n-vinyl imidazol) s vázaným Ca ²⁺	70%	Kara et al., 2005
<i>V.radiata</i>	chitosanové mikro částice, Amberlit MB 150	75 %	Tripathi et al., 2007
<i>G.stearothermophilus</i>	mikro částice polyvinylaminu a polyvinylformamidu	68 %	Konieczna-Molenda et al., 2009

2. 8. Průmyslové aplikace α -amylasy

Historie uplatnění enzymů sahá do doby, kdy Dr. Jhokichii Takamine roku 1984 izoloval trávící enzym, α -amylasu z *A. Oryzae* nazývanou Taka diastasa, která byla byla určena k léčbě zažívacích potíží spojených s neschopností štěpit škrob (Bennet, 2001).

Na α -amylasy z mikrobiálních zdrojů, především plísní a bakterií pro průmyslové aplikace jsou kladeny požadavky nízké ceny a jednoduchého procesu modifikace a optimalizace (Burhan et al., 2003). Nejčastěji používané jsou α -amylasy z mikrobiálních zdrojů díky jejich rozmanitým vlastnostem ve vztahu k teplotě, pH a jiným fyzickým faktorům, kterých lze využít v daném průmyslovém zpracování (Sogaard et al., 2003).

Využití v průmyslu pro různé aplikace mají zejména α -amylasy izolované z *Bacillus* spp.: *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* a *B. amyloliquefaciens*. Amylasy rodu *Bacillus* imobilizované na magnetických částicích jsou velice zajímavé v biotechnologii díky jejich významné termostabilitě s účinnou expresí enzymu α -amylasy (Prakash et al., 2009). Glukoamylasy jsou získávány především z *Aspergillus niger* a příbuzných kmenů (Sivaramakrishnan et al., 2006). Dnes tvoří α -amylasy 30 % celosvětové produkce enzymu (Van der Maarel et al., 2002) s každoročním obratem okolo 11 miliard dolarů (Kilara & Desai, 2009).

α -Amylasy jsou používány v řadě průmyslových odvětví jako např. textilním a papírenském průmyslu, v potravinářství, k výrobě paliv na bázi alkoholu, k hydrolýze škrobu či výrobě detergentů (Aehle & Misset, 1999).

2. 8. 1. Přeměna škrobu

Zpracování škrobu je nejvíce rozšířenou aplikací α -amylas. Je založeno na hydrolýze škrobu, při které je škrob přeměněn na glukosu (Reddy et al., 2003). Enzymová přeměna škrobu zahrnuje rosolovatění vyžadující rozpuštění škrobových granulí, čímž vzniká viskózní suspenze. Dalším krokem je zkapalnění založené na částečné hydrolýze a ztrátě viskozity. Posledním krokem je zcukernatění, které má za následek produkci maltosy a glukosy (Gupta et al., 2003). Při hydrolýze škrobu se používají jako katalyzátory enzymy. Kyselá hydrolýza má mnoho limitací: není specifická, má nedostatečnou kontrolu složení cukrů, požadavky vysoké čistoty a

šetrnosti k životnímu prostředí, přičemž aplikací enzymů při kyselé hydrolyze se vyhneme těmto limitacím (Crabb & Shetty, 1999).

Původně byla k hydrolyze škrobu používána α -amylasa z *Bacillus amyloliquefaciens*, která byla nahrazena α -amylasou z *Bacillus stearothermophilus* nebo *Bacillus licheniformis* (Van der Maarel et al., 2002).

2. 8. 2. Výroba detergentů

Pro výrobu čistících prostředků je potřeba velkého objemu enzymů, proto jsou nejčastěji používané detergenty obsahující α -amylasy. Amylasy jsou součástí až 90 % kapalných čistících prostředků (Gupta et al., 2003). Enzymy jsou používány k odstranění skvrn a jejich hlavní výhodou je šetrnost k životnímu prostředí. Používají se zejména v pracích prostředcích a prostředcích určených do myček nádobí, které rozkládají zbytky škrobu z potravy jako jsou brambory, omáčky, pudink, čokoláda, tzn. dextriny a jiné menší oligosacharidy (Olsen et al., 1998). Pro odstranění škrobu z různých povrchů je také důležitá přítomnost bělicích přísad.

Amylasy jsou aktivní při nižších teplotách a alkalickém pH. Tyto podmínky a také oxidativní stabilita α -amylasy jsou jedny z nejdůležitějších kritérií pro jejich použití při výrobě detergentů (Kirk et al., 2002). Alkalické α -amylasy používané v detergitech obsahují obvykle chelatující činidla s jednoduše odstranitelným vápníkem, který je nezbytný pro jejich stabilitu (Nonaka et al., 2003). Jednou z nejběžněji využívaných α -amylas v průmyslové výrobě čistících prostředků jsou amylasy získané z *Bacillus* sp. (Horikoshi, 1996) nebo *Aspergillus* (Mitidieri et al., 2006).

2. 8. 3. Výroba paliv na bázi alkoholu

Ethanol je nejběžněji využívané biopalivo zejména v posledních desetiletích. Jeho zájem vzrostl v souvislosti s ekologickými obavami působení běžných paliv na zemi a vysoké ceny nafty. Paliva na bázi ethanolu jsou získané z obnovitelných zdrojů jako třeba zemědělských plodin a jejich vedlejších produktů (Mojsov & Kiro, 2012).

Pro produkci ethanolu je využíván jako substrát škrob na základě jeho nízké ceny a dostupnosti na celém světě (Chi et al., 2009). Škrob je přeměněn ve dvou enzymových krocích, jejichž účelem je získání zkvasitelných cukrů. Přeměna škrobu na bioethanol zahrnuje jeho zkapalnění a zcukernatění, kde je škrob přeměněn na cukr za

pomocí enzymů jako jsou α -amylasy. Následuje fermentace, kdy je cukr přeměněn na ethanol za přítomnosti ethanol kvasících mikroorganismů. K tomuto účelu jsou používány kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae* (Chi et al., 2009). Produkce ethanolu za pomoci kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* hraje významnou roli v ekonomice Brazílie (de Moraes et al., 1995).

2. 8. 4. Papírenský a textilní průmysl

α -Amylasy jsou v papírenském průmyslu používány ke změně vlastnosti škrobu, který je součástí papíru. Škrob je přidáván do papíru při teplotách 45 - 60 °C. Viskozita přírodního škrobu je ale příliš vysoká a k její regulaci jsou používány právě α -amylasy (van der Maarel et al., 2002). Papír je tak pokrýván ochranou vrstvou zlepšující jeho fyzikální vlastnosti jako jsou pevnost, tuhost a také gumovatelnost (Gupta et al., 2003).

V textilním průmyslu se využívá α -amylasy jako šetrnějších náhražek namísto chemikálií. α -Amylasy štěpí škrob na dextriny rozpustné ve vodě a mohou být vymyty , a proto jsou k textiliím mnohem šetrnější. Při výrobě textilií jsou přírodní vlákna mechanicky namáhána. Tento jev je nežádoucí a k jeho snížení se vlákna pokrývají škrobovou vrstvou, která materiál zpevní a zároveň chrání před poškozením. Škrobovou vrstvu je po dokončení tkaní nutné odstranit. Pokud by zůstala na tkanině, bělení a barvení tkaniny by nebylo možné. Odstranění škrobové vrstvy je prováděno horkou párou s NaOH, hydroxid však může textilií poškodit, a proto se upřednostňuje použití amylasy (Tsurikova et al., 2002) .

2. 8. 5. Potravinářský průmysl

α -Amylasy jsou ve velké míře využívány v potravinářském průmyslu, zejména při pečení, při výrobě koláčů, ovocných šťáv a sirupů a látek zlepšujících zažívání (Couto & Sanromán 2006).

V pekárenství jsou α -amylasy přidávány do těsta k odbourání škrobu v mouce na menší dextriny, které jsou postupně fermentovány kvasinkami. Dochází tak k zlepšení objemu a struktury produktu a zároveň k rychlejšímu kvašení těsta. Vznikající přidaný cukr v těstě zlepšuje jeho chuť, kvalitu a barvu kůrky produktu. Přídavek α -amylasy do těsta má za následek také udržení čerstvosti pečiva (Sahlstrom & Brathen, 1997). V současné době jsou využívány termostabilní amylasy z rodu *Bacillus*

stearothermophilus. V potravinářství jsou dále amylasy používány k čerění piva a ovocných šťáv (Mareel et al., 2002).

α -Amylasy jsou dále využívány k průmyslové produkci sirupů z glukosy, kdy výroba vychází z hydrolýzy pšeničného, bramborového a kukuřičného škrobu. Škrob byl původně štěpen působením vhodné kyseliny na vodnou suspenzi za zvýšené teploty. Tato metoda je však energeticky náročná a je spojena se vznikem celé řady vedlejších produktů, které musí být odstraněny. Kyselá hydrolýza však byla postupně nahrazena metodou enzymovou, kde nevzniká velké množství vedlejších produktů a může probíhat za mírnějších podmínek (Nielsen & Borchert, 2000).

3. Experimentální část

3. 1 Chemikálie

α -amylasa (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Sigma-Aldrich, Německo
Bromfenolová modř	Lachema (Česká republika)
Coomassie (Brilliant Blue G250)	Serva, Německo
dihydrogenfosforečnan draselný	Sigma-Aldrich, Německo
glycin	Fluka, Švýcarsko
glutaraldehyd 25 %	Fluka, Švýcarsko
hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Německo
hydrogenuhličitan sodný	Merck, Německo
hydroxid sodný	Lachema, ČR
chitosan	Sigma-Aldrich, Německo
2-chloro-4-nitrofenyl-maltotriosid	Sigma-Aldrich, Německo
fosforečnan draselný monohydrát	Sigma-Aldrich, Německo
jodistan sodný	Sigma-Aldrich, Německo
kyselina boritá	Lachema, ČR
kyselina fenylactová	Sigma-Aldrich, Německo
kyselina fosforečná	Lachema, ČR
kyselina octová	Lachema, ČR
magnetické nanočástice	RPTCM
methanol	Lachema, ČR
Perlosa MT 100 (80 - 100 μ m)	Iontosorb (ČR)
Perlosa MT 200 (80 - 100 μ m)	Iontosorb (ČR)

3.2 Přístroje

analytické váhy

digitální předvážky

elektromagnetická míchačka

minitřepačka

pH metr digitální

pipety automatické PIPETMAN® NEO

spektrofotometr Biochrom

rotátor Multi RS-60

termoblok

termostat

vortex SA8

Sartorius, Německo

OHAUS, USA

RCT-Basic IKA, Německo

TTS 2 IKA, Německo

WTW, Německo

Gilson, Francie

Ltd WPA , Velká Británie

Biosan, Lotyšsko

Grand Boekel, USA

Grant, Velká Británie

Stuart Scientific, GB

3. 3 Použité metody

3. 3. 1 Obalení magnetických nanočástic chitosanem

Magnetické nanočástice byly obaleny chitosanem. Navážka 400 mg magnetických nanočástic byla převrstvena 20 ml destilované vody. Po intenzivním protřepání byla suspenze sonifikována po dobu 15 minut. Bylo připraveno 20 ml roztoku 1% chitosanu ve 2% kyselině octové a roztok byl sonifikován do úplného rozpuštění chitosanu. Za intenzivní sonifikace byl k suspenzi částic přikapáván roztok chitosanu. Poté byla směs v sonifikační lázni ponechána 30 minut za občasných protřepání částic na dně. Dále byl připraven roztok 10% NaHCO₃ (250 ml). Tento roztok byl intenzivně míchán na magnetické míchačce. Směs chitosanu s magnetickými nanočásticemi byla postupně velmi pomalu přikapávána do intenzivně míchaného roztoku (nejlépe pipetou kapku po kapce). Po ukončení reakce byly magnetické nanočástice separovány pomocí magnetického pole a 3x promyty destilovanou vodou.

3. 3. 2 Imobilizace α -amylasy na magnetické mikročástice

Jodistanová metoda

Na analytických vahách bylo odváženo 15 mg magnetických mikročástic (MT100 nebo MT 200) do ependorfky. Poté byly mikročástice několikrát promyty destilovanou vodou. Po odstranění vody bylo k magnetickým mikročásticím přidáno 600 μ l 0,1 mmol.l⁻¹ NaIO₄. Směs byla třepána na rotátoru v lednici při 4°C 24 hodin. Po této době byl nenavázaný jodistan odstraněn a magnetické mikročástice byly několikrát promyty 50 mmol.l⁻¹ K-Pi pufrém, pH 6. Pufr byl odstraněn pomocí automatické pipety a k částicím bylo přidáno 200 μ l roztoku α -amylasy a 100 μ l 50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufru, pH 6. Roztok α -amylasy byl připraven rozpuštěním 10 mg α -amylasy v 1 ml 50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufru, pH 6. Tato směs byla třepána na rotátoru v lednici při 4°C 24 hodin. Poté byl odpipetován roztok obsahující nenavázanou α -amylasu a magnetické mikročástice byly několikrát promyty 50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufrém, pH 6 až roztok nevykazoval žádnou zbytkovou aktivitu α -amylasy. Nakonec bylo k mikročásticím přidáno 300 μ l 50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufru, pH 6.

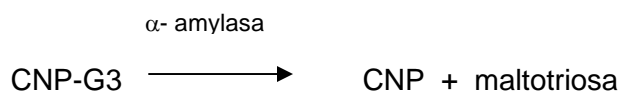
3. 3. 3. Imobilizace α -amylasy na magnetické nanočástice

Glutaraldehydová metoda

15 mg magnetických nanočástic obalených chitosanem bylo 3x promyto v pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufru, pH 6), poté bylo napipetováno 50 μ l 5% glutaraldehydu a částice byly aktivovány 3 hodiny za současného míchání při laboratorní teplotě. Po aktivaci byly magnetické nanočástice separovány, nenavázaný glutaraldehyd byl odstraněn a mikročástice byly 5 x promyty pufr (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr, pH 6). Následně bylo přidáno 200 μ l α -amylasy z *A. oryzae* (10 mg.ml⁻¹), imobilizace probíhala 8 hodin za laboratorní teploty za míchání a 12 hodin při teplotě 4 °C bez míchání. Poté byla odpipetována nenavázaná α -amylasa a magnetické nanočástice byly několikrát promyty 50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr, pH 6 až roztok nevykazoval žádnou zbytkovou aktivitu. Nakonec bylo k nanočásticím přidáno 300 μ l 50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufru, pH 6.

3. 3. 4. Stanovení aktivity volné a imobilizované α -amylasy

Aktivita α -amylasy z *A. oryzae* byla stanovena spektrofotometrickou metodou s použitím umělého substrátu CNP-G3 (2-chloro-4-nitrofenyl-maltotriosid) . α -Amylase katalyzuje hydrolýzu 2-chloro-4-nitrofenyl-maltotriosidu na CNP (2-chloro-4-nitrofenol, ϵ = 15490 l/mol . l⁻¹), který se vyznačuje žlutým zbarvením.



Aktivita volné α -amylasy byla měřena v kyvetě, do které bylo napipetováno 600 μ l pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i, pH 6), 100 μ l substrátu (25 mmol.l⁻¹ CNP-G3) a reakce byla startována přidávkem 100 μ l roztoku α -amylasy (10 mg . ml⁻¹). Bylo zahájeno měření změny absorbance po dobu 4 časových intervalů v délce 1 minuty při λ = 405 nm. Aktivita byla vypočítána ze vztahu $\Delta n / \Delta t = (\Delta A / \Delta t) * (V / \epsilon . l)$, kde $\Delta n / \Delta t$ – aktivita (kat), ΔA - změna absorbance, Δt - časový interval (s), V - celkový objem v kyvetě (l), ϵ - molární absorbní koeficient (pro substrát 15 490 l/mol . l⁻¹), l - délka optické dráhy (cm).

Při měření aktivity imobilizované α -amylasy bylo do kyvety napipetováno 700 μ l pufru (50 mmol.l⁻¹ K-Pi, pH 6) a 100 μ l substrátu (25 mmol.l⁻¹ CNP-G3 v 50 mmol.l⁻¹ K-Pi, pH 6). Reakce byla startována přidávkem 15 mg (ve 100 μ l K-Pi) magnetických mikročástic (MT 100 nebo MT 200) nebo nanočástic s imobilizovanou α -amylasou. Částice byly usazeny na dno kyvety a po 60 sekundách byla změřena změna absorbance, poté byla směs opět promíchána. Byly provedeny tři měření.

3. 3. 5. Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Zásobní roztok Coomassie Brilliant Blue G 250 byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 v 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné a byl doplněn do 100 ml deionizovanou vodou. Poté byl roztok zfiltrován. Jako standardy byly použity roztoky BSA o koncentracích (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5 a 25 μ g .ml⁻¹). Byly stanoveny proteiny v zásobním komerčním roztoku enzymu (40 x zředěný) a v roztoku enzymu po ukončení imobilizace na magnetické mikročástice (MT 100, MT 200) a nanočástice (40 x zředěný roztok). Zkumavky byly promíchány na vortexu a inkubovány po dobu 5 minut pro vyvíjení zbarvení a poté byla proměřena absorbance při 595 nm. Blank obsahoval činidlo a deionizovanou vodu.

3. 3. 6. Stanovení vazebné kapacity

Množství navázané α -amylasy z *A. oryzae* na magnetické mikro- či nanočástice bylo vypočítáno pomocí vztahu:

$$\text{vazebná kapacita} = C_b \times V_b - C_a \times V_a / m_n$$

kde koncentrace proteinů před imobilizací C_b a po imobilizaci C_a je vyjádřena v μ g. μ l⁻¹, objem roztoku V_b a V_a je dán v μ l, m_n je hmotnost pevného nosiče v mg. Obsah proteinů byl stanoven metodou Bradfordovou. Vazebná kapacita byla vyjádřena v μ g proteinu navázaného na 1 mg magnetických částic.

3. 3. 7. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na pH v univerzálním Britton-Robinsonově pufru

Vzorky volné a imobilizované α -amylasy na mikročasticích (MT 100 nebo MT 200) a nanočástice s imobilizovanou amylasou byly inkubovány v Britton-Robinsonově pufru při 11 různých hodnotách pH, a to v rozmezí pH 1,98 až 11,12 po dobu 90 minut. Poté byla měřena aktivita volné a imobilizované α -amylasy v daném pufru (o pH: 1,98; 2,84; 4,22; 4,92; 5,43; 6,02; 6,99; 7,96; 8,90; 9,93; 11,12). Aktivita volné α -amylasy byla měřena v kyvetě, do které bylo napipetováno 600 μ l pufru (50 mmol.l^{-1} K-P_i, pH 6), 100 μ l substrátu (25 mmol.l^{-1} CNP-G3) a reakce byla startována přidavkem 100 μ l roztoku α -amylasy (10 mg . ml^{-1}). Při měření aktivity u imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a nanočasticích byl použit stejný postup, kdy místo 100 μ l volného enzymu byly vloženy magnetické částice (15 mg) a k nim připipetováno 100 μ l pufru. Bylo zahájeno měření změny absorbance po dobu 4 časových intervalů v délce 1 minuty při $\lambda = 405 \text{ nm}$.

3. 3. 8. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na pH v K-P_i pufru

Vzorky volné a imobilizované α -amylasy (MT 100 nebo MT 200) a nanočástice byly inkubovány v K-P_i pufru při 7 různých hodnotách pH, a to v rozmezí pH 5,7 až 8 po dobu 90 minut. Poté byla měřena aktivita volné a imobilizované α -amylasy v daném pufru (při pH: 5,7; 6,0; 6,4; 6,8; 7,2; 7,6; 8,0). Aktivita volné α -amylasy byla měřena v kyvetě, do které bylo napipetováno 600 μ l pufru (50 mmol.l^{-1} K-P_i, pH 6), 100 μ l substrátu (25 mmol.l^{-1} CNP-G3) a reakce byla startována přidavkem 100 μ l roztoku α -amylasy (10 mg . ml^{-1}). Při měření aktivity u imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a nanočasticích byl použit stejný postup, kdy místo 100 μ l volného enzymu byly vloženy magnetické částice (15 mg) a k nim připipetováno 100 μ l pufru. Bylo zahájeno měření změny absorbance po dobu 4 časových intervalů v délce 1 minuty při $\lambda = 405 \text{ nm}$.

3. 3. 9. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na teplotě inkubace

Vzorky volné a imobilizované α -amylasy na mikročasticích (MT 100 nebo MT 200) a nanočasticích v pufru (50 mmol.l^{-1} K- P_i pufr, pH 6) byly nejprve inkubovány při různých teplotách (25, 37, 45, 55, 65, 75, 85 °C) po dobu 30 min. Po ochlazení v ledové lázni byla změřena zbytková aktivita, která byla vztažena k aktivitě α -amylasy při 25 °C. Pro stanovení aktivity bylo použito 600 μl pufru (K- P_i pufr), 100 μl substrátu (25 mmol.l^{-1}) a 100 μl roztoku volné a imobilizované α -amylasy (10 mg.ml^{-1}) v pufru (50 mmol.l^{-1} K- P_i , pH 6) inkubované při různých teplotách. Pro srovnání teplotní stability volné a imobilizované α -amylasy byla určena hodnota T_{50} , což je teplota, při které si enzym zachovává poloviční aktivitu oproti nejvyšší stanovené aktivitě.

3. 3. 10. Stanovení operační stability imobilizované α -amylasy

Magnetické mikro a nanočastice s imobilizovanou α -amylasou byly přeneseny do mikrozkušavky, kde k nim bylo napipetováno 600 μl pufru (50 mmol.l^{-1} K- P_i , pH 6), ve kterém byly magnetické částice uskladněny. Aktivita α -amylasy po prvním měření byla označena jako 100 %. Aktivita α -amylasy imobilizované na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a nanočasticích byla měřena v kyvetě, do které bylo napipetováno 600 μl pufru (50 mmol.l^{-1} K- P_i , pH 6), 100 μl substrátu (25 mmol.l^{-1} CNP-G3) a reakce byla startována přidávkem 100 μl roztoku obsahujícího 15 mg magnetických částic v pufru (50 mmol.l^{-1} K- P_i , pH 6). Bylo zahájeno měření změny absorbance po dobu 4 časových intervalů v délce 1 minuty při $\lambda = 405 \text{ nm}$. Poté byly částice 10 x promyty pufrům (50 mmol.l^{-1} K- P_i , pH 6) a bylo s nimi provedeno stejným způsobem další měření aktivity. Bylo provedeno 10 měření.

3. 3. 11. Stanovení stability volné a imobilizované α -amylasy při skladování

Byla stanovena stabilita při skladování volné a imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a nanočasticích. α -Amylasy byla imobilizována pomocí jodistanu na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a na nanočasticích obalených chitosanem, aktivovaných glutaraldehydem. Vzorky volné a imobilizované α -amylasy byly uskladněny v pufru (50 mmol.l^{-1} K- P_i , pH 6). Byla změřena aktivita vzorků volné a imobilizované amylasy na magnetických mikro a

nanočásticích a vzorky byly uchovávány při 4 °C. Pro stanovení aktivity bylo použito 600 µl pufru (K-Pi pufr), 100 µl substrátu (25 mmol.l⁻¹) a reakce byla startována 100 µl roztoku volné α-amylasy (10 mg.ml⁻¹) v pufru (50 mmol.l⁻¹ K-Pi, pH 6). Při měření aktivity u imobilizované α-amylasy na magnetických mikročásticích (MT 100, MT 200) a nanočásticích byl použit stejný postup, kdy místo 100 µl volného enzymu byly vloženy magnetické částice (15 mg) a k nim připipetováno 100 µl pufru. Bylo zahájeno měření změny absorbance po dobu 4 časových intervalů v délce 1 minuty při λ= 405 nm. Aktivita byla měřena první den. Po 7, 14 a 21 dnech skladování při 4 °C v lednici byla změřena zbytková aktivita u volné a imobilizované α-amylasy.

3. 3. 12. Funkční stabilita α-amylasy

U volné α-amylasy a imobilizované α-amylasy na magnetických mikročásticích (MT 100, MT 200) a nanočásticích byla změřena funkční stabilita enzymu. Volná α-amylasa, mikročástice a nanočástice s navázanou α-amylasou byly přeneseny do zkumavky, poté byla měřena aktivita. Pro stanovení aktivity bylo použito 600 µl pufru (K-Pi pufr), 100 µl substrátu (25 mmol.l⁻¹) a reakce byla startována 100 µl roztoku volné α-amylasy (10 mg.ml⁻¹) v pufru (50 mmol.l⁻¹ K-Pi, pH 6). Při měření aktivity u imobilizované α-amylasy na magnetických mikročásticích (MT 100, MT 200) a nanočásticích byl použit stejný postup, kdy místo 100 µl volného enzymu byly vloženy magnetické částice (15 mg) a k nim připipetováno 100 µl pufru. Bylo zahájeno měření změny absorbance po dobu 4 časových intervalů v délce 1 minuty při λ= 405 nm. Po třech hodinách skladování při laboratorní teplotě (22 °C) byla změřena aktivita u dalšího vzorku imobilizovaného a volného enzymu a tímto způsobem bylo po 48 hodin provedeno šest měření.

3. 3. 13. Stanovení Michaelisovy konstanty (K_m)

Bylo zvoleno 8 různých koncentrací umělého substrátu CNP-G3 (2-chloro-4- nitrofenyl-maltotriosid) v kyvetě (250; 300; 350; 400; 450; 500; 550; 600 µmol.l⁻¹). Podle těchto koncentrací bylo do kyvety přidáváno určité množství substrátu (25 mmol.l⁻¹ CNP-G3). Do kyvety bylo také přidáváno vždy 100 µl volné nebo imobilizované α-amylasy (10 mg.ml⁻¹) v pufru (50 mmol.l⁻¹ K-Pi , pH = 6) a takové množství pufru (50 mmol.l⁻¹ K-Pi , pH = 6), aby výsledný objem kyvety byl 800 µl. Byla změřena změna absorbance vzniklého barevného produktu za 1 minutu. Hodnoty byly použity k sestavení Lineweaver-Burkova grafu závislost 1/A na 1/c substrátu, z jehož

rovnice byla vypočítána Michaelisova konstanta. Za stejných podmínek byla stanovena Michaelisova konstanta i pro imobilizovanou α -amylasu na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a nanočasticích, kdy místo 100 μ l volného enzymu byly vloženy magnetické částice (15 mg) a k nim připipetováno 100 μ l pufru. Bylo zahájeno měření změny absorbance po dobu 4 časových intervalů v délce 1 minuty při $\lambda = 405$ nm.

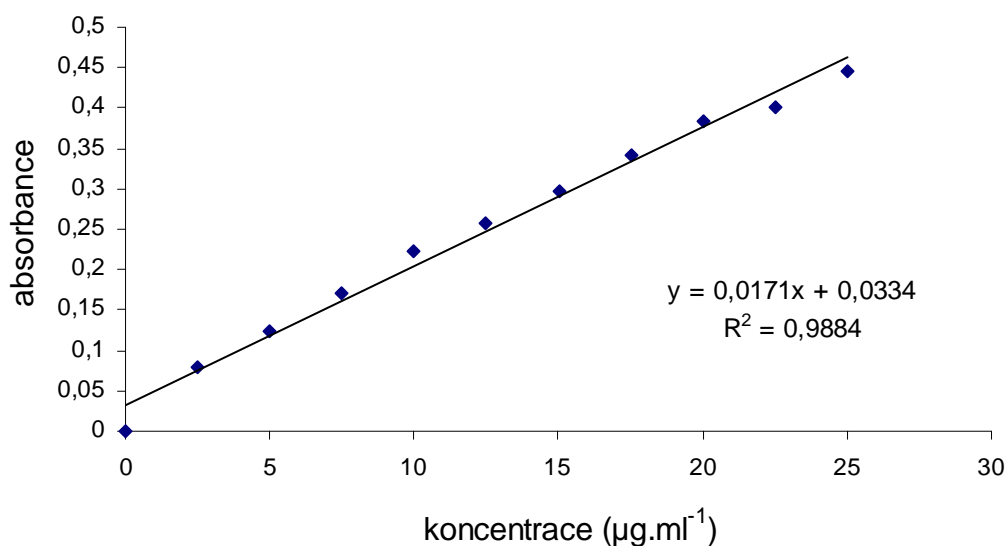
4. Výsledky

4.1 Imobilizace α -amylasy na magnetické částice

α -Amylasy byla imobilizována na magnetické mikročástice (MT 100 nebo MT 200) jodistanovou metodou. Dále byla α -amylasy imobilizována na magnetické nanočástice obalené chitosanem a aktivované glutaraldehydem. Po navázání α -amylasy byly magnetické mikročástice charakterizovány vazebnou kapacitou, teplotní a pH stabilitou, operační stabilitou, stabilitou při skladování, SDS-PAGE elektroforézou a byly stanoveny Michaelisovy konstanty (K_m)

4.2. Stanovení vazebné kapacity

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou Bradfordové. Byla sestrojena kalibrační přímka, která je znázorněna na Obr. 16. Z rovnice lineární regrese bylo vypočítáno množství proteinů ve vzorku. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13.



Obr. 16.: Kalibrační křivka metody Bradfordové standardu BSA (koncentrace 2,5 – 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Koncentrace proteinů před imobilizací = 0,792, po imobilizaci na magnetické mikročástice MT 100 = 0,440; po imobilizaci na magnetické mikročástice MT 200 = 0,380 a po imobilizaci na magnetické nanočástice = 0,308. Hodnoty jsou uvedeny v $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Objem roztoku před a po imobilizaci je 800 μl , m_n je hmotnost pevného nosiče, v našem případě je vztažena na 15 mg. Obsah proteinů byl stanoven metodou Bradfordovou. Vazebná kapacita byla vyjádřena v μg proteinu navázaného na 1 mg magnetických částic. Vazebná kapacita imobilizované α -amylasy je znázorněna v Tab. č.12.

Tab. 12. Stanovení vazebné kapacity pro imobilizovanou α -amylasu.

	α -amylasa na mikročásticích MT 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$	α -amylasa na mikročásticích MT 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$	α -amylasa na nanočásticích $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$
vazebná kapacita α -amylasy	18,8	22,0	25,8

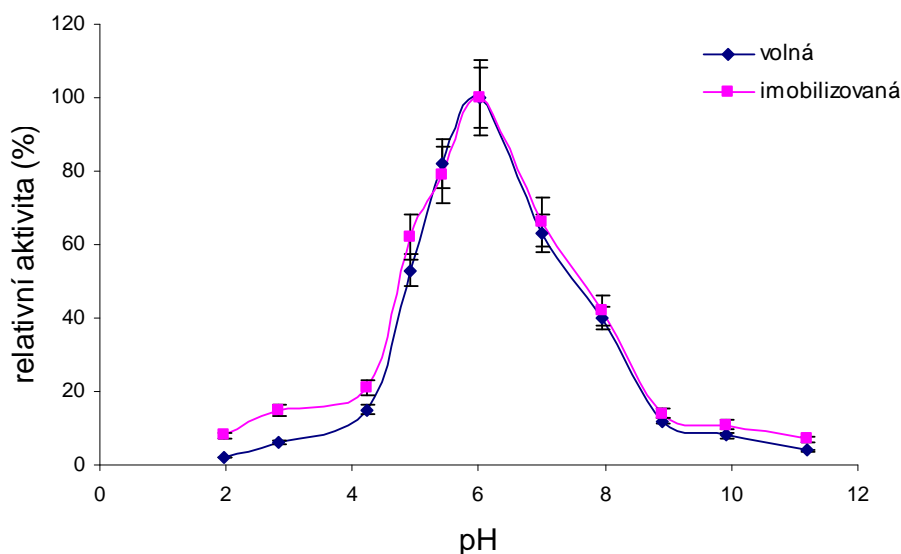
Bylo zjištěno, že vazebná kapacita pro α -amylasu je v případě magnetických mikročástic (MT 100) 18,8 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$. Vazebná kapacita u magnetických mikročástic (MT 200) je 22 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$, a u nanočástic 25,8 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$. Z výsledků lze vyčíst, že vazebná kapacita je u magnetických nanočástic o 15 % vyšší oproti magnetickým mikročásticím (MT 100) a o 27 % vyšší oproti magnetickým mikročásticím (MT 200).

4. 3. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na pH v univerzálním Britton-Robins. pufru

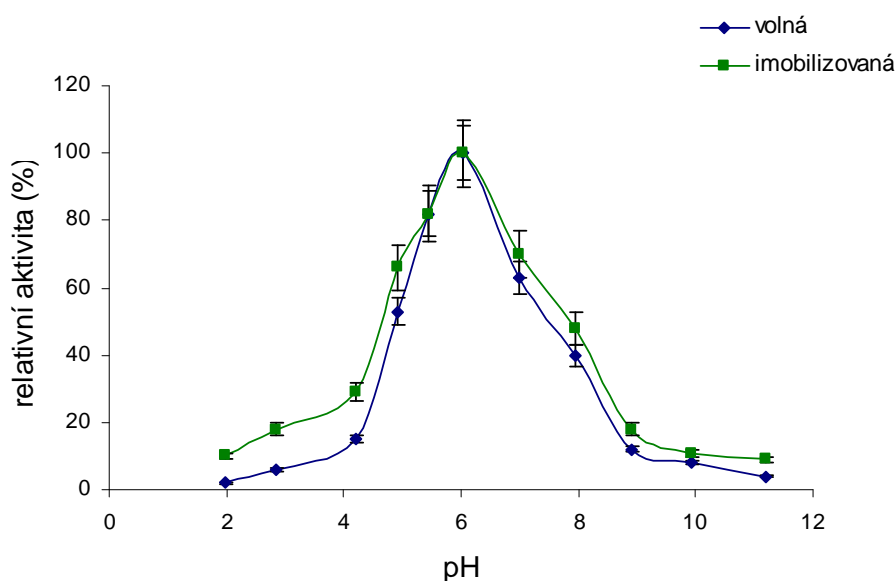
Aktivita α -amylasy byla stanovena spektrofotometrickou metodou s použitím umělého substrátu CNP-G3. Byla měřena aktivita volné α -amylasy a α -amylasy imobilizované na magnetických mikročásticích (MT 100 nebo MT 200) a nanočásticích.

Z naměřených hodnot vyplývá že pH optimum volné i imobilizované α -amylasy je 6. Imobilizovaná amylasa má dále lepší stabilitu při nižších i vyšších hodnotách pH. Z hodnot zobrazených na obrázku 17, 18 a 19 lze zjistit, že v rozmezí pH 1,98 - 4,22

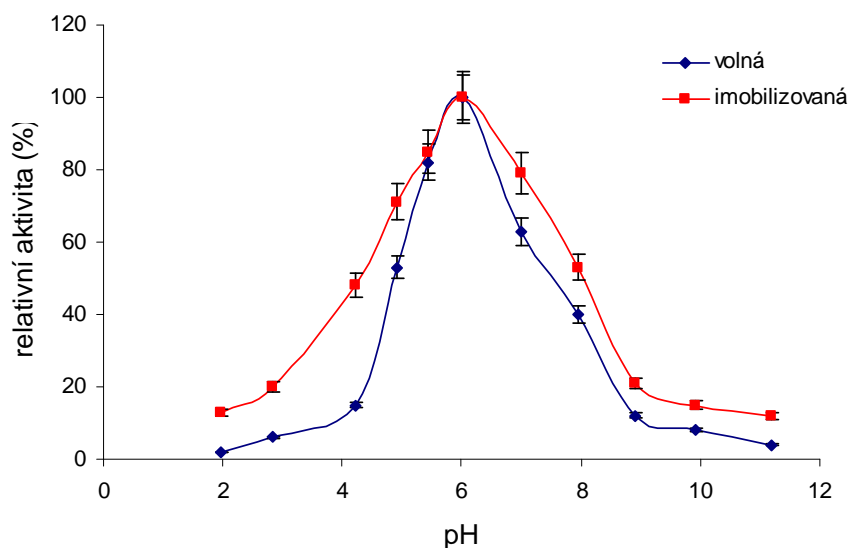
vykazuje imobilizovaná α -amylasa aktivitu vyšší o 21 % (MT 100) , o 35 % (MT 200) a o 58 % (nanočástice) oproti volné α -amylase. Při pH 4,92; 5,43 a 6,99 je aktivita imobilizované amylasy na 69 % (MT 100) , na 73 % (MT 200) a na 78 % (nanočástice), u volné amylasy na 66 %. 100 % aktivitu vykazuje volná i imobilizovaná α -amylasa při pH 6. Při vyšším pH v rozmezí 7,96 - 11,12 je stabilnější opět imobilizovaná α -amylasa, která v tomto rozmezí pH vykazuje aktivitu vyšší o 10 % (MT 100), o 22 % (MT 200) a o 37 % (nanočástice).



Obr. 17.: Graf závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na magnetických mikročásticích (MT 100) na pH v Britton-Robins. pufru. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α - amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických mikročásticích (MT 100) jodistanovou metodou. Měření bylo prováděno v prostředí Britton-Robinsonových pufrů v rozsahu pH 1,98 až 11,12. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.



Obr. 18.: Graf závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 200) na pH v Britton-Robins. pufru. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických mikročasticích (MT 200) jodistanovou metodou. Měření bylo prováděno v prostředí Britton-Robinsonových pufrů v rozsahu pH 1,98 až 11,12. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.

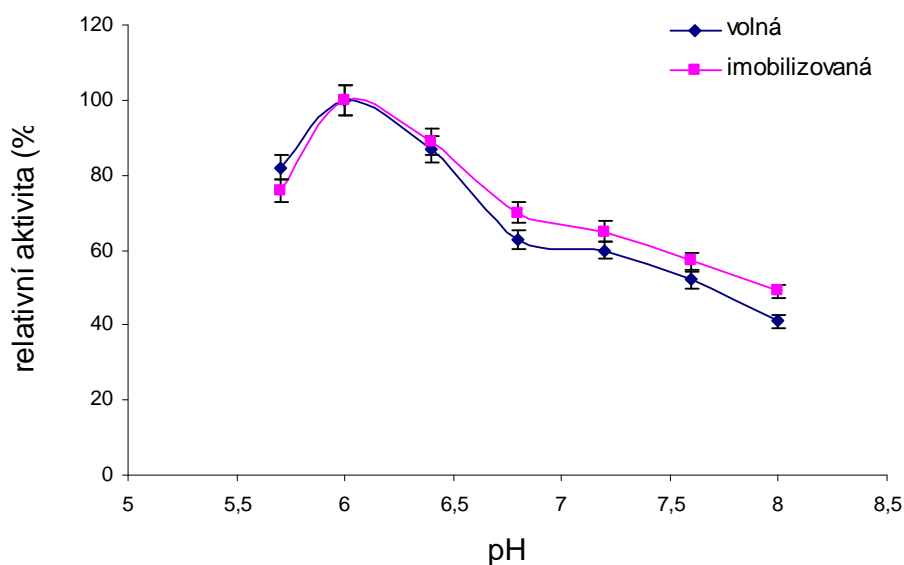


Obr. 19.: Graf závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na magnetických nanočasticích na pH v Britton-Robins. pufru. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických nanočasticích obalených chitosanem, aktivovaných glutaraldehydem. Měření bylo prováděno v prostředí Britton-Robinsonových pufrů v rozsahu pH 1,98 až 11,12. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.

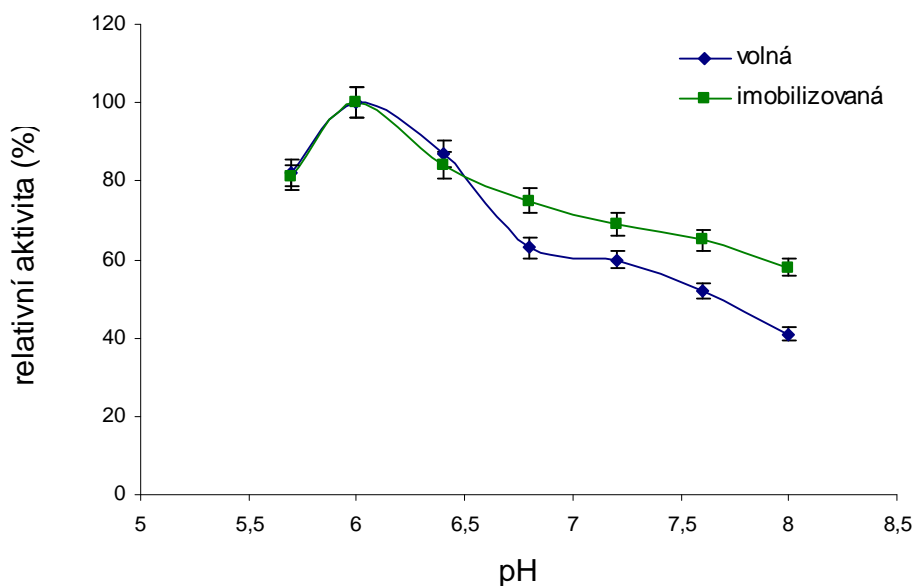
4. 4. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na pH v K-P_i pufru

Aktivita α -amylasy byla stanovena spektrofotometrickou metodou s použitím umělého substrátu CNP-G3. Byla měřena aktivita volné α -amylasy z *A. oryzae* a α -amylasy z *A. oryzae* imobilizované na magnetické mikročástice (MT 100 nebo MT 200) a nanočástice.

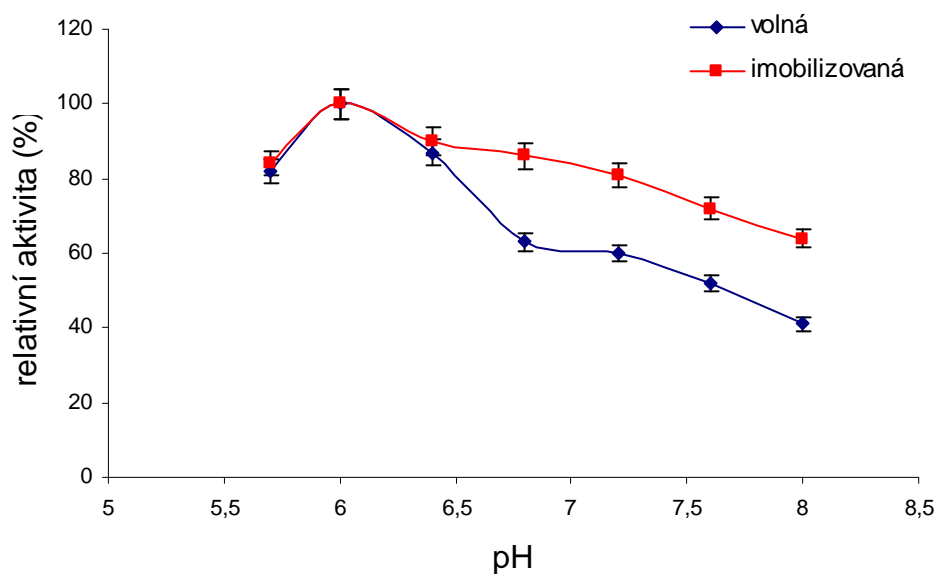
Z naměřených hodnot vyplývá, že pH optimum volné i imobilizované α -amylasy je 6. Imobilizovaná amylasa má dále lepší stabilitu při nižších i vyšších hodnotách pH. Z hodnot zobrazených na obrázku 20, 21 a 22 lze zjistit, že nejvyšší aktivitu vykazuje volná i imobilizovaná α -amylasa při pH 6. Dále můžeme sledovat, že se zvyšováním až k hodnotě pH 8, se aktivita volné amylasy snížila o 59 %. U imobilizované α -amylasy na magnetické mikročástice došlo ke snížení o 51% u mikročástic MT 100 a o 42 % u mikročástic MT 200. V případě magnetických nanočástic se aktivita při přechodu do alkalické oblasti snížila o 36 %.



Obr. 20.: Graf závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na magnetických mikročásticích (MT 100) na pH v K-P_i pufru. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických mikročásticích (MT 200) jodistanovou metodou. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr) v rozsahu pH 5,7 až 8. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.



Obr. 21.: Graf závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 200) na pH v K-Pi pufru. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických mikročasticích (MT 200) jodistanovou metodou. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr) v rozsahu pH 5,7 až 8. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.



Obr. 22.: Graf závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na magnetických nanočasticích na pH v K-Pi pufru. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických nanočasticích potažených chitosanem, aktivovaných glutaraldehydem. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr) v rozsahu pH 5,7 až 8. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.

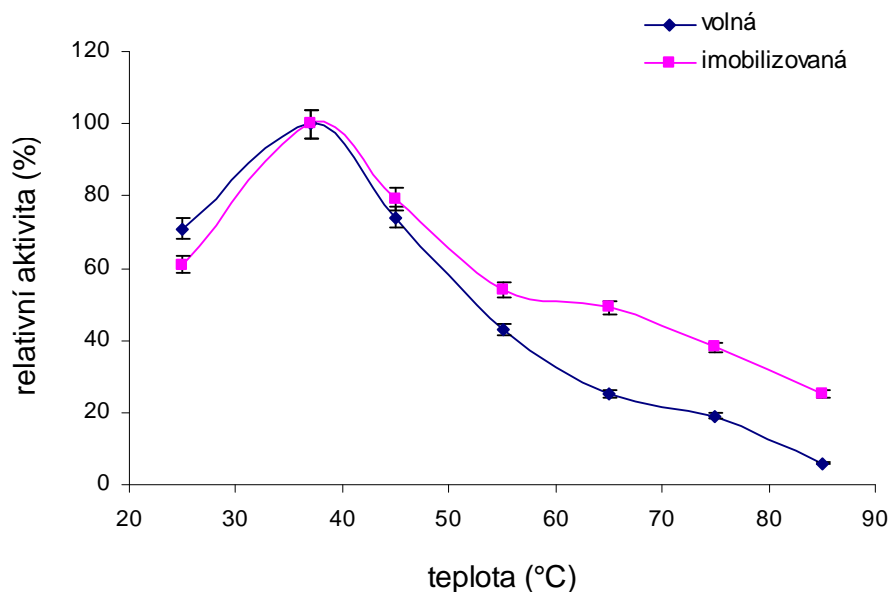
4. 5. Stanovení závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na teplotě inkubace

U imobilizované amylasy na mikročasticích (MT 100 nebo MT 200), na nanočasticích a volné α -amylasy byla změřena teplotní stabilita. Z naměřených hodnot je patrné, že imobilizovaný enzym se vyznačuje lepší teplotní stabilitou než volná α -amylasa. Z výsledků uvedených na obrázcích 23, 24 a 25 můžeme říci, že optimální teplota pro volnou i imobilizovanou α -amylasu je v rozmezí 27-37°C. Při vyšších teplotách byly u imobilizované α -amylasy naměřeny vyšší hodnoty aktivit oproti volné α -amylase. Zejména při teplotách nad 65 °C, kdy je aktivita volné amylasy značně nižší oproti amylase imobilizované na mikročasticích. Mikročastice MT 100 vykazují oproti volné amylase při teplotě 85°C o 19 % vyšší aktivitu. U α -amylasy imobilizované na mikročastice MT 200 je aktivita při 85°C dokonce vyšší o 29 %. α -Amylasy imobilizovaná na magnetických nanočasticích obalených chitosanem má při 85 °C aktivitu vyšší o 35 %. Pro srovnání teplotní stability volné a imobilizované α -amylasy byla určena hodnota T_{50} , což je teplota, při které si enzym zachovává poloviční aktivitu oproti nejvyšší stanovené aktivitě (Tab. 13).

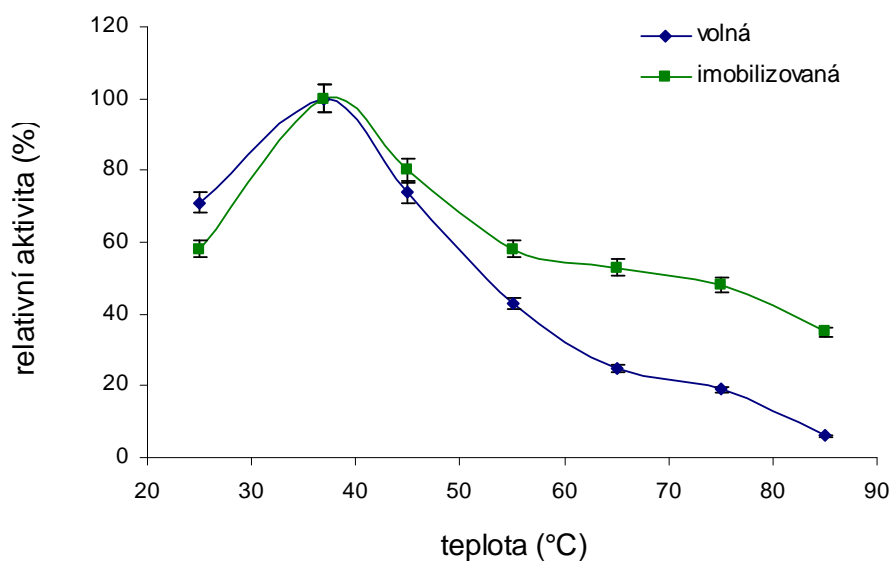
Tab. 13.: Hodnoty T_{50} volné α -amylasy a α -amylasy imobilizované na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a nanočasticích.

	volná α -amylasa	imobilizovaná α -amylasa na mikročasticích MT 100	imobilizovaná α -amylasa na mikročasticích MT 100	imobilizovaná α -amylasa na nanočasticích
T_{50}	60 (°C)	65 (°C)	70 (°C)	73 (°C)

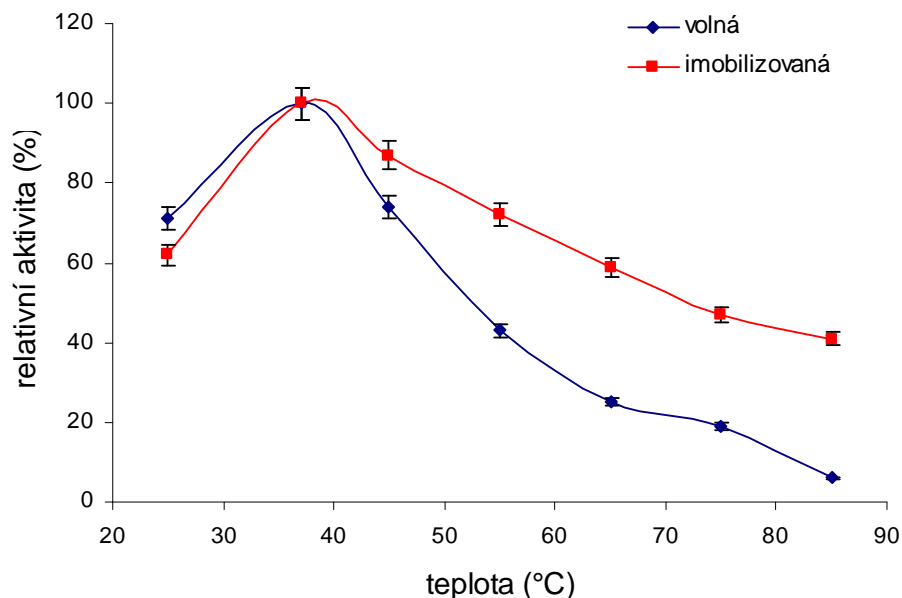
Z výsledků vyplývá, že teplotní stabilita se imobilizací α -amylasy na magnetické mikročastice (MT 100, MT 200) a nanočastice zvýšila.



Obr. 23.: Graf závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 100) na teplotě inkubace. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických mikročasticích (MT 100) jodistanovou metodou. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr, pH 6). Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.



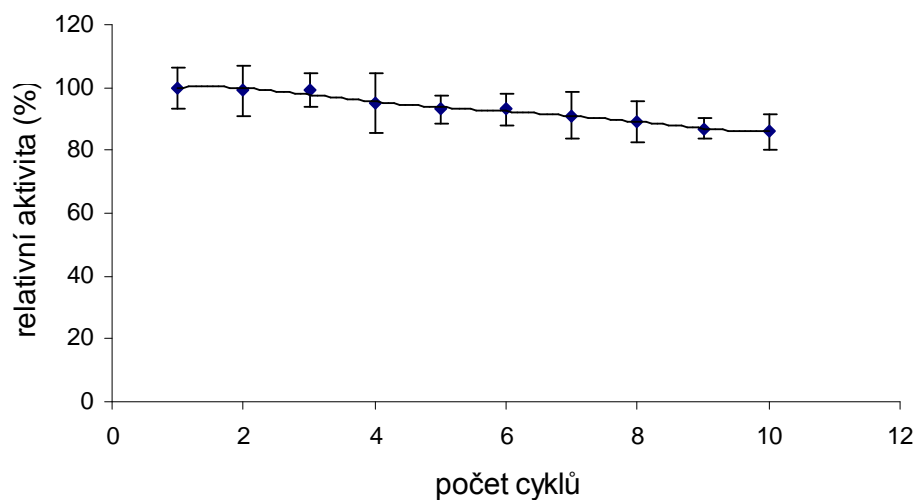
Obr. 24.: Graf závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 200) na teplotě inkubace. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických mikročasticích (MT 200) jodistanovou metodou. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr, pH 6). Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.



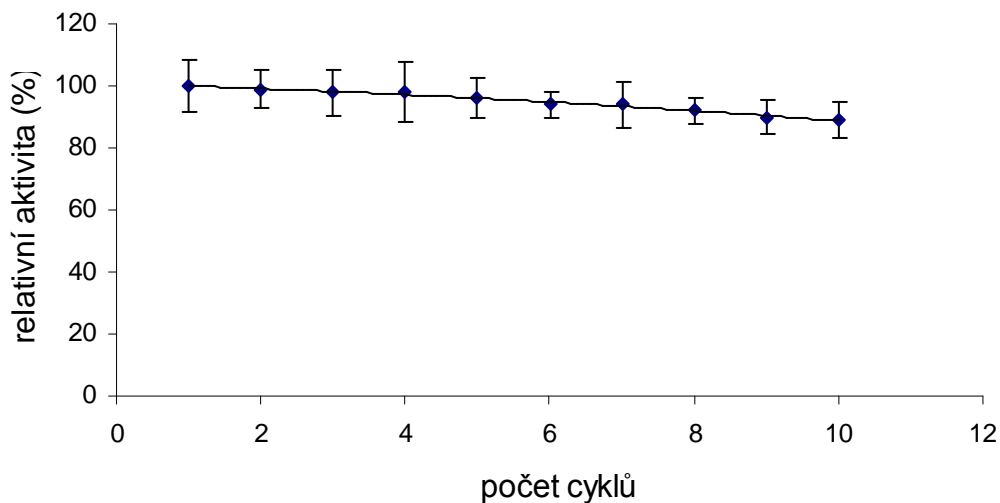
Obr. 25.: Graf závislosti aktivity volné a imobilizované α -amylasy na magnetických nanočásticích na teplotě inkubace. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických nanočásticích potažených chitosanem, aktivovaných glutaraldehydem. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ K-Pi pufr, pH 6). Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.

4. 6. Stanovení operační stability imobilizované α -amylasy

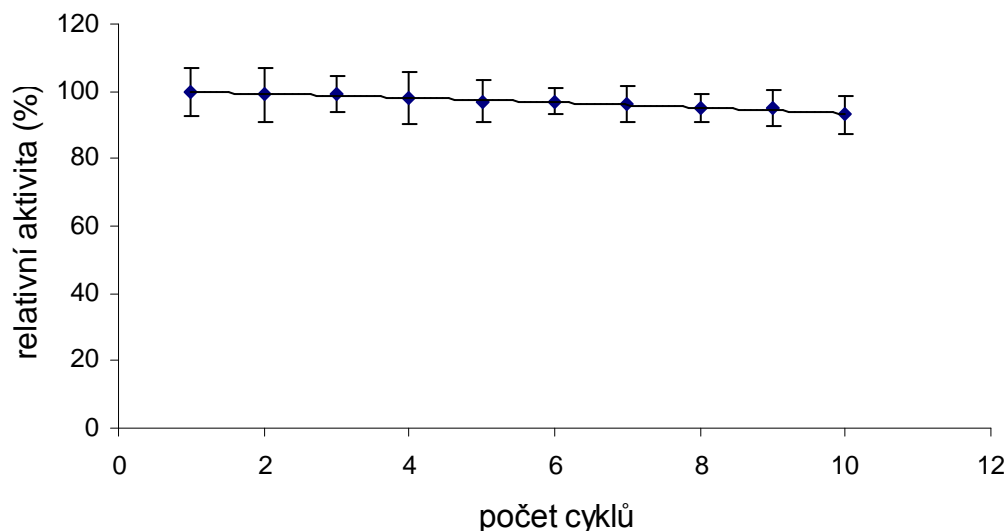
U imobilizované α -amylasy na magnetických mikročásticích (MT 100 nebo MT 200) a nanočásticích byla změřena zbytková aktivita po jednotlivých cyklech podle výše uvedeného postupu. Operační stabilita imobilizované α -amylasy na mikročásticích (MT 100) je znázorněna na obrázku 26. Po proběhnutí 10 cyklů měření aktivity α -amylasy došlo ke snížení aktivity enzymu na magnetických mikročásticích o 14 %. Operační stabilita imobilizované α -amylasy na mikročásticích (MT 200) je znázorněna na obrázku 27. Z uvedeného grafu je patrné, že u enzymu imobilizovaného na mikročásticích (MT 200) se aktivita enzymu po proběhnutí 10 cyklů snížila o 11 %. V případě magnetických nanočástic obalených chitosanem se aktivita α -amylasy po proběhnutí 10 cyklů snížila pouze o 7 %, což je znázorněno na obrázku č. 28. Z uvedených grafů je patrné, že enzym imobilizovaný na mikročásticích (MT 100, MT 200) a na magnetických nanočásticích lze používat opakovaně.



Obr. 26. Graf závislosti operační stability imobilizované α -amylasy (MT 100) na počtu provedených cyklů . Byla použita α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná jodistanovou metodou na mikročástečích. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l^{-1} K- P_i pufr, pH 6). S imobilizovaným enzymem bylo provedeno 10 cyklů. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.



Obr. 27.: Graf závislosti operační stability imobilizované α -amylasy (MT 200) na počtu provedených cyklů. Byla použita α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná jodistanovou metodou na mikročástečích. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l^{-1} K- P_i pufr, pH 6). S imobilizovaným enzymem bylo provedeno 10 cyklů. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.

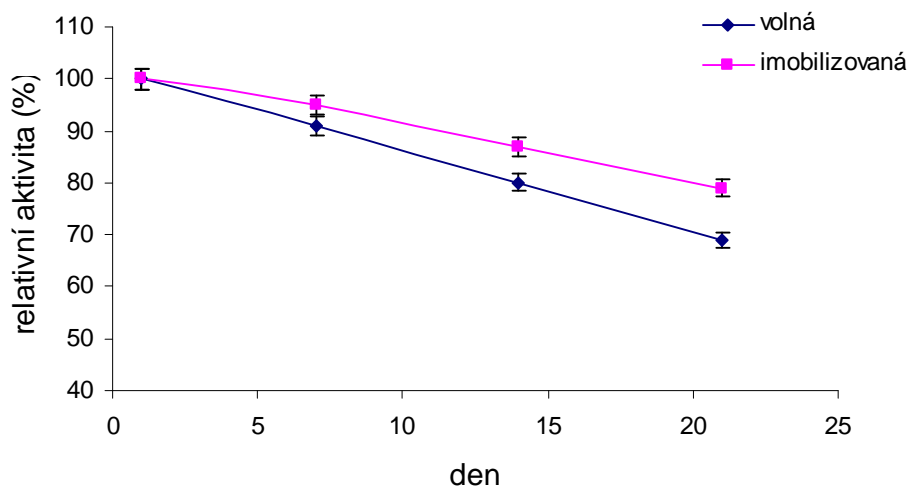


Obr. 28.: Graf závislosti operační stability imobilizované α -amylasy na magnetických nanočásticích na počtu provedených cyklů. Byla použita α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetické nanočástice potažené chitosanem, aktivované glutaraldehydem. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr, pH 6). S imobilizovaným enzymem bylo provedeno 10 cyklů. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.

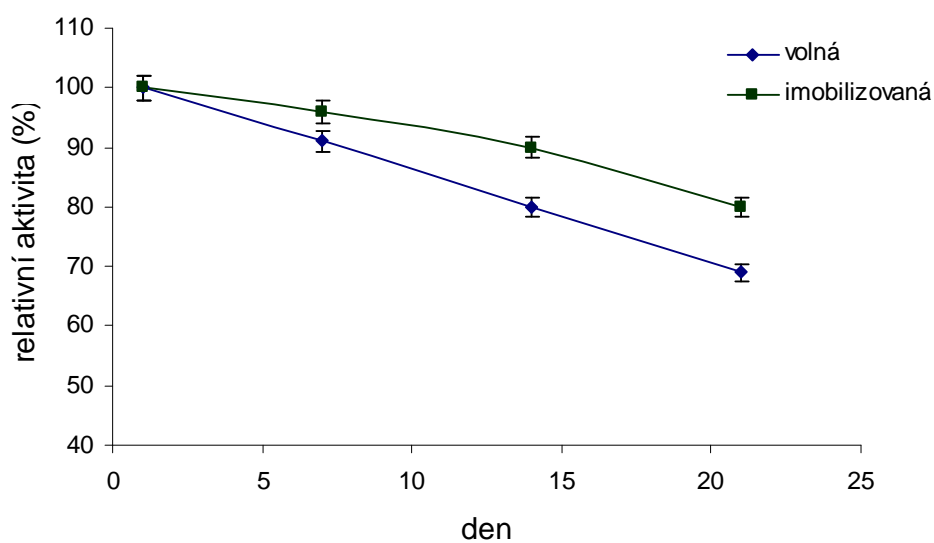
4. 7. Stanovení stability volné a imobilizované α -amylasy při skladování

Byla stanovena stabilita při skladování volné a imobilizované α -amylasy na magnetických mikročásticích (MT 100, MT 200) a nanočásticích.

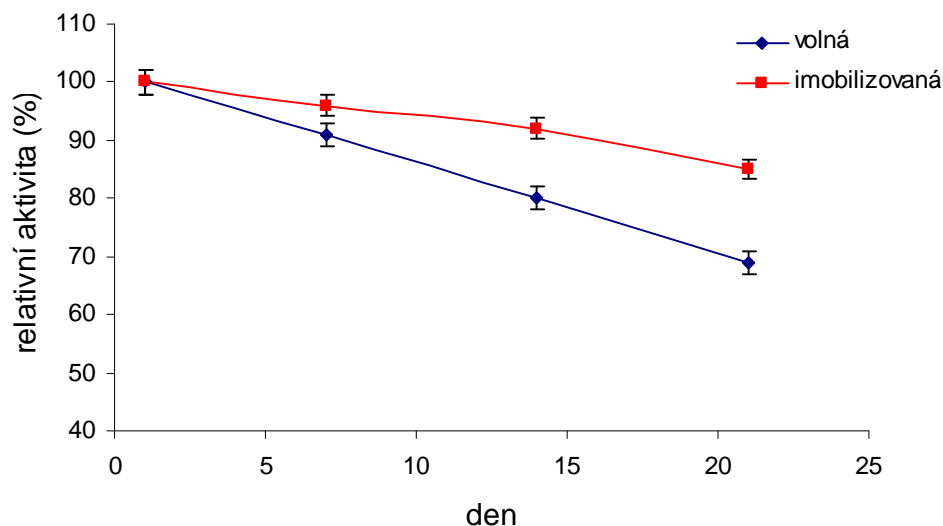
Z naměřených výsledků uvedených na obrázku 29, 30 a 31 lze vyčíst, že α -amylasa imobilizovaná na magnetické částice má vyšší stabilitu při skladování. Aktivita volné α -amylasy se snižuje v rozmezí 3 týdnů (měřeno první, sedmý, čtrnáctý a jednadvacátý den) v průměru o 10 %. U imobilizované α -amylasy na magnetické mikročástice (MT 100) bylo snížení aktivity ve stejném časovém rozmezí pouze o 7%, ke stejnému snížení došlo také v případě magnetických mikročástic (MT 200). U magnetických nanočástic se aktivita α -amylasy v rozmezí tří týdnů snížila o 5 %.



Obr. 29.: Graf závislosti aktivity imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 100) na době skladování. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických mikročasticích (MT 100) jodistanovou metodou. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr, pH 6) první, sedmý, čtrnáctý a jednadvacátý den. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.



Obr. 30.: Graf závislosti aktivity imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 200) na době skladování. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná na magnetických mikročasticích (MT 200) jodistanovou metodou. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr, pH 6) první, sedmý, čtrnáctý a jednadvacátý den. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.



Obr. 31.: Graf závislosti aktivity imobilizované α -amylasy na magnetických nanočásticích na době skladování. Byla použita α -amylasa ve volné formě a α -amylasa imobilizovaná na magnetické nanočástice potažené chitosanem, aktivované glutaraldehydem. Měření bylo prováděno v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ K-P_i pufr, pH 6) první, sedmý, čtrnáctý a jednadvacátý den. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.

4. 8. Funkční stabilita α -amylasy

U volné α -amylasy a imobilizované α -amylasy na magnetických mikročásticích (MT 100, MT 200) a nanočásticích byla změřena funkční stabilita enzymu. α -Amylasy byla skladována 72 hodin při laboratorní teplotě a poté byla měřena aktivita.

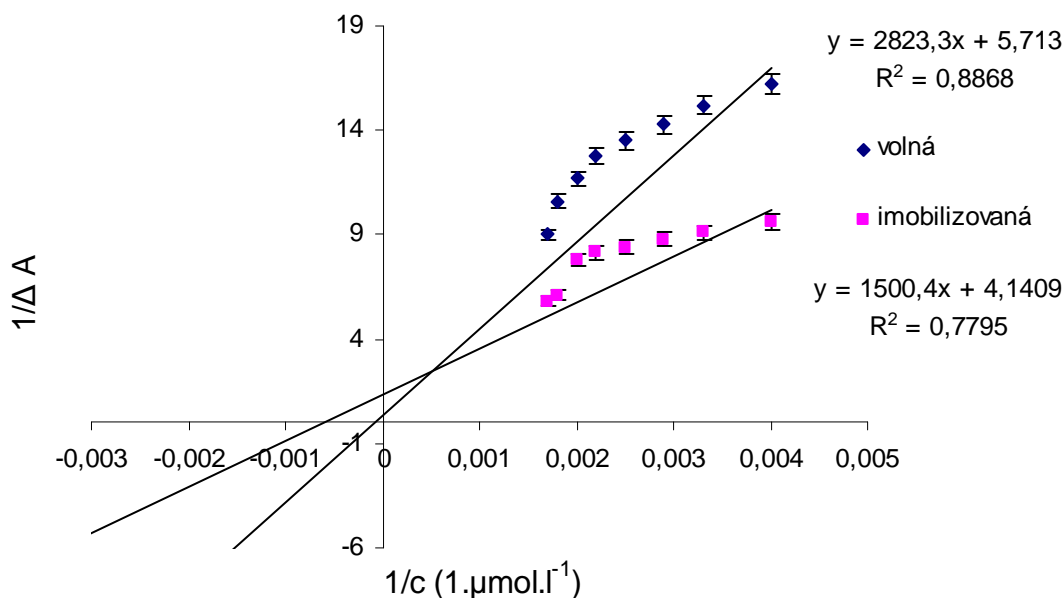
Z výsledků vyplývá, že měření funkční stability enzymu nemělo na aktivitu volné a imobilizované α -amylasy žádný vliv. α -Amylasy si po 72 hodinách skladování udržela 100 % své původní aktivity. Proto je možné krátkodobě skladovat amylasu při laboratorní teplotě bez většího ovlivnění její aktivity.

4. 9. Stanovení Michaelisovy konstanty (K_m)

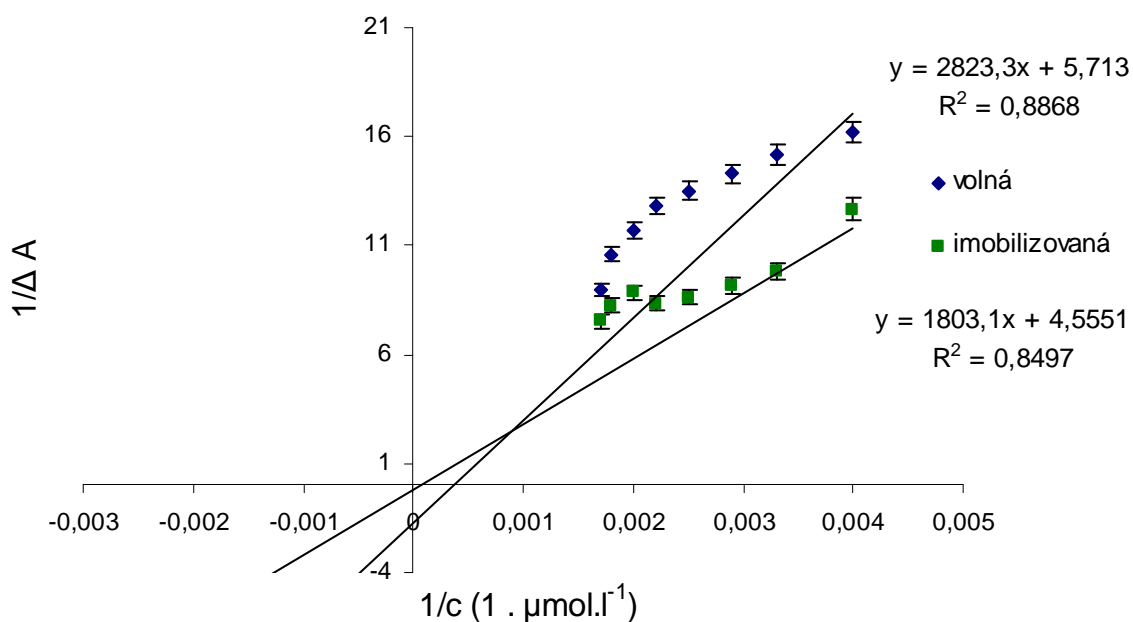
U volné a imobilizované amylasy z *Aspergillus oryzae* byla stanovena hodnota Michaelisovy konstanty K_m , aby se zjistilo, zda po imobilizaci amylasy na magnetické mikročástice (MT100 nebo MT 200) a nanočástice dojde zlepšení afinity amylasy k umělému substrátu. Byla sestrojena závislost $1/\Delta A_{405}$ proti $1/[S]$. Po zvolení $y = 0$ bylo z rovnice regrese spočítáno x a ze vztahu $x = -1/K_m$ spočítána Michaelisova

konstanta (K_m). Graf závislosti $1/\Delta A$ na $1/c$ a rovnice regrese pro volnou a imobilizovanou amylasu jsou zobrazeny na Obr. 32, 33 a 34.

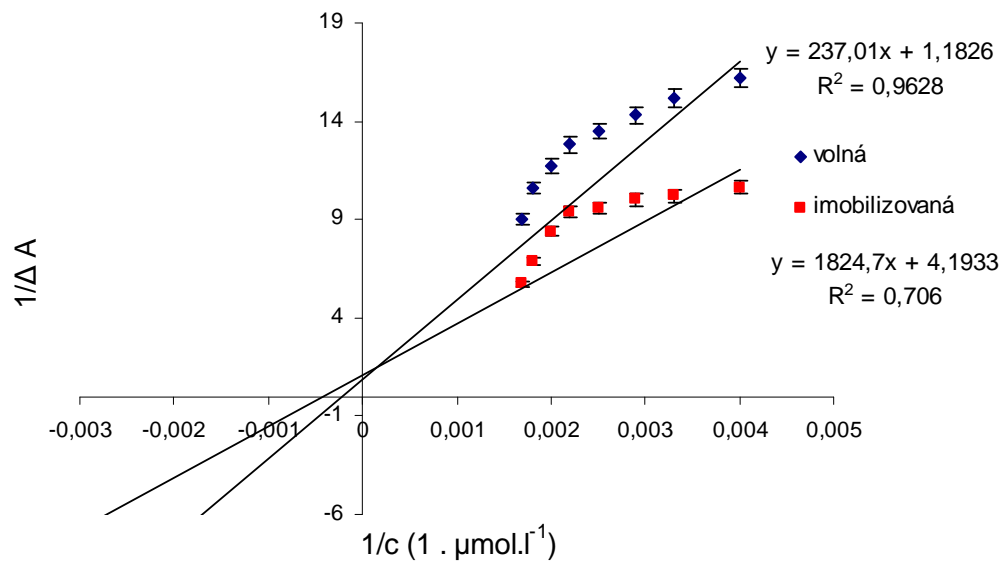
Hodnoty Michaelisovy konstanty pro volnou a imobilizovanou α -amylasu jsou uvedeny v tabulce 14. Afinity enzymu k substrátu byla u imobilizované α -amylasy na magnetické mikročástice (MT 100) mírně vyšší než při imobilizaci na magnetické mikročástice (MT 200). Naopak u imobilizované α -amylasy na magnetické nanočástice byla afinita nižší oproti mikročásticím (MT 100) o 17 % a oproti mikročásticím (MT 200) o 9 %. Avšak v porovnání s volným enzymem se afinita enzymu k substrátu u α -amylasy imobilizované na magnetické mikročástice a nanočástice zvýšila.



Obr.32.: Stanovení K_m pro umělý substrát CNP-G3 u α -amylasy imobilizované na magnetických mikročásticích (MT 100). Aktivita volné a imobilizované α -amylasy (MT 100) z *Aspergillus oryzae* byla měřena pomocí umělého substrátu CNP-G3 v pufru ($50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, K-P_i, pH = 6) při laboratorní teplotě. Byla zaznamenána změna absorbance při 405 nm za 1 minutu. Vyhodnocení podle Lineweaver-Burka. $1/c$ je převrácená hodnota koncentrace substrátu v reakční směsi. Konečné koncentrace substrátů byly v rozmezí 250; 300; 350; 400; 450; 500; 550; 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.



Obr.33.: Stanovení K_m pro umělý substrát CNP-G3 u α -amylasy imobilizované na magnetických mikročasticích (MT 200). Aktivita volné a imobilizované α -amylasy (MT 200) z *Aspergillus oryzae* byla měřena pomocí umělého substrátu CNP-G3 v pufru (50 mmol.l^{-1} , K-P_i, pH = 6) při laboratorní teplotě. Byla zaznamenána změna absorbance při 405 nm za 1 minutu. Vyhodnocení podle Lineweaver-Burka. $1/c$ je převrácená hodnota koncentrace substrátu v reakční směsi. Konečné koncentrace substrátů byly v rozmezí 250; 300; 350; 400; 450; 500; 550; 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.



Obr.34.: Stanovení K_m pro umělý substrát CNP-G3 u α -amylasy imobilizované na magnetických nanočásticích. Aktivita volné a imobilizované α -amylasy na magnetických nanočásticích potažených chitosanem, aktivovaných glutaraldehydem z *Aspergillus oryzae* byla měřena pomocí umělého substrátu CNP-G3 v pufru (50 mmol.l^{-1} , K-Pi, pH = 6) při laboratorní teplotě. Byla zaznamenána změna absorbance při 405 nm za 1 minutu. Vyhodnocení podle Lineweaver-Burka. $1/c$ je převrácená hodnota koncentrace substrátu v reakční směsi. Konečné koncentrace substrátů byly v rozmezí 250; 300; 350; 400; 450; 500; 550; 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Aktivita byla získána průměrem ze tří měření.

Tab. 14. Hodnoty K_m pro volnou a imobilizovanou amylasu (MT 100 nebo MT 200) a nanočástice.

α -amylasa	K_m (mmol.l^{-1})
volná	$0,494 \pm 0,014$
imobilizovaná na mikročástice (MT 100)	$0,362 \pm 0,025$
imobilizovaná na mikročástice (MT 200)	$0,396 \pm 0,035$
imobilizovaná na nanočástice	$0,435 \pm 0,028$

5. Diskuze

V práci bylo prováděno stanovení aktivity α -amylasy z *Aspergillus oryzae* spektrofotometricky za použití umělého substrátu 1,4- α -D-4-nitrophenylmaltoheptaosidu, kdy produktem enzymové reakce je 4-nitrophenol, jež má absorpční maximum při 405 nm. Stanovení aktivity α -amylasy pomocí derivátů oligosacharidů je v současnosti nejvíce používaná metoda. Na jednom konci řetězce je vázaný 4-nitrofenol a neredukující konec může být volný či blokový určitou skupinou (4,6-ethyliden, 3-ketobutyliden, silyl, benzyliden), které zabraňují degradaci substrátu. Jedná se o syntetické substráty odvozené od maltosy - nejčastěji maltotetraosid, maltopentaosid, maltohexaosid, maltoheptaosid (Lorentz, 2000). Hydrolytickým působením α -amylasy na chromogenní substrát, 1,4- α -D-4-nitrophenylmaltoheptaosid (CNP-G3), vznikají kratší sacharidy s vázaným *p*-nitrofenolem (Rauscher et al., 1997). Nevýhodou těchto metod je, že syntetické substráty jsou poměrně drahé. V práci byla α -amylasa imobilizována na magnetické mikročástice (MT 100 nebo MT 200) jodistanovou metodou. Dále byla α -amylasa imobilizována na magnetické nanočástice potažené chitosanem aktivované glutaraldehydem. Byla porovnávána imobilizace amylasy na magnetické mikročástice (MT 100 nebo MT 200) a nanočástice při stejné hmotnosti použitých částic a stejné koncentraci zásobního roztoku enzymu. Při srovnání magnetických mikročástic (MT 100 nebo MT 200 -stejná firma) nedošlo mezi nimi k výraznému zvýšení či snížení účinnosti imobilizace, která by byla ovlivněna odlišnými vlastnostmi částic, zejména porositou částic. U magnetických nanočástic byla účinnost imobilizace nepatrně vyšší oproti magnetickým mikročásticím, jelikož nanočástice mají oproti mikročásticím větší povrch pro imobilizaci enzymu. α -Amylasy byla imobilizována na řadu nosičů. Účinnost imobilizace byla poměrně vysoká v případě imobilizace α -amylasy z *Bacillus* sp. na magnetické mikročástice polyhydroxyethylmethakrylátu (Bryjak et al., 2003). V případě imobilizace α -amylasy ze stejného kmene na Ca^{2+} -alginátové gelové kapsle se účinnost imobilizace α -amylasy také zvýšila (Konsoula et al., 2006). Nižší hodnoty byly zaznamenány při imobilizaci α -amylasy z *A. oryzae* na membránu s poly(ethylenglykoldimethakrylát-*n*-vinyimidazolem) s vázaným Ca^{2+} (Kara et al., 2005).

Určení Michaelisovy konstanty bylo vyhodnoceno podle Lineweaver-Burka. Byl sestaven graf závislosti $1/\Delta A$ na $1/c$, jak pro volný, tak i pro imobilizovaný enzym. Hodnota K_m se po imobilizaci snížila téměř o 100 μmol , lze tedy konstatovat, že afinita enzymu k umělému substrátu se v případě imobilizace na magnetické mikročástice (MT 100, MT 200) a nanočástice zvýšila. Ve většině případů imobilizace amylasy (Tümtürk et al., 2000, Tripathi et al., 2007) však došlo ke zvýšení Michaelisovy

konstanty po imobilizaci α -amylasy, což vedlo ke snížení afinity enzymu k substrátu. Tento fakt může být způsoben difúzním omezením pro substrát, sterickým bráněním nerozpustného nosiče či ztrátou enzymové flexibility, jež je důležitá k vazbě substrátu do aktivního místa. Publikované hodnoty K_m pro α -amylasu imobilizovanou na různých nosičích se v různých člancích liší. Byly naměřeny hodnoty K_m 0,420 mmol.l⁻¹ (Asther et al., 1999); 0,285 mmol.l⁻¹ (Vaseekaran et al., 2010) a 0,600 mmol.l⁻¹ (Nagwa et al., 2011). Hodnoty K_m 0,362 mmol.l⁻¹ pro imobilizovanou α -amylasu (MT 100); 0,396 mmol.l⁻¹ pro imobilizovanou α -amylasu (MT 200) a 0,435 mmol.l⁻¹ pro imobilizovanou α -amylasu na magnetických nanočásticích tak výrazně nevybočují od publikovaných hodnot jiných imobilizovaných α -amylas, ale v porovnání s volnou amylasou se afinita zvyšuje.

Schopnost enzymu udržení se na nosiči a stabilita jsou také součástí charakteristiky imobilizovaného enzymu. Pro zjištění těchto vlastností byla měřena skladovací stabilita α -amylasy. Volná i imobilizovaná α -amylasa z *Aspergillus oryzae* byla skladována po dobu jednadvaceti dní. Po této době si volná amylasa zachovala 69 % původní aktivity. α -Amylasy imobilizovaná na magnetických mikročásticích (MT 100) si zachovala 79 % původní aktivity. α -Amylasy imobilizovaná na magnetických mikročásticích (MT 200) si zachovala 80 % původní aktivity a α -amylasy imobilizovaná na magnetických nanočásticích si zachovala 85 % původní aktivity. Při imobilizaci např. amylasy z *Bacillus sp.* na akrylové částice aktivované glutaraldehydem si amylasy na částicích zachovaly 80 % aktivity po 30 dnech (Bryjak et al., 2003). Dále byla amylasy skladována 72 hodin při laboratorní teplotě a poté byla měřena aktivita. Měření funkční stability enzymu nemělo na aktivitu volné a imobilizované α -amylasy žádný vliv. α -Amylasy si po 72 hodinách skladování udržela 100 % své původní aktivity. Proto je možné krátkodobě skladovat amylasy při laboratorní teplotě bez většího ovlivnění její aktivity. Funkční stabilita se výrazně nemění i v jiných publikovaných zdrojích, například v případě imobilizace α -amylasy z *V. radiata* na chitosanové nanočástice (Tripathi et al., 2007) a u α -amylasy z *G.stearothermophilus* imobilizované na mikročástice PVA (Konieczna-Molenda et al., 2009).

Pro zjištění, zda dojde ke zlepšení stability imobilizací α -amylasy, byla α -amylasy vystavena různým hodnotám pH a teplotě. Pro stanovení závislosti α -amylasy na různém pH prostředí nedošlo u imobilizované α -amylasy vůči volné formě k posunutí pH optima enzymu, obě formy enzymu si zachovaly pH optimum při hodnotě pH 6. Od tohoto pH aktivita enzymu na obě strany klesá a téměř nulové aktivity dosáhne enzym v kyselé oblasti při pH nižším než 1,98, a v bazické oblasti při pH 11,12. Při hodnotách pH v rozmezí 1,98 - 2,84 docházelo k denaturaci enzymu a substrát nebyl dokonale rozpuštěn. Byla napsána řada článků, které uvádějí rozdílné

pH vhodné pro optimální fungování a produkci α -amylasy v závislosti na druhu, který α -amylasu produkuje. Studie odhalily, že amylasy z mikroorganismů potřebují lehce kyselé pH a amylasy získané z bakterií jsou aktivní spíše v neutrální oblasti pH (Fogarty 1983). Mikroorganismy rodu *Aspergillus* jako *A. oryzae*, *A. ficuum*, *A. niger* a *A. niger* dávaly významné výnosy amylasy v rozmezí pH 5-6 (Carlsen et al., 1993). α -Amylasy produkované kvasinkami jako *Saccharomyces cerevisiae* a *S. kluyveri* vykazovaly maximum enzymové produkce při pH 5 (Knox et al., 2004). Bakteriální kultury jako *B. subtilis*, *B. licheniformis*, a *B. amyloliquefaciens* požadovaly počáteční pH 7 (Tanyildizi et al., 2005). *Rhodothermus marinus* zaznamenal produkci amylasy při počátečním pH v rozmezí 7,5-8 (Gomes et al., 2003). Termofilní rody *Pyrococcus furiosus*, *P. woesei* a *Thermococcus profundus* vykazovaly pH optimum pro produkci enzymu α -amylasy při pH=5 (Vieille et al., 2001). Termofilní anaerobní bakterie *Clostridium thermosulfurogenes* produkovaly α -amylasy při pH = 7 (Swamy et al., 1996).

Pro stanovení aktivity α -amylasy v závislosti na teplotě byl enzym inkubován třicet minut při různých teplotách. U obou forem α -amylasy (volné i imobilizované na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a nanočasticích bylo od 27 °C do 37 °C zachováno 100 % aktivity. Při teplotách nad 37 °C docházelo k snížení aktivity amylasy. U volné α -amylasy při teplotě nad 67 °C byl enzym zcela denaturován a aktivita amylasy byla téměř nulová. U imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a nanočasticích byla aktivita v rozmezí teplot 65-85 °C nižší, avšak vykazovala stále 28 % aktivity. Vzhledem k teplotě tak došlo ke zlepšení závislosti na teplotě α -amylasy imobilizované na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a nanočasticích. Závislost volné i imobilizované α -amylasy na teplotě se článek od článku liší. U většiny volných amylas je teplotní optimum v rozmezí 25-37°C (Pandey et al., 1999), např.: mikroorganismy rodu *Aspergillus ficuum* vykazují teplotní optimum při 30°C (Hayashida et al., 1986). Kvasinky jako *Saccharomyces kluyveria* a *S. cerevisiae* mají teplotní optimum při teplotě 35°C (Moller et al., 2004). Bakteriální amylasy vykazují mnohem širším rozmezí teplot. *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* a *B. stearothermophilus* patří mezi nejběžněji používané *Bacillus* sp., jejich optimální teplota je v rozmezí 37-60°C (Mielenz et al., 1983, Mishra et al., 2005). Volné termostabilní α -amylasy *Thermococcus profundus* a *Thermatoga maritima* mají teplotní optimum při teplotě 80 °C (Vieille et al., 2001). Existuje také amylasa aktivní při nízkých teplotách, která je získávána z antarktické chladnomilné *Alteromonas haloplanktis*. Teplotní optimum této bakterie je 4°C (Feller et al., 1998). U imobilizovaných α -amylas závisí hodnota aktivity na teplotě, na druhu imobilizace, použitém nosiči a na konkrétním druhu amylasy. Z

literatury je známa celá řada případů, kdy imobilizované α -amylasy vykazují nižší sensitivitu vůči teplotě než-li jejich rozpustné analogy. Amylasy imobilizované pomocí adsorpce a kovalentní vazby vykazovaly aktivitu při teplotách 65°C (Krajewska et al., 1990).

Vzhledem k tomu, že α -amylasa působí jako katalyzátor, je možné ji po skončení reakce použít znovu. Imobilizace enzymů na vhodné nosiče umožnila vícenásobné použití enzymu. Námi měřená operační stabilita byla měřena v deseti opakováních. Například při kovalentní imobilizaci amylasy z *B. subtilis* na částice polyhydroxyethylmethakrylátu bylo po 20 cyklech zachováno 90 % aktivity amylasy (Konsoula et al., 2006) nebo při imobilizaci α -amylasy na jemné částice SiO₂ adsorpcí bylo po 10 cyklech zachováno 92,3 % původní aktivity enzymu (Park et al., 2005). Méně úspěšný případ je například imobilizace amylasy z *B. licheniformis* na mikročástice polyhydroxyethylmethakrylátu a kopolymeru polystyrenu a hydroxyethylmethakrylátu kdy se po 15 cyklech snížila aktivita o 76 % (Bayramoglu et al., 2004). Nejúspěšnější při našich měřeních byla vzhledem k operační stabilitě enzymu imobilizace na magnetické nanočástice, kde si při zahrnutí chybových úseček imobilizovaná α -amylasa zachovala po deseti měřeních 93 % své původní aktivity. α -Amylasy imobilizovaná na magnetické mikročástice (MT 100) si zachovala po deseti měřeních 86 % své původní aktivity a α -amylasy imobilizovaná na magnetické mikročástice (MT 200) si zachovala po deseti měřeních 89 % své původní aktivity. Imobilizovaný enzym na magnetických mikročásticích (MT 100, MT 200) a na magnetických nanočásticích je možné použít opakovaně.

V porovnání s volnou amylasou poskytuje imobilizovaný enzym určité výhody. Celkové finanční náklady procesu jsou nižší, neboť imobilizovaný enzym může být použit opakovaně a procesy lze provádět kontinuálně (Liu et al., 2005). Ve většině případů jsou imobilizací příznivě ovlivněny vlastnosti enzymu jako je termostabilita, stabilita v širším spektru hodnot pH a stabilita při skladování (Hong et al., 2007).

6. Závěr

- Byla vypracována rešerše na téma α -amylasa, magnetické mikročástice, magnetické nanočástice a imobilizace enzymů na magnetické mikročástice (MT 100 nebo MT 200) a nanočástice.
- Na magnetické mikročástice (MT 100 nebo MT 200) byla imobilizována α -amylasa z *Aspergillus oryzae* jodistanovou metodou. Na magnetické nanočástice potažené chitosanem a aktivované glutaraldehydem byla imobilizována α -amylasa z *Aspergillus oryzae*.
- U imobilizované α -amylasy na magnetické mikro a nanočástice byla stanovena vazebná kapacita. Z výsledků lze vyčíst, že vazebná kapacita je u magnetických nanočástic o 15 % vyšší oproti magnetickým mikročásticím (MT 100) a o 27 % vyšší oproti magnetickým mikročásticím (MT 200).
- Byly studovány vlastnosti volné a imobilizované amylasy z *Aspergillus oryzae*. Pro volnou i imobilizovanou amylasu bylo stanoveno optimální pH=6. Při hodnotách nižších než 3 docházelo u volné amylasy k výrazné ztrátě aktivity. Naproti tomu amylasa imobilizovaná na magnetických mikročásticích (MT 100 i MT 200) a nanočásticích vykazovala aktivity i při nižších hodnotách pH. Stejných výsledků jsme dosáhli i při pH vyšším než stanovené optimum.
- α -Amylasy imobilizované na magnetických mikročásticích a nanočásticích měly vyšší teplotní stabilitu. Hodnota T_{50} se oproti volné amylase zvýšila o 5 °C (MT 100), o 10 °C (MT 200) a o 13 °C (nanočástice). Z výsledků vyplývá, že ukotvená amylasa je teplotně stabilnější.
- U imobilizované α -amylasy byla testována operační stabilita a bylo zjištěno, že α -amylasa imobilizovaná pomocí jodistanové metody na magnetických mikročásticích může být použita opakovaně. Po 10-ti násobném použití klesne její aktivita o 14 % (MT 100) a o 11 % (MT 200). U α -amylasy imobilizované na magnetických nanočásticích obalených chitosanem, aktivovaných glutaraldehydem se aktivita po 10-ti násobném použití snížila pouze o 7 % . α -Amylasy mohou být použity opakovaně.

- U volné α -amylasy a imobilizované α -amylasy na magnetických mikročasticích (MT 100, MT 200) a nanočasticích byla změřena funkční stabilita enzymu. α -Amylasa si po 72 hodinách skladování při laboratorní teplotě udržela 100 % své původní aktivity. Z výsledků je patrné, že je možné krátkodobě skladovat amylasu při laboratorní teplotě bez většího ovlivnění její aktivity.
- Byly stanoveny hodnoty Michaelisovy konstanty pro volnou a imobilizovanou amylasu (MT 100, MT 200, nanočástice). Hodnota K_m se po imobilizaci snížila téměř o 100 μmol , lze tedy konstatovat, že afinita enzymu k umělému substrátu CNP-G3 se v případě imobilizace na magnetické mikročástice (MT 100, MT 200) a nanočástice zvýšila.

7. Použitá literatura

- Aehle W., Misset O. (1999) Enzymes for industrial applications. *Biotechnology*, 2nd ed. Germany:Wiley-VCH, 189-216.
- Aguilar G., Morlon-Guyot J., Trejo-Aguilar B., Guyot J. P. (2000) Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 406–413.
- Akkaya B., Şahin F., Demirel G., Tümtürk H. (2009) Functional polymeric supports for immobilization of cholesterol oxidase. *Biochem. Eng. J.* **43**, 333 – 337.
- Amoozegar M. A., Malekzadeh F., Malik K. A. (2003) Production of amylase by newly isolated moderate halophile *Halobacillus* sp. strain MA-2. *J. Microbiol. Methods.* **52**, 353-359.
- Amritkar N., Kamat M., Lali A. (2004) Expanded bed affinity purification of bacterial α -amylase and cellulase on composite substrate analogue–cellulose matrices, *Process Biochem.* **39**, 565–570.
- Aquino A. C. M. M., Jorge J. A., Terenza H. F., Polizeli M. L. T. M. (2003) Studies on thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 323–328.
- Arica M. Y., Hasirci V., Alaeddinoglu N. G. (1995) Covalent immobilisation of α -amylase on to pHEMA microspheres: Preparation and application to fixed bed reactor. *Biomaterials* **16**, 761 – 768.
- Asgher M., Asad M. J., Rahman S. U., Legge R. L. (2007) A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J. Food Process. Eng.* **79**, 950-955.
- Bayramoğlu G., Yilmaz M., Arica M. Y. (2004) Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: Kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. *Food Chem.* **84**, 591 – 599.
- Baysal Z., Uyar F., Aytekin C. (2003) Solid-state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochem.* **38**, 1665–1668.
- Bean C.P., Livingstone J.D.(1959) Superparamagnetism. *J. Appl. Phys* **30**, 9-120.
- Bennett J.W. (2001) Adrenalin and cherry trees. *Mod. Drug Discovery* **4**, 47 – 51.
- Berry C.C., Curtis A.S.G. (2003) Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D: J. Appl. Phys.* **36**, 198–206.

- Bessler J., Schmitt K., Maurer D.R., Schmid M. (2003) Directed evolution of a bacterial amylase: Toward enhanced pH-performance and higher specific activity. *Protein Sci.* **12**, 2141–2149.
- Bickerstaff G. F. (1997) Immobilization of enzymes and cells - some practical considerations. Humana Press Totowa, 1-10.
- Bin G., Lais X., Youfang D., Yanquan L. (1999) Screening of alpha amylase high-producing strains from *Bacillus subtilis*. *J. Zhejiang* **23**, 88-92.
- Blakemore R. (1975) Magnetotactic Bacteria. *Science* **190**,377.
- Boivin M., Flourie B., Rizza R. A. (1987) Gastrointestinal and metabolic effects of amylase inhibition in diabetics. *Gastroenterology* **94**, 387-343.
- Brady D., Jordaan J. (2009) Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol. Lett* **31**, 1639– 1650.
- Brumm P. J., Teague W. M. (1989) Effect of additives on the thermostability of *Bacillus stearothermophilus* a-amylase, *Biotechnol. Lett.* **11**, 541–544.
- Bryjak J. (2003) Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilisation on acrylic carriers. *Biochem. Eng. J.* **16**, 347 – 355.
- Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Omer C., Ashabil A., Osman G. (2003) Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6, *Process. Biochem.* **38.**, 1397–1403.
- Cao L. (2005) Carrier-bound immobilized enzymes - Principles, applications and design, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Carlsen M., Spohr A. B., Nielsen J., Villadsen J. (1996) Morphology and physiology of an a-amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 266–276.
- Coronado M., Vargas C., Hofemeister J., Ventosa A., Nieto J. J. (2000) Production and biochemical characterization of an alpha-amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**, 67-71.
- Couto S. R., Sanromán M. A. (2006) Application of solid-state fermentation to food industry. *J. of Food Engen.* **76**. 291-302.
- Crabb W.D., Shetty J.K., (1999) Commodity scale production of sugars from starches. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 252–256.
- Cushing B. L., Kolesnichenko V. L., O'Connor C. (2004) Recent advances. in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *J. Chem. Rev.* **104**, 3893.
- Darnall W., Birnbaum R. (1973) Lanthanide ions activate α -amylase. *Biochem.* **12**,3489-3495.

- De Cuyper M., Demeulenaer B., Vandermeeren P., Vanderdeelen J. (1996) Catalytic Durability of Magnetoproteoliposomes Captured by High-Gradient Magnetic Forces in a Miniature Fixed-Bed Reaktor. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 654-662.
- Deutch C. E. (2002) Charakterization of a salt-tolerant extracellular α -amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 78-84.
- Denizot B., Tanguy G., Hindre F., Rump E., Jeune J., Jallet P. (1999) Phosphorylcholine coating of iron oxide nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **209**, 66–71.
- Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z., Bennamoun L. (2006) Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food. Process. Eng.* **73**, 190-197.
- Dresco P.A., Zaitsev V.S., Gambino R.J., Chu B. (1999) Preparation and properties of magnetite and polymer magnetite nanoparticles. *Langmuir* **15**, 1945.
- Dunnill P., Lilly M. D. (1974) Purification of enzymes using magnetic bio-affinity materials. *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 987-990.
- Dupuy G., Hilaire G., Aubry C. (1987) Rapid determination of alpha-amylase activity by use of a new chromogenic substrate. *Clin. Chem.* **33**, 524 – 528.
- El-Batal A. I., Atia K. S., Eid M. (2005) Stabilization of α -amylase by using anionic surfactant during the immobilization process, *Radiat. Phys. Chem.* **74**, 96–101.
- Eldin M. S. M., Schroën C. G. P. H., Janssen A. E. M., Mita D. G., Tramper J. (2000) Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. *J. Mol.Catal. B: Enzym.* **10**, 445 – 451.
- Fagain C. O. (2003) Enzyme stabilization – Recent experimental progress. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 137–149.
- Fang T.Y., Ford C. (1998) Protein engineering of *Aspergillus awamori* glucoamylase to increase its pH optimum. *Protein Eng.* **11**, 383–388.
- Feller G., Le Bussy O., Gerday C. (1998) Expression of psychrophilic genes in mesophilic hosts: Assessment of the folding state of a recombinant α -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1163–1165.
- Feller G., d'Amico D., Gerday C. (1998) Thermodynamic stability of a cold-active α -amylase from the Antarctic bacterium *Alteromonas haloplanctis*. *Biochemistry*, **38**, 4613-4619.
- Fogarty W. M., Kelly C. T. (1990) *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 2nd edn, Elsevier Science Publishers, London, 71-132.

- Fogarty M. W. (1983) Microbial Amylases. In: Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishers Ltd., London, UK , pp. 1–92.
- Fontana A., Zambonin M., De Filipis V., De Laureto P. P. (1995) Limited proteolysis of cytochrome c in trifluoroethanol. *FEBS Lett.* **362**, 266–270.
- Francis F., Sabu A., Nampoothiri K. M., Ramachandran S., Ghosh S., Szakacs G., Pandey A. (2003) Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* . *Biochem. Eng. J.* **15**, 107-115.
- Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Grossi-de-Sá M.F. (2002) Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. *J. Biochem.* **269**,397-412.
- Gomes I., Gomes J., Steiner W. (2003) Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresour Technol.* **90**, 207-214.
- Goyal N., Gupta J. K., Soni S. K.(2005) A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 723–734.
- Guo L., Liu G., Hong R. Y., Li H. Z. (2010) Preparation and characterization of chitosan poly(acrylic acid) magnetic microspheres. *Mar. Drugs.* **7**, 2212-2122.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem*, **38**, 1599 - 1616.
- Gupta R, Patel K., Calder P.C., Yaqoob P., Primrose J.N., Johnson C.D. (2003) A randomised clinical trial to assess the effect of total enteral and total parenteral nutritional support on metabolit. *Pancreatology* **3**, 406-413.
- Havliš J. (1999) Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír* **78**, 448.
- Hayashida S., Teramoto Y. (1986) Production and characteristics of raw-starch-digesting α -amylase from a protease negative *Aspergillus ficuum* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1068–1073.
- Hill R., Needham J. (1970) The Chemistry of Life: Eight Lectures on the History of Biochemistry, Cambridge University Press, London, England, **17**.
- Horikoshi K. (1996). Alkaliphiles from an industrial point of view. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 259-270.
- Húska D., Adam V., Trnková L., Kížek R. (2008) Dependence of adenine isolation efficiency on the chain length evidenced using paramagnetic particles and voltammetry measurements. *J. Magn. Magn. Mater.* **321**, 1474 – 1477.

- Chi M., Chen Y., Wu T., Lo H., Lin L. (2009) Engineering of a truncated α -amylase of *Bacillus* sp. Strain TS-23 for the simultaneous improvement of thermal and oxidative stabilities. *J. Biosci. Bioeng.* **47**, 71-79.
- Chen M., Yamamuro S., Farrell D, Majetich S.A. (2003) Gold-coated iron nanoparticles for biomedical applications. *J. Appl. Phys.* **93**, 7551–7553.
- Iefuji H., Chino M., Kato M., Imura Y. (1996) Raw starch-digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochem. J.* **318**, 989–996.
- Janecek S., Balaz S. (1992) α -amylases and approaches leading to their enhanced stability, *FEBS Lett.* **304**, 1–3.
- Jakobsen K.S., Breivold E., Hornes E. (1990) Purification of mRNA directly from crude plant tissues in 15 minutes using magnetic oligo dT microspheres. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3669.
- Jin B., van Leeuwen H.J., Patel B., Yu Q. (1998) Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresour. Technol.* **66**, 201-206.
- Jiles D. (1991) Introduction to magnetism and magnetic materials. New York: Chapman & Hall.
- Jensen B., Olsen J. (1992) Physicochemical properties of a purified alpha amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 112 -116.
- Kajiwara Y., Takbshima N., Ohba H. Omori T., Shimoda M., Wada H. (1997) Production of acid-stable α -amylase by *aspergillus* during Barley *Shochu-Koji* production. *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 224-227.
- Kang H. K., Lee J. H., Kim D., Day D. F., Robyt J. F., Park K. W., Moon T. W. (2004) Cloning and expression of *Lipomyces starkeyi* α -amylase in *Escherichia coli* and determination of some of its properties. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**, 53–64.
- Kammoun R., Naili B., Bejar S. (2008) Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel. *Bioresour. Technol.* **99**, 5602- 5609.
- Kara A., Osman B., Yavuz H., Besirli N., Denizli A. (2005) Immobilization of α -amylase on Cu²⁺ chelated poly(ethylene glycol dimethacrylate-*n*-vinyl imidazole) matrix via adsorption, *React. Funct. Polym.* **62**, 61–68.
- Katchalski-Katzir E., Kraemer D. M. (2000) Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J. Mol. Catal. B – Enzym.* **10**, 157 – 176.

- Kathiresan K., Manivannan S. (2006) α -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 829-832.
- Katz E., Willner I. (2004) Integrated Nanoparticles-Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications. *Angew. Chem., Int..Ed. Engl.* **43**, 6042.
- Khajeh K., Nemat-Gorgani M. (2001) Comparative studies on a mesophilic and a thermophilic α -amylase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **90**, 47–55.
- Khalafalla S.E., Reimers G.W. (1980) Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. *IEEE Trans. Magn.* **16**, 178–183.
- Kilara A., Desai M. (2009) Enzymes. In: *Food Additives* (A.L. Branen, P.M. Davidson, S. Salminen, J.H. Thorngate eds), Marcel Dekker Inc., New York, USA pp. 661–706.
- Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C. (2002) Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 345-351.
- Kluchova K., Zboril R., Tucek J., Pecova M., Zajoncova L., Safarik I., Mashlan M., Markova I., Jancik D., Sebel M., Bartonkova H., Bellesi V., Novak P., Petridis D. (2009) Superparamagnetic maghemite nanoparticles from solid-state synthesis – Their functionalization towards peroral MRI contrast agent and magnetic carrier for trypsin immobilization. *Biomaterials* **30**, 2855-2863.
- Konieczna-Molenda A., Kochanowski A., Walaszek A., Bortel E., Tomasika P. (2009) Immobilization of α -amylase on poly(vinylamine) and poly(vinylformamide) supports and its performance. *Chem. Eng. J.* **146**, 515 – 519.
- Konsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M. (2006) Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*, *Process Biochem.* **41**, 343–349.
- Krajewska B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations. *Enzym Microb Tech.* **35**, 126-139.
- Krishna S. H., Divakar S., Prapulla S.G., Karanth N.G. (2001) Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J. Biotechnol.* **87**, 193–201.
- Kunamneni A., Singh S. (2005) Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochem. Eng. J.* **27**, 179–190.
- Kuriki T., Hondoh H., Matsuura Y. (2005) The conclusive proof that supports the concept of the α -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *Biologia* **60**, 13-16.
- Lawrence M.J., Rees G.D. (1992) Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.* **45**, 89–121.

- Lei Z., Bi S. (2007) The silica-coated chitosan particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1442-1447.
- Levitzki A., Steer M. (1974) The Allosteric Activation of Mammalian alpha amylase by Chloride. *Eur. J. Biochem.* **41**, 171-178.
- Liao Y. C., Syu M. J. (2005) Novel immobilized metal ion affinity adsorbent based on cross- linked b-cyclodextrin matrix for repeated adsorption of a-amylase, *Biochem. Eng. J.* **23**, 17–24.
- Liu J. W., Zhang Y., Chen D., Yang T., Chen Z. P., Pan S. Y., Gu N. (2009) Facile synthesis of high-magnetization γ -Fe₂O₃/alginate/silica microspheres for isolation of plasma DNA. *Colloids Surf., A* **341**, 33 – 39.
- Lorentz P., Eck J. (2010) Metagenomics and industrial applications. *Nature Pub. Group* **3**, 510-515.
- Mamo G., Gessesse A. (1999) Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable a-amylases from a thermophilic *Bacillus*, *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 433– 438.
- Malhotra R., Noorvez S. M., Satyanarayana T. (2000) Production and partial characterization of thermostable and calcium independent alpha amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 378–384.
- Malkus H., Ibanez J., Castro A., DiCesare J. L. (1977) Automated turbidimetry of amylase activity by use of a discrete kinetic analyzer. *Clin. Chem.* **23**, 122-128.
- Mansfield L.P., Forsythe S.J. (1993) Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**, 122-125.
- Massia S.P., Stark J., Letbetter D.S. (2000) Surface immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials* **21**, 2253–2261.
- Matthews M. A., Anderson M. M., Schultz H. R.(1987). Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet franc. *Vitis* **26**, 147-160.
- Mateo C., Abian O., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M. (2000) Reversible enzyme immobilisation via a very strong and nondistorting ionic adsorption on supportpolyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 98 – 105.
- McKee T., McKee J.R. (1996) *Biochemistry. An introduction.* Wm. C. Brown. Publisher. Boston.
- Melo F. R., Sales M. P., Silva L. S., Franco O. L., Bloch C. Jr., Ary M. B. (1999) α -Amylase inhibitors from cowpea seeds. *Prot. Pept. Lett.* **6**, 385-390.

- Mishra S., Noronha S. B., Suraishkumar G. K. (2005) Increase in enzyme productivity by induced oxidative stress in *Bacillus subtilis* cultures and analysis of its mechanism using microarray data. *Process Biochem.* **40**,1863–1870.
- Mitidieri S., Souza M. A. H., Schrank A. Vainstein M. H. (2006) Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*; a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresour. Technol.* **97**, 1217-1224.
- Mojsov T., Kiro M. (2012) Microbial Alpha-Amylases and their Industrial Applications. *IJMIE* **2**, 583-609.
- Monshipouri M., Neufeld R. J. (1992) Kinetics and activity distribution of urease coencapsulated with hemoglobin within polyamide membranes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **32**, 111 – 126.
- Moller K., Sharif M. Z., Olsson L. (2004) Production of fungal alpha-amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. *J. Biotechnol.* **111**, 311-318.
- Moreira F. G., Lenartovicz V. L., Peralta R. M. (2004) A thermostable maltose-tolerant α -amylase from *Aspergillus tamari*. *J. Basic Microbiol.* **44**, 29–35.
- Mulvaney P., Liz-Marza'n L.M., Giersig M., Ung T. (2000) Silica encapsulation of quantum dots and metal clusters. *J. Mater. Chem.* **10**, 1259–1270.
- Nagwa S. M., Maha A., Reham B., Reham S., Ghadeer B. (2011) Purification and characterization of alpha-amylase from a newly isolated *Aspergillus flavus* F2Mbb. *Inter. J. Biotechnol.* **2**, 96-103.
- Najafi M. F., Kembhavi A. (2005) One-step purification and characterization of an extracellular α -amylase from marine *Vibrio* sp., *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 535–539.
- Nashidate K., Miwa S. (1981) An enzymatic method for serum α -amylase assay. *Jpn. J. Clin. Pathol.* **29**. 259-265.
- Nielsen J. E., Borchert T. V. (2000) Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim. Biophys. Acta* **1543**, 253-274.
- Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Hagihara H., Ozaki K., Ltso S., Mik K., (2003) Crystal structure of Calcium free alpha amylase from *Bacillus* sp. Strain KSM-K38 (amyK38) and its sodium ion Binding sites. *J. Biol. Chem.* **278**(27), 24828 – 24824.
- Olsen D., Yang C., Bodo M., Chang R., Leigh S., Baez J., Carmichael D., Perala M., Hamalainen E.R., Jarvinen M., Polarek J. (2003) Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **55**, 1547–1567.

- Olsvik P., Popovic T., Skjerve E., Cudjoe K.S., Hornes E., Ungelstad J., Uhlen M. (1994) Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol. Revs.* **7**, 43.
- Pandey A. (1991) Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* **37**,169–172.
- Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. T. (2000) New developments in solid state fermentation. *Biotechnik. Appl. Biochem.* **31**, 135-143.
- Pandey A., Soccol C. R., Soccol V. T. (2000) Biopotential of immobilized nzymes, *Indian J. Microbiol.* **40**,1–14.
- Pandey A., Soccol C.R., Mitchell D. (2000) New developments in solid state fermentation. *Process. Biochem.* **35**, 1153-1169.
- Panyam J.,LabhasetwarV. (2003) Biodegradablenanoparticlesfordrug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Delivery Rev.* **55**, 329–347.
- Parak W. J., Boudroau R., Gros M., Gerion D., Zan- chet D., Micheel Ch. M., S. Williams Alivisatos A. P., Larabell C. (2002) *Adv. Matter* **14**, 882.
- Patel A. K., Nampoothiri K. M., Ramachandran S., SzakacsG., Pandey A. (2005) Partial purification and characterization of a-amylase produced by *Aspergillus oryzae* using spent brewing grains. *Indian J. Biotechnol.* **4**, 336–342.
- Pimstone N. R. (1964) A micromethod for the determination of plasma amylase. *Clin.Chem.* **10**, 891-896.
- Portet D., Denizot B., Rump E., Lejeune J.J., Jallet P. (2001) Nonpolymeric coatings of iron oxide colloids for biological use as magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Colloid Interface Sci.* **238**, 37–42.
- Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M. S., Muralikrishna G., Sreeramalu K. (2009) Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process. Biochem.* **44**, 210-215.
- Rabišková M. (2008) Využití nanočásticových systémů v medicíně. *Remedia* 2008, 89-97.
- Ramachandran S., Patel A. K., Nampoothiri K. N., Francis F., Nagy V., SzakacsG., Pandey A. (2004) Coconut oil cake - A potential raw material for the production of a-amylase. *Bioresour. Technol.* **93**, 169–174.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Gathe M.S., Deshpande V.V. (1998) Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbial. Microbial. Rev*, **62**, 597-635.

- Rauscher E., Neumann E. S., Bulow S., Wahlefeld A. W. (1985) Enzymatic determination of α -amylase activity in biological sample. *Clin.Chem.* **31**, 14-19.
- Reddy N.S., Nimmagada A., Sambasiva Rac R.S (2003) An over view of the Microbial alpha amylase Minireview. *Afri. J. Biotechnol* **2**(27), 645-648.
- Regulapati R., Malav P. N., Gummadi S.N. (2007) Production of thermostable alpha amylase by solid state fermentation- A review. *American J. Food Technol.* **2.**, 1- 11.
- Ronning O.W., Christophersen A.C. (1991) An ELISA-method using magnetic beads as solid phase for rapid quantitation of mouse and human immunoglobulins. *Hybridoma* **10**, 641-645.
- Rosensweig R.E. (1985) Ferrohydrodynamics. Cambridge
- Řezanka P., Záruba K., Král V. (2007) Potenciál modifikovaných nanočástic v analytické chemii. *Chem. listy* **101**, 881-885.
- Saboury A. A. (2002) Stability, activity and binding properties study of α -amylase upon interaction with Ca^{2+} and Co^{2+} , *Biologia* **57.**, 221–228.
- Safarikova M., Roy I., Gupta M. N., Safarik I. (2003) Magnetic alginate microparticles for purification of α -amylases, *J. Biotechnol.* **105**, 255–260.
- Sahlstrom S., Brathen E. (1997). Effects of enzyme preparations for baking, mixing time and resting time on bread quality and bread staling. *Food Chem.* **58**, 75–80.
- Samborska K., Guiavarch Y., Van Loey, Hendrickx M. (2005) The influence of moisture content on the thermostability of *Aspergillus oryzae* α -amylase, *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 167–174.
- Sassolas A., Blum J. L., Leca-Bouvier B. (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **30**, 489-511.
- Sauzedde F., Elaissari A., Pichot C. (1999) Hydrophilic magnetic polymer latexes 2. Encapsulation of adsorbed iron oxide nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* **277**, 1041– 1050.
- Schindler R., Lendl B., Kellner R. (1998) Determination of enzyme kinetics and chemometric evaluation of reaction products by FTIR spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **35**, 366-372
- Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampootheri K. M., Soccol C. R., Pandey A. (2006) α -Amylase from microbial sources - an overview on recent developments. *Food Technol. Biotechnol.* **44**, 173-184.
- Sogaard M., Abe J., Martin-Eauclaire M. F., Svensson B. (1993) alpha- Amylases: structure and function, *Carbohy. Polym.* **21**: 137- 146.

- Souza P.M., Magalhaes P.de O. (2010) Application of microbial alfa amylase in industry. *Braz. J. Microbiol.* **41**, 850-861.
- Stirib S. E , Frey H., Haag H.(2002) Dendritische Polymere für medizinische Anwendungen: auf dem Weg zum Einsatz in Diagnostik und Therapie. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **41**, 1329.
- Sudo S., Ishikawa T., Sato K., Oba T. (1994) Comparison of acid-stable α -amylase production by *Aspergillus kawachii* in solid-state and submerged culture. *J. Ferment. Bioeng.* **77** , 483–489.
- Swamy M. W. , Seenayya G. (1996) Thermostable pullulanase and α -amylase activity from *Clostridium thermosulfurogenes* SV9 optimization of culture conditions for enzyme production. *Process Biochem.* **31**, 157–162.
- Swanson M. A. J. (1948) Studies on the structure of polysaccharides. IV. Relation of iodine color to the structure. *J. Biol. Chem.* **172**, 825.
- Šafarik I., Šafarikova M.(1993) Batch isolation of hen egg white lysozyme with magnetic chitin. *J. Biochem. Biophys. Methods* **27**, 327-330.
- Šafaříková M., Šafařík I. (1995) Magnetic separation in biosciences and biotechnology. *Chem.Listy* **89**, 280-287.
- Tadmor R., Rosensweig R.E., Frey J., Klein J. (2000) Resolving the puzzle of ferrofluid dispersants. *Langmuir* **16**, 9117–9120.
- Tanyildizi M. S., Ozer D., Elibol M. (2005) Optimization of α -amylase production by *Bacillus sp.* Using response surface methodology. *Process. Biochem.* **40**, 2291-2296.
- Tanyolaç D., Yürüksoy B. I., Özdural A. R. (1998) Immobilization of a thermostable α - amylase, Termamyl®, onto nitrocellulose membrane by Cibacron Blue F3GA dye binding. *Biochem. Eng. J.* **2**, 179 – 186.
- Tepper T., Ilievski F., Ross C.A., Zaman T.R., Ram R.J., Sung S.Y., Stadler B.J.H. (2003) Magneto-optical properties of iron oxide films. *J. Appl. Phys.* **93**, 6948–6950.
- Tester R.F., Karkalas J., Qi X. (2004) Starch composition, fine structure and architecture. *J. Ceresû Sci.* **39**, 151-165.
- Tillotson T.M., Gash A.E., Simpson R.L., Hrubesh L.W., Satcher J.H. (2001) Nanostructured energetic materials using sol–gel methodologies. *J. Non-Cryst. Solids* **285**, 335–8.

- Torres C. F., Munir F., Blanco R. M., Otero C., Hill Jr. Ch. G. (2002) Catalytic transesterification of corn oil and tristearin using immobilized lipases from *Thermomyces lanuginosa*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79**, 775–781.
- Tripathi P., Kumari A., Rath P., Kayastha A. M. (2007) Immobilization of α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **49**, 69 – 74.
- Tsurikova N. .M., Nefedova L. I.,Kostileva E.V., Zvenigodskii V.I., Asinovskii V.G. Voeikova T.A., Sinitsyn A. P. (2002) Preparation of an active strain of *B. licheniformis*-producer of thermostable alpha amylase . *Prkl. Biokhim. Mikrobiol.* **38** (5), 502-508
- Turkevitch J., Stevenson P.C., Hillier J. (1951)_A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55.
- Tümtürk H. R., Caykara T., Kantoglu O., Guven O. (1999a) Adsorption of α -amylase onto poly(*N*-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels. *Nuclear Instr. Method Phys. Res.,Section B: Beam Interact Mater Atom* **151**, 238 – 241.
- Uguru G. C., Akinyauju J. A., Sani A. (1997) The use of yam peel for growth of locally isolated *Aspergillus niger* and amylase production. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 46-51.
- Van der Maarel M . J. E. C., Van der Veen B., Utdehaag J. C. M., Leenhuis H., Dijkhuizen L. (2002) Properties and applications of starch converting enzymes of the alpha amylase family. *J. Biotechnol* **94**. 137-155.
- Van Staden J. F., Mulaudzi L. V. (2000) Flow injection spectrophotometric assay of α -amylase activity. *Anal. Chim. Acta* **19**, 421-425.
- Vaseekaren S., Balakumar S., Arasaratman K. (2010) Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable α -amylase. *Trop. Agricultural Res.* **22**, 1-11.
- Vieille K., Zeikus G.J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms of thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 1–43.
- Vishwanathan P., Surlikar N. R. (2001) Production of α -amylase with *Aspergillus flavus* on *Amaranthus* grains by solid-state fermentation. *J. Basic Microbiol.* **41**, 57–64.
- Vladimir S., Zaitsev V., Dmitry S., Filimonov I., Gambino R.J., Chu B., Presnyakov A. (1999) Physical and chemical properties of magnetite and magnetite-polymer nanoparticles and their colloidal dispersions. *J. Colloid Interface Sci.* **212**, 49- 55.
- Weetall H.H., Lee M.J. (1989) Antibodies. immobilized on inorganic supports. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **22**, 311.

- Wanderley K. J., Torres F. A., Moraes L. M., Ulhoa C. J. (2004) Biochemical characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol Lett.* **231**, 165-169.
- Xia H.Y., Zhang Y., Gao L., Yan L. (2011) Composite Microspheres Based on Morphology Transcription Method. *Acta Phys. Chim. Sin.*, **27** , 2485-2492.
- Yaacob I., Nunes A.C., Bose A., Shah D.O. (1994) Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles in spontaneously generated vesicles. *J. Colloid Interface Sci.* **168**, 289–301.
- Yamaguchi M., Kanemaru M., Kanemori T., Mizuno I. (2003) Flow-injection-type biosensor system for salivary amylase activity. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 835-842.
- Yang C.H., Liu W. H. (2004) Purification and properties of a maltotriose- producing a-amylase from *Thermobifida fusca*. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 254–260.
- Yonezawa T., Onoue S., Kimizuka N. (2000) Preparation of Highly Positively Charged Silver Nanoballs and Their Stability. *Langmuir* **16**, 5218.
- Yoon S. H., Robyt J. F. (2005) Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols, *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 556–562.
- Zajoncová L., Šebela M. (2006) Amylasy – význam stanovení jejich aktivity. *Chem. Listy* **101**, 36-43.
- Zhang Y., Kohler N., Zhang M. (2002) Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **23**, 1553–1561.
- Zhi W., Deng Q., Song J., Gu M., Ouyang F (2005) One-step purification of a-amylase from the cultivation supernatant of recombinant *Bacillus subtilis* by high-speed counter-current chromatography with aqueous polymer two-phase systems, *J. Chromatogr. A*, **1070**, 215–219.
- Ziolo R.F., Giannelis E.P., Weinstein B.A., O'Horo M.P., Ganguly B.N., Mehrotra V., Russell M.W., Huffman D.R. (1992) Matrix mediated synthesis of g-Fe₂O₃ : a new optically transparent magnetic material. *Science* **257**, 219–223.

8. Seznam použitých zkratek

Asn	asparagin
Asp	aspartát
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CNP-G3	2-chloro-4-nitrofenyl-maltotriosid
DMF	dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
G7	α -1-D-maltoheptaosid
Glu	glutamát
IČ	infračervená spektroskopie
k_{cat}	katalytická aktivita
kDa	kilodalton
K-P _i	fosfátový pufr
K_m	Michaelisova konstanta
Leu	leucin
MALDI	laserová ionizace a desorpce za účasti matrice
Mr	molekulová hmotnost
MRI	zobrazování magnetickou resonancí
MS	hmotnostní spektrometrie
MT 100	perloza s vázanými mikročásticemi
MT 200	perloza s vázanými mikročásticemi
PEG	polyethylenglykol
PHEMA	poly-2- hydroxyethylmetakrylát
PMMA	polymethylmetakrylát
pNP	p-nitrofenol
PLA	poly-L-mléčná kyselina
PS	Polystyren
PVA	polyvinylalkohol
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie