

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Proteasy a jejich využití v medicíně
Optimalizace imobilizace ureasy**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jitka Hutařová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok:	2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Olomouci dne 12. 12. 2016

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. za odborné vedení práce, trpělivost a ochotu, kterou mi při zpracování věnovala. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Miroslavu Jořenkovi za cenné rady a spolupráci. Poděkování patří i doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D., který mi umožnil pracovat na plynovém chromatografu. Děkuji také rodině za podporu při studiu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jitka Hutařová
Název práce	Proteasy a jejich využití v medicíně Optimalizace imobilizace ureasy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Teoretická část této diplomové práce se zabývá klasifikací proteas, jsou zde popsány jednotlivé rodiny proteas, jejich inhibitory, výskyt a využití, především v medicíně (systémová enzymoterapie). Teoretická část zahrnuje také informace o preparátu Wobenzym, blíže jsou popsány enzymy v něm obsažené (bromelain, papain, trypsin, chymotrypsin). Druhá část je věnována také urease, jejím vlastnostem, výskytu, purifikaci, imobilizaci a praktickým aplikacím. Experimentální část se zabývá optimalizací imobilizace ureasy na magnetické mikročástice Perlosa MG 200 z hlediska volby vhodných podmínek pro imobilizaci. U imobilizované ureasy byla stanovena specifická aktivita, aktivita enzymu během skladování při laboratorní teplotě bez a po ošetření glycinem. Imobilizovaná ureasa byla využita pro odstranění močovin z vzorků moči a ze vzorků vína.

Klíčová slova	Proteasy, bromelain, papain, trypsin, chymotrypsin, systémová enzymoterapie, Wobenzym, ureasa, imobilizace, magnetické mikročástice
Počet stran	85
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname Bc. Jitka Hutařová

Title Proteases and their use in medicine
Optimizing the immobilization of urease

Type of thesis Diploma

Department Department of biochemistry

Supervisor doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.

The year of presentation 2016

Abstract

The theoretical part of this thesis deals with the classification of proteases, there are described each family of proteases and their inhibitors, the occurrence and use, especially in medicine (systemic enzyme therapy). The theoretical part also includes information about the preparation Wobenzym, closer enzymes therein are described (bromelain, papain, trypsin, chymotrypsin). Second part is devoted urease, its properties, occurrence, purification, immobilization and practical applications. Experimental part deals with optimizing the immobilization of urease onto magnetic microparticles Perlosa MG 200, choice of suitable conditions for immobilization. Specific activity, enzyme activity after storage at room temperature without and after treatment with glycine was determined for the immobilized urease. The immobilized urease was used to remove urea from urine samples and samples of wine.

Keywords Proteases, bromelain, papain, trypsin, chymotrypsin, systemic enzyme therapy, Wobenzyme, urease, immobilization

Number of pages 85

Number of appendices 0

Language Czech

Obsah

1 Cíle práce.....	8
2 Úvod	9
3 Teoretická část	10
3.1 Proteasy	10
3.1.1 Klasifikace proteas	10
3.1.2 Výskyt proteas.....	21
3.1.3 Inhibitory proteas	23
3.1.4 Využití proteas	24
3.1.5 Bromelain.....	25
3.1.6 Papain	27
3.1.7 Trypsin.....	28
3.1.8 Chymotrypsin	31
3.1.9 Využití proteas v medicíně.....	32
3.1.10 Absorpce proteinů přes střevní stěnu	34
3.1.11 Wobenzym	35
3.2 Ureasa	36
3.2.1 Historie ureasy	36
3.2.2 Vlastnosti ureasy.....	37
3.2.3 Struktura ureasy.....	38
3.2.4 Aktivní centrum ureasy	39
3.2.5 Inhibitory ureasy	40
3.2.6 Výskyt ureasy	41
3.2.7 Purifikace ureasy.....	42
3.2.8 Imobilizace ureasy.....	44
3.2.9 Praktické aplikace imobilizované ureasy	47
3.2.10 Močovina ve víně	48
3.2.11 Metody stanovení močoviny ve víně	49
3.2.12 Stanovení aktivity ureasy	49
4 Experimentální část.....	52
4.1 Materiály.....	52
4.2 Přístroje.....	53
4.3 Metody.....	54

4.3.2 Imobilizace ureasy pomocí jodistanu.....	54
4.3.2 Stanovení koncentrace proteinů (množství imobilizované ureasy).....	54
4.3.3 Stanovení aktivity ureasy	55
4.3.4 Plynová chromatografie.....	55
4.3.5 Stanovení specifické aktivity ureasy	56
4.3.6 Vytvoření kalibrační přímky pro močovinu.....	56
4.3.7 Ověření přesnosti práce a měření plynového chromatografu	56
4.3.8 Volba vhodného množství ureasy pro imobilizaci	56
4.3.9 Vliv koncentrace pufru na imobilizaci.....	56
4.3.10 Blokace reaktivních skupin ureasy.....	57
4.3.11 Stabilita imobilizované a volné ureasy.....	57
4.3.12 Odstranění močoviny ze vzorků moči.....	57
4.3.13 Odstranění močoviny ze vzorků vína	57
4.4 Výsledky	59
4.4.1 Vytvoření kalibrační přímky pro močovinu.....	59
4.4.2 Ověření přesnosti práce a měření plynového chromatografu	59
4.4.3 Imobilizace ureasy na magnetické částice	60
4.4.3.1 Volba vhodného množství ureasy pro imobilizaci	60
4.4.3.2 Vliv koncentrace pufru na imobilizaci.....	61
4.4.3.3 Blokace reaktivních skupin ureasy.....	63
4.4.4 Stabilita volné a imobilizované ureasy.....	64
4.4.5 Praktické využití imobilizované ureasy	66
4.4.5.1 Odstranění močoviny ze vzorků moči.....	66
4.4.5.2 Odstranění močoviny ze vzorků vína	67
4.5 Diskuze	70
5 Závěr.....	74
6 Literatura.....	75
7 Seznam použitých zkratk.....	85

1 Cíle práce

V teoretické části bylo cílem vypracovat literární rešerši na téma proteasy (jejich charakterizace, klasifikace, inhibitory, výskyt a využití), a to následně se zaměřením na proteolytické enzymy obsažené v léčebném přípravku Wobenzym (bromelain, papain, trypsin, chymotrypsin) a využití proteas v medicíně (systémová enzymoterapie). Dále provést literární rešerši o urease (vlastnosti, výskyt, purifikace, imobilizace ureasy a praktické aplikace).

Cílem experimentální části byla optimalizace imobilizace ureasy z *Canavalia ensiformis* na magnetické mikročástice Perlosa MG 200 (volba vhodných podmínek pro imobilizaci – vliv koncentrace pufru na imobilizaci; imobilizace enzymu se substrátem, blokáce reaktivních skupin enzymu), dále pak stabilita imobilizované ureasy. Využití imobilizované ureasy pro odstranění močoviny ze vzorků moči a ze vzorků vína.

2 Úvod

Proteasy patří do skupiny enzymů, jež štěpí proteiny v přítomnosti vody na peptidy nebo až na aminokyseliny. Proteasy obecně dělíme na exoproteasy a endoproteasy. Lépe bývají proteasy klasifikovány na aspartátové, cysteinové, serinové, metalo-, threoninové, glutamátové a asparaginové proteasy. V této diplomové práci je věnována část jejich vlastnostem, výskytu, inhibitorům a hlavně využití, a to především v medicíně.

Využití proteas v medicíně má značný význam. Již v minulosti bylo hojně využíváno rostlinných šťáv bohatých na proteasy k léčbě různých ran či vředů. Léčivé účinky proteolytických enzymů jsou využívány i dnes v moderní medicíně k léčbě mnoha onemocnění. Obor zabývající se léčbou pomocí enzymů se nazývá systémová enzymoterapie, za jejího zakladatele je považován prof. Max Wolf. Proteasy mohou být aplikovány místně, oblastně do životně důležitých orgánů, injekčně či podávány perorálně ve formě tablet (k nejznámějším patří Wobenzym, Prevenzym a Phlogenzym). Systémové enzymoterapie se využívá k léčbě otoků, k antibiotické léčbě, při nedostatečné sekreci trávicích šťáv či k léčbě vrozených enzymopatií.

Ureasa je amydohydrolasa a fosfotriesterasa katalyzující hydrolýzu močoviny na amoniak a oxid uhličitý. Ureasa je prvním enzymem, který byl krystalizován. Nachází se v bakteriích, houbách, řasách, rostlinách a u některých bezobratlých živočichů. Vyskytuje se hojně v rostlině *Canavalia ensiformis* (Jackova fazole), patřící do čeledi bobovité (*Fabaceae*). Vzhledem k vysokým nákladům na izolaci a purifikaci enzymů je dnes hojně využíváno imobilizace enzymů, kdy dochází k jejich upevnění na pevné nosiče. Výhodou imobilizovaných enzymů je jejich opakovatelné použití a snadné odstranění enzymu z reakční směsi. Imobilizovaná ureasa byla již využita pro odstranění močoviny z krve, krevního séra a z moči. Její odstranění z moči je důležité pro lepší stanovení metabolitů vyskytujících se v nízkých koncentracích, vysoké koncentrace močoviny komplikují jejich stanovení. Velký význam má dnes odstranění močoviny z alkoholických nápojů. Močovina zde reaguje s ethanolem za vzniku ethylkarbamátu, který je považován za karcinogen a mutagen.

3 Teoretická část

3.1 Proteasy

Proteasy jsou enzymy štěpící proteiny, patří do skupiny hydrolas (EC 3, enzymy katalyzující hydrolýzu, což je rozkladná reakce probíhající v přítomnosti vody). Jsou často extrémně specifické co do struktury i prostorové konfigurace, reakce katalyzují při v rozmezí pH 2 až 9 (Neilands & Stumpf, 1961). Jejich úlohou je štěpení proteinů na peptidy nebo až na aminokyseliny. Tyto metabolity bývají následně využity jako zdroj energie, případně jsou použity na resyntézu bílkovin. Také se účastní přeměny inaktivních forem peptidů na aktivní formu nebo přeměny prohormonů na hormony. Proteasy mají často nízkou molekulovou hmotnost, jsou stálé a lze je připravit v krystalickém stavu. Vyskytují se především ve formě inaktivních zymogenů (Neilands & Stumpf, 1961).

3.1.1 Klasifikace proteas

Základním členěním proteas je rozdělení na exoproteasy a endoproteasy. Zatímco exoproteasy odštěpují aminokyseliny od konce peptidického řetězce (od N-konce – aminopeptidasy, nebo od C-konce – karboxypeptidasy), endoproteasy štěpí uvnitř peptidického řetězce a narušují tím 3D strukturu proteinů. Nyní jsou proteasy členěny do sedmi skupin (klanů) na základě povahy katalytických zbytků: aspartátové (poprvé popsány v roce 1993), cysteinové (1993), serinové (1993), metalo- (1993), threoninové (1997), glutamátové (2004) a asparaginové (2010) proteasy (Kohei, 2012). Z analýzy stovek aminokyselinových sekvencí a za použití přísných standardů pro příbuznost bylo potvrzeno 84 odlišných rodin proteas (Rawlings & Barrett, 1993). Řada těchto rodin vykazovala známky dávného vztahu k ostatním a byly proto zařazeny do klanů, i tak mezi 60 skupinami sekvencí nebyl spatřen žádný vztah. Pro klasifikaci proteas byla zřízena on-line databáze MEROPS. Tato databáze obsahuje též informace o substrátech a inhibitech proteas. Klasifikace je založena na podobnostech primární a terciární struktury právě těch míst přímo účastnících se reakce. Sekvence jsou zařazeny do rodin a rodiny jsou následně řazeny do klanů (Rawlings *et al.*, 2014). První klasifikační systém pro peptidasy publikovali v roce 1993 Rawlings a Barrett, v roce 2004 pak obohatili systém o inhibitory proteas.

Serinové proteasy štěpí peptidové vazby v proteinech, kde se v aktivním místě enzymu nachází serin (Hedstrom, 2002). Vyskytují se jak v eukaryotech, tak i v prokaryotech, v přírodě jsou široce rozšířené. V lidském organismu mají různé

fyziologické funkce. Mezi nejdůležitější patří především trávení, dále pak imunitní reakce, krevní srážlivost, mají význam při vývoji, apoptóze a rozmnožování (Page & Di Cera, 2008). Na základě 3D struktury může být většina serinových proteas zařazena do šesti klanů, a to do klanu chymotrypsinu, subtilisinu, karboxypeptidas C, klanu Escherchia D-Ala-D-Ala peptidas A, klanu příbuzných represoru lexA a eventuálně do klanu zahrnující ATP-dependentní serinové peptidasy (Barrett & Rawlings, 1995). Podle Di Cera (2009), tvoří více než jednu třetinu všech známých proteolytických enzymů serinové proteasy, jež jsou seskupené do 13 klanů a 40 rodin. Tyto čtyři rodiny proteas – ubikvitin specifické C proteasy (klan CA, rodina C19, odpovědné za regulaci vnitrobuněčných bílkovin), adamalysinové proteasy Zn-typu (klan MA, rodina M12, podrodina B, řídí růstové faktory a integrinové funkce), prolyloligopeptidasy (klan SC, rodina S9, štěpí malé peptidy) a serinové proteasy trypsinového typu (klan PA, rodina S1, podrodina A, největší skupina homologních peptidas v lidském genomu zodpovědná za mnoho biologických procesů), samy o sobě představují více než 40 % všech proteolytických enzymů v lidském organismu (Page & Di Cera, 2008). Klasifikační systém proteas MEROPS v roce 2015 počítá se zařazením serinových proteas do celkem šestnácti klanů.

Souhrn katalytických jednotek všech serinových proteasových rodin je uveden v Tabulce 1.

Obecné vlastnosti serinových proteas				
Klan	Počet rodin	Zástupce	Katalytické zbytky	Primární specifita
PA	12	Trypsin	His, Asp, Ser	A, E, F, G, K, Q, R, W, Y
SB	2	Subtilisin	Asp, His, Ser	F, W, Y
SC	2	Prolyl oligopeptidasa	Ser, Asp, His	G, P
SE	6	D-Ala-D-Ala karboxypeptidasa	Ser, Lys	D-A
SF	3	LexA peptidasa	Ser, Lys/His	A
SH	2	Asemblin cytomegaloviru	His, Ser, His	A
SJ	1	Lon peptidasa	Ser, Lys	K, L, M, R, S
SK	2	Clp peptidasa	Ser, His, Asp	A
SP	3	Nukleoporin	His, Ser	F
SQ	1	Amino-peptidasa DmpA	Ser	A, G, K, R
SR	1	Laktoferin	Lys, Ser	K, R
SS	1	L, D-karboxypeptidasa	Ser, Glu, His	K
ST	5	Rhomboid	His, Ser	D, E

Tab. 1: Obecné vlastnosti serinových proteas. V tabulce je uvedena zkratka klanu, počet rodin, zástupce daného klanu, katalytické zbytky a primární specifita. Několik členů každého klanu může poskytnout široké spektrum primárních specifických míst, o čemž svědčí PA, SJ a SQ klany. Upraveno dle Di Cera, 2009.

Dle Ovaere *et al.* (2009), mohou být na základě substrátové specifity serinové proteasy rozděleny do skupiny typu trypsinu (štěpí peptidové vazby za kladně nabitými aminokyselinami, Arg a Lys), typu chymotrypsinu (enzymy mají specifitu štěpit za středními nebo velkými hydrofobními zbytky jako jsou aminokyseliny Tyr, Phe a Trp), do skupiny typu elastasy (tyto enzymy dávají přednost štěpení za Ala, Gly a Val) a typu subtilisinu (subtilisin je serinová proteasa prokaryot). K serinovým proteasám řadíme tyto známé enzymy: trombin, trypsin, chymotrypsin, granzym, elastasa. V Tabulce 2 jsou uvedeni někteří zástupci serinových proteas.

Cysteinové proteasy, známé též jako thiolové proteasy, mají společný katalytický mechanismus, který vyžaduje přítomnost nukleofilního cysteinového thiolu v katalytické triádě nebo dyádě (dvojici). Tyto proteasy mají nezaměnitelnou roli prakticky v každém aspektu fyziologie a vývoje. V rostlinách jsou důležité pro růst, vývoj, hromadění a mobilizaci zásobních proteinů obsažených v semenech. Dále se zapojují do signálních drah vyvolaných reakcí na biotický a abiotický stres. U člověka a jiných živočichů jsou zodpovědné za stárnutí, apoptózu, imunitní odpověď MHC třídy 2, zpracování prohormonů (Grudkowska & Zagdańska, 2004; Chapman *et al.*,

1997). Jsou přítomny ve virech, bakteriích, v prvocích, rostlinách a také u savců. Dále byly objeveny v houbách (Otto & Schirmeister, 1997). Cysteinové proteasy se běžně vyskytují v ovoci, kde je jejich obsah vyšší u nezralého plodu. Mezi nejznámější cysteinové proteasy patří papain, bromelain, katepsiny, kalpainy. Papain a cystein v latexu stromu papája jsou klíčovým faktorem v obraně stromu proti motýlím larvám (Konno *et al.*, 2004). Databáze MEROPS řadí cysteinové proteasy celkem do čtrnácti klanů, které jsou následně členěny na mnoho rodin. V Tabulce 3 jsou uvedeni někteří zástupci cysteinových proteas.

Asparaginové proteasy či asparaginové peptidové lyasy se vyznačují neobvyklým proteolytickým mechanismem, neboť provádí spíše eliminační reakci než hydrolýzu (Rawlings *et al.*, 2011). V průběhu reakce vytváří katalytický asparagin cyklickou chemickou strukturu. Vzhledem k tomu, že je mechanismus reakce značně odlišný, zařazení mezi peptidasy je diskutabilní. Na základě podobnosti sekvencí byly tyto proteasy rozděleny do deseti rodin. V Tabulce 4 jsou uvedeni někteří zástupci asparaginových peptidových lyas.

Glutamátové proteasy obsahují v aktivním místě zbytek glutamové kyseliny. Tyto proteasy byly dříve řazeny mezi aspartátové proteasy, ale po zjištění struktury byly zařazeny do nové rodiny. První struktura byla zjištěna u scytadiliumglutamové peptidasy, která obsahuje katalytickou dyádu, kyselinu glutamovou a glutamin. Patří sem proteasy nacházející se především v patogenních houbách, dále pak u vláknitých hub zejména u kmene *Ascomycota*, dále pak u archea a bakterií (Oda, 2012). Podle MEROPSu jsou řazeny glutamátové proteasy do dvou rodin. Rodina G1 obsahuje v aktivním místě zbytky kyseliny glutamové a glutaminu, rodina G2 obsahuje zbytky kyseliny glutamové a kyseliny aspartátové. Tyto enzymy jsou kyselé proteasy, např. eqolisin má nejvyšší aktivitu při pH 2,0 v případě použití kaseinu jako substrátu. Glutamátovou proteasou je např. scytalidopepsin D. V Tabulce 5 jsou uvedeni někteří zástupci glutamátových proteas.

Threoninové proteasy nesou v aktivním místě threoninový zbytek, který je nukleofilem v katalytické triádě. Prototypy této třídy enzymů tvoří katalytickou podjednotku proteazomu. V Tabulce 6 jsou uvedeni někteří zástupci threoninových proteas.

Metaloproteasy obsahují v aktivním místě kov, a to nejčastěji Zn^{2+} , některé však mohou obsahovat např. Co^{2+} nebo Mn^{2+} . Kovový ion aktivuje molekulu vody, bývá koordinován na protein přes tři ligandy, přičemž se tyto ligandy mohou měnit – histidin,

glutamát, aspartát, lysin a arginin (Rawlings & Barrett, 1995). Čtvrtou koordinační pozici zabírá labilní molekula vody, která je použita pro hydrolýzu. MEROPS databáze seskupuje metaloproteasy podle katalytického typu, kde první znak reprezentuje katalytický typ: A – kyselina aspartátová, C – cystein, G – kyselina glutamová, M – metalo, S – serin, T – threonin, U – neznámé. Nukleofilem je zde aktivovaná molekula vody. Ze všech proteas patří metaloproteasy k nejrozmanitější skupině s více než padesáti rodinami. Zinkové metaloproteasy jsou velmi rozšířené v bakteriálním světě (Hase & Finkelstein, 1993).

Metaloproteasy mohou být rozděleny podle místa hydrolýzy cílového proteinu na metaloexopeptidasy (př. karboxypeptidasa A) a metaloendopeptidasy (thermolysin). V Tabulce 7 jsou uvedeni někteří zástupci metaloproteas.

Aspartátové proteasy jsou první lidstvem poznány a zároveň první popsané proteasy (Szecsi, 1992). Bývají syntetizovány v neutrálním prostředí jako inaktivní zymogeny. Jsou vysoce specifické, mají tendenci štěpit dipeptidické vazby, které mají hydrofobní zbytky (tak jako skupina β -methyleny). Při štěpení se netvoří kovalentní meziproduct a proteolýza proto probíhá v jednom kroku. Obecně mají tyto proteasy v aktivním místě dvě vysoce konzervované asparagové kyseliny a také katalyticky vázanou vodu, obvykle fungují v kyselém prostředí (Tang & Wong, 1987). Dle MEROPSu jsou aspartátové proteasy řazeny do pěti klanů, a to do klanu AA (např. pepsinová rodina), klan AC (např. rodina signálních peptidas II), klan AD (např. rodina presenilinu), klan AE (např. rodina GPR endopeptidas) a klan AF (např. rodina omptinu). K aspartátovým proteasám patří např. pepsin, renin, katepsin D, chymosin. V Tabulce 8 jsou uvedeni někteří zástupci aspartátových proteas.

Klany serinových proteas

KLAN	RODINA	TYP PEPTIDASY
SB	S8	subtilisin Carlsberg (<i>Bacillus licheniformis</i>)
	S53	sedolisin (<i>Pseudomonas sp. 101</i>)
SC	S9	prolyl oligopeptidasa (<i>Sus scrofa</i>)
	S10	karboxypeptidasa Y (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	S15	Xaa-Pro dipeptidyl-peptidasa (<i>Lactococcus lactis</i>)
	S28	lyzozomální Pro-Xaa karboxypeptidasa (<i>Homo sapiens</i>)
	S33	prolyl aminopeptidasa (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)
	S37	PS-10 peptidasa (<i>Streptomyces lividans</i>)
SE	S11	D-Ala-D-Ala karboxypeptidasa A (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)
	S12	D-Ala-D-Ala karboxypeptidasa B (<i>Streptomyces lividans</i>)
	S13	D-Ala-D-Ala peptidasa C (<i>Escherichia coli</i>)
SF	S24	represor LexA (<i>Escherichia coli</i>)
	S26	signální peptidasa I (<i>Escherichia coli</i>)
SH	S21	assemblin cytomegaloviru (lidský herpesvirus 5)
	S73	gpO peptidasa (<i>Enterobacteria phage P2</i>)
	S77	prokapsidová peptidasa gp21 (<i>Enterobacteria phage T4</i>)
	S78	prokapsidová peptidasa (<i>Enterobacteria phage HK97</i>)
	S80	prokapsidová peptidasa gp175 (<i>Pseudomonas phage phiKZ</i>)
SJ	S16	Lon-A peptidasa (<i>Escherichia coli</i>)
	S50	Peptidasa infekčního pankreas nekrotizujícího birnaviru Vp4 (infekční nekróza slinivky)
	S69	peptidasa Tellina viru 1 VP4 (<i>Tellina virus 1</i>)
SK	S14	peptidasa Clp (<i>Escherichia coli</i>)
	S41	C-terminalní konec zpracovávající peptidasa 1 (<i>Escherichia coli</i>)
	S49	peptidasa signálního peptidu A (<i>Escherichia coli</i>)
SO	S74	samoštěpící protein endo-sialidasy CIMCD fága K1F <i>E. coli</i> (<i>Enterobacteria phage K1F</i>)
SP	S59	nukleoporin 145 (<i>Homo sapiens</i>)
SR	S60	laktoferin (<i>Homo sapiens</i>)
SS	S66	LD-carboxypeptidasa murein tetrapeptidasy (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
ST	S54	rhomboid-1 (<i>Drosophila melanogaster</i>)
napřířazen	S48	HetR peptidasa (<i>Anabaena variabilis</i>)
	S62	PA peptidasa chřipky A (<i>influenza A virus</i>)
	S68	PIDD proteinové jednotky 1 (<i>Homo sapiens</i>)
	S71	MUC1 samoštěpící mucin (<i>Homo sapiens</i>)
	S72	dystroglykan (<i>Homo sapiens</i>)
	S79	CARD8 samoštěpící protein (<i>Homo sapiens</i>)
	S81	destabilasa (<i>Hirudo medicinalis</i>)

Tab. 2: Proteasy serinového typu. Serinové proteasy jsou v tabulce uspořádané do klanů a následně do rodin, v závorce je uveden výskyt enzymu. Zdroj: <https://merops.sanger.ac.uk/>

Klany cysteinových proteas

KLAN	RODINA	TYP PEPTIDASY
CA	C1	papain (<i>Carica papaya</i>)
	C2	kalpain-2 (<i>Homo sapiens</i>)
	C6	peptidasa pomocné komponenty bramborového viru Y (bramborový virus Y)
	C10	streptopain (<i>Streptococcus pyogenes</i>)
	C12	ubiquitinyl hydrolasa L1 (<i>Homo sapiens</i>)
	C16	papainová peptidasa 1 koronaviru způsobujícího hepatitidu myši (virus myši hepatitidy)
	C19	ubiquitin-specifická peptidasa 14 (<i>Homo sapiens</i>)
	C28	L-peptidasa viru slintavky a kulhavky (virus slintavky a kulhavky)
	C31	cysteinová peptidasa α arteriviruprasečího reprodukčního a respiračního syndromu (virus zvyšující hladinu laktátdehydrogenasy)
	C32	cysteinová peptidasa arteriviru (virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat)
	C33	cysteinová peptidasa koňského arteriviru typu Nsp2 (koňský arteritis virus)
	C39	peptidasa zpracovávající bakteriocin (<i>Pediococcus acidilactici</i>)
	C47	stafopain A (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	C51	D-alanyl-glycyl-peptidasa (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	C54	autophagin-1 (<i>Homo sapiens</i>)
	C58	YopT peptidasa (<i>Yersinia pestis</i>)
	C64	Cezanne peptidase (<i>Homo sapiens</i>)
	C65	otubain-1 (<i>Homo sapiens</i>)
	C66	IdeS peptidasa (<i>Streptococcus pyogenes</i>)
	C67	CylD peptidasa (<i>Homo sapiens</i>)
	C70	AvrRpt2 peptidasa (<i>Pseudomonas syringae</i>)
	C71	pseudomurein endoisopeptidasa Pei (<i>Methanobacterium phage psiM2</i>)
	C76	peptidasa deubikvitinující virální protein (lidský herpesvirus 1)
	C78	UfSP1 peptidasa (<i>Mus musculus</i>)
	C83	γ -glutamylcystein dipeptidyltranspeptidasa (<i>Nostoc sp. PCC 7120</i>)
	C85	enzym deubikvitinující OTLD1 (<i>Homo sapiens</i>)
	C86	ataxin-3 (<i>Homo sapiens</i>)
	C87	deubikvitinující peptidasa nairoviru (virus Krymsko-konžské hemoragické horečky)
	C93	LapG peptidasa (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
	C96	McjB peptidasa (<i>Escherichia coli</i>)
	C98	USPL1 peptidasa (<i>Homo sapiens</i>)
	C101	OTULIN peptidasa (<i>Homo sapiens</i>)
	C102	GtgE peptidasa (<i>Salmonella enterica</i>)
C105	peptidasa 1 α papainového typu (virus opičí hemoragické horečky)	
C110	peptidasa kyfoskoliózy (<i>Mus musculus</i>)	
CD	C11	klostripain (<i>Clostridium histolyticum</i>)
	C13	legumain (<i>Canavalia ensiformis</i>)
	C14	kaspasa-1 (<i>Rattus norvegicus</i>)
	C25	gingipain RgpA (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	C50	separasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	C80	samoštěpící toxin RTX (<i>Vibrio cholerae</i>)
	C84	prtH peptidasa (<i>Tannerella forsythia</i>)

CE	C5	adenain (lidský <i>adenovirus typ 2</i>)
	C48	Ulp1 peptidasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	C55	YopJ protein (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)
	C57	peptidasa zpracovávající virus vakcinie I7L (<i>Vaccinia virus</i>)
	C63	peptidasa zpracovávající virus afrického moru prasat (virus afrického moru prasat)
	C79	ElaD peptidasa (<i>Escherichia coli</i>)
CF	C15	pyroglutamyl-peptidasa I (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)
CL	C60	sortasa A (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	C82	L,D-transpeptidasa (<i>Enterococcus faecium</i>)
CM	C18	peptidasa 2 viru hepatitidy C (<i>hepatitis C virus</i>)
CN	C9	peptidasa sindbis viru typu nsP2 (<i>Sindbis virus</i>)
CO	C40	dipeptidyl-peptidasa VI (<i>Lysinibacillus sphaericus</i>)
CP	C97	DeSI-1 peptidasa (<i>Mus musculus</i>)
CQ	C53	peptidasa pestiviru Npro (virus klasického moru prasat)
napřirazen	C7	peptidasa p29 viru houby kaštanu (<i>Cryphonectria hypovirus</i>)
	C8	peptidasa p48 viru houby kaštanu (<i>Cryphonectria hypovirus 1</i>)
	C21	peptidasa tymoviru (virus mozaiky tuřinu žlutého)
	C23	peptidasa carlaviru (<i>ASP virus</i>)
	C27	peptidasa viru zarděnek (<i>Rubella virus</i>)
	C36	peptidasa papainového typu nekrotického furoviru řepy žluté (virus řepy žluté, nekrotické povahy)
	C42	peptidasa papainového typu viru řepy žluté (virus řepy žluté)
	C75	AgrB peptidasa (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	C108	Prp peptidasa (<i>Staphylococcus aureus</i>)

Tab. 3: Proteasy cysteinového typu. Cysteinové proteasy jsou v tabulce uspořádány do klanů a následně do rodin, v závorce je uveden výskyt enzymu. Zdroj: <https://merops.sanger.ac.uk/>

Klany asparaginových peptidových lyas

KLAN	RODINA	TYP PEPTIDASY
NA	N1	peptidová lyasa nodaviru (<i>flock house virus</i>)
	N2	obalový protein tetraviru (<i>Nudaurelia capensis omega virus</i>)
	N8	samoštěpící protein kapsidového polioviru typu VP0 (lidský <i>poliovirus 1</i>)
NB	N6	YscU protein (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)
NC	N7	obalový protein reoviru typu 1 (savčí <i>orthoreovirus 1</i>)
ND	N4	Tsh-asociovaná samoštěpící doména apod. (<i>Escherichia coli</i>)
NE	N5	samoštěpící protein picobirnaviru (lidský <i>picobirnavirus</i>)

Tab. 4: Proteasy asparaginového typu. Asparaginové peptidové lyasy jsou v tabulce uspořádány do klanů a následně do rodin, v závorce je uveden výskyt enzymu. Zdroj: <https://merops.sanger.ac.uk/>

Klany glutamátových proteas

KLAN	RODINA	TYP PEPTIDASY
GA	G1	scytalidoglutamová peptidasa (<i>Scytalidium lignicolum</i>)
GB	G2	"pre-neck appendage" protein (bakteriofág <i>phi-29</i>)

Tab. 5: Proteasy glutamátového typu. Glutamátové proteasy jsou v tabulce uspořádány do klanů a následně do rodin, v závorce je uveden výskyt enzymu. Zdroj: <https://merops.sanger.ac.uk/>

Klany threoninových proteas

KLAN	RODINA	TYP PEPTIDASY
PB(T)	T1A	multikatalytická endopeptidasa (proteazom)
	T1B	peptidasa HslV komponenty HslUV (<i>Escherichia coli</i>)
	T2	glykosylasparaginasový prekurzor
	T3	γ -glutamyltransferasa 1
	T6	polycystin-1
TX	T5	ornithin acetyltransferasový prekurzor

Tab. 6: Proteasy threoninového typu. Threoninové proteasy jsou v tabulce uspořádány do klanů a následně do rodin, v závorce je uveden výskyt enzymu. Zdroj: <http://enzyme.expasy.org/peptidas.txt>

Klany metaloproteas

KLAN	RODINA	TYP PEPTIDASY
MA	M1	aminopeptidasa N (<i>Homo sapiens</i>)
	M2	peptidasa enzymu přeměňujícího angitensin (<i>Homo sapiens</i>)
	M3	thimet oligopeptidasa (<i>Rattus norvegicus</i>)
	M4	termolysin (<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>)
	M5	mykolysin (<i>Streptomyces cacaoi</i>)
	M6	peptidasa imunitního inhibitoru A (<i>Bacillus thuringiensis</i>)
	M7	snapalysin (<i>Streptomyces lividans</i>)
	M8	leishmanolysin (<i>Leishmania major</i>)
	M9	bakteriální kolagenasa V (<i>Vibrio alginolyticus</i>)
	M10	matrix metalopeptidasa-1 (<i>Homo sapiens</i>)
	M11	gametolysin (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)
	M12	astacin (<i>Astacus astacus</i>)
	M13	neprilysin (<i>Homo sapiens</i>)
	M26	IgA1-specifická metalopeptidasa (<i>Streptococcus sanguinis</i>)
	M27	tentoxilysin (<i>Clostridium tetani</i>)
	M30	hyicolysin (<i>Staphylococcus hyicus</i>)
	M32	karboxypeptidasa Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)
	M34	anthrax letální faktor (<i>Bacillus anthracis</i>)
	M35	deuterolysin (<i>Aspergillus flavus</i>)
	M36	fungalysin (<i>Aspergillus fumigatus</i>)
	M41	FtsH peptidasa (<i>Escherichia coli</i>)
	M43	cytofagalysin (<i>Cytophaga sp.</i>)
	M48	Ste24 peptidasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	M49	dipeptidyl-peptidasa III (<i>Rattus norvegicus</i>)
	M54	archaelysin (<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>)
	M56	BlaR1 peptidasa (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	M57	prtB g.p. (<i>Myxococcus xanthus</i>)
	M60	enhancin (<i>Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus</i>)
	M61	glycyl-aminopeptidasa (<i>Sphingomonas capsulata</i>)
	M64	IgA peptidasa (<i>Clostridium ramosum</i>)
M66	StcE peptidasa (<i>Escherichia coli</i>)	
M72	peptidyl-Asp metalopeptidasa (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	
M76	Atp23 peptidasa (<i>Homo sapiens</i>)	
M78	ImmA peptidasa (<i>Bacillus subtilis</i>)	
MA	M80	Wss1 peptidasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	M84	MpriBi peptidasa (<i>Bacillus intermedius</i>)
	M85	NleC peptidasa (<i>Escherichia coli</i>)
	M90	MtfA peptidasa (<i>Escherichia coli</i>)
	M91	NleD peptidasa (<i>Escherichia coli</i>)

	M93	BACCAC_01431 g.p. apod. (<i>Bacteroides caccae</i>)
	M97	EcxAB peptidasa (<i>Escherichia coli</i>)
	M98	YghJ g.p. (<i>Escherichia coli</i>)
MC	M14	karboxypeptidasa A1 (<i>Homo sapiens</i>)
	M86	PghP γ -polyglutamát hydrolasa (<i>Bacillus phage phiNIT1</i>)
	M99	Csd4 peptidasa (<i>Helicobacter pylori</i>)
MD	M15	zinková D-Ala-D-Ala karboxypeptidasa (<i>Streptomyces albus</i>)
	M74	murein endopeptidasa (<i>Escherichia coli</i>)
ME	M16	pitrilysin (<i>Escherichia coli</i>)
	M44	metalopeptidasa poxviru (<i>Vaccinia virus</i>)
MF	M17	leucin aminopeptidasa 3 (<i>Bos taurus</i>)
MG	M24	methionyl-aminopeptidasa 1 (<i>Escherichia coli</i>)
MH	M18	aminopeptidasa I (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	M20	glutamát karboxypeptidasa (<i>Pseudomonas sp.</i>)
	M28	aminopeptidasa S (<i>Streptomyces griseus</i>)
	M42	glutamyl-aminopeptidasa (<i>Lactococcus lactis</i>)
MJ	M19	membránová dipeptidasa (<i>Homo sapiens</i>)
	M38	isoaspartyl dipeptidasa (<i>Escherichia coli</i>)
MM	M50	S2 peptidasa (<i>Homo sapiens</i>)
MN	M55	D-aminopeptidasa DppA (<i>Bacillus subtilis</i>)
MO	M23	β -lytická metalopeptidasa (<i>Achromobacter lyticus</i>)
MP	M67	RPN11 peptidasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
MQ	M29	aminopeptidasa T (<i>Thermus aquaticus</i>)
MS	M75	imelysin (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
MT	M81	mikrocystinasy MlrC (<i>Sphingomonas sp. ACM-3962</i>)
napřířazen	M73	camelysin (<i>Bacillus cereus</i>)
	M77	tryptofanyl aminopeptidasa typu 7-DMATS (<i>Aspergillus fumigatus</i>)
	M79	RCE1 peptidasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	M82	PrsW peptidasa (<i>Bacillus subtilis</i>)
	M87	přídavný protein 1 chloridového kanálu (<i>Homo sapiens</i>)
	M88	IMPa peptidasa (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	M96	Tiki1 peptidasa (<i>Homo sapiens</i>)

Tab. 7: Metaloproteasy. Metaloproteasy jsou v tabulce uspořádané do klanů a následně do rodin, v závorce je uveden výskyt enzymu. Zdroj: <https://merops.sanger.ac.uk/>

Klany aspartátových proteas

KLAN	RODINA	TYP PEPTIDASY
AA	A1	pepsin A (<i>Homo sapiens</i>)
	A2	HIV-1 retropepsin (virus lidské imunitní nedostatečnosti 1)
	A3	peptidasa viru květákové mozaiky (virus květákové mozaiky)
	A9	spumapepsin (lidský <i>spumaretrovirus</i>)
	A11	peptidasa Copia transposonu (<i>Drosophila melanogaster</i>)
	A28	protein 1 navozující poškození DNA (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	A32	PerP peptidasa (<i>Caulobacter crescentus</i>)
AC	A8	signální peptidasa II (<i>Escherichia coli</i>)
AD	A22	presenilin 1 (<i>Homo sapiens</i>)
	A24	peptidasa 1 prepilinu typu 4 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
AE	A25	gpr peptidasa (<i>Bacillus megaterium</i>)
	A31	HybD peptidasa (<i>Escherichia coli</i>)
AF	A26	omptin (<i>Escherichia coli</i>)
napřirazen	A5	termopsin (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)
	A36	sporulační faktor SpoIIIGA (<i>Bacillus subtilis</i>)

Tab. 8: Proteasy aspartátového typu. Aspartátové proteasy jsou v tabulce uspořádány do klanů a následně do rodin, v závorce je uveden výskyt enzymu. Zdroj: <https://merops.sanger.ac.uk/>

3.1.2 Výskyt proteas

Proteasy se vyskytují ve všech organismech, od prokaryot přes eukaryota až po viry. Tyto enzymy se zúčastňují mnoha fyziologických reakcí, a to např. trávení bílkovin (digestivní funkce) či mohou být součástí vysoce regulovaných kaskád (regulační funkce). Proteasy hrají klíčovou roli při fyziologických procesech a při přestavbě tkání střevní bariéry (Giuffrida *et al.*, 2014).

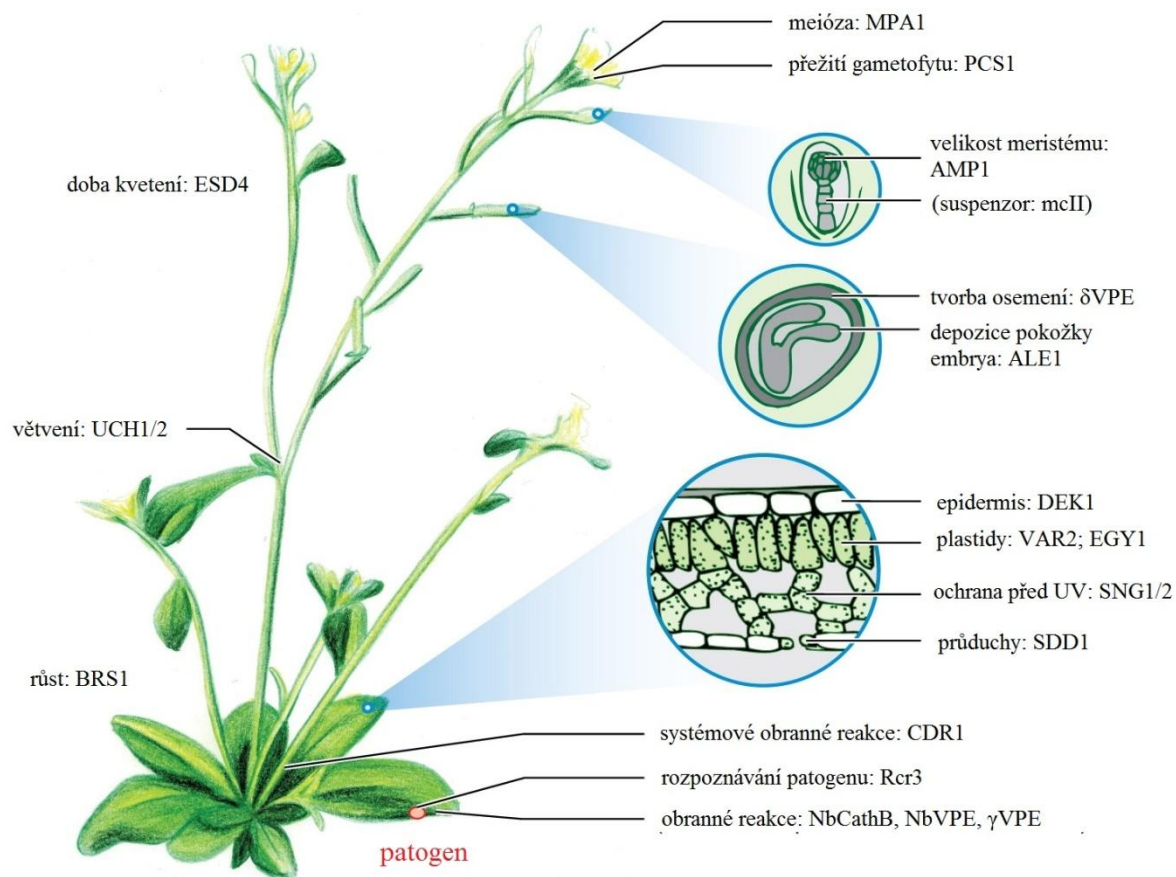
V žaludku se vyskytuje pepsin a rennin, v pankreatu trypsin, chymotrypsin a karboxypeptidasa. Enzymy aminopeptidasa, dipeptidasa, aminotripeptidasa, prolidasa a enterokinasa jsou obsaženy v tenkém střevě. V krvi se např. vyskytují trombin a plasmin (fibrinolysin). Jiné tkáně mohou obsahovat katepsiny (Neilands & Stumpf, 1961).

V lidském organismu jsou přítomny tyto aspartátové proteasy: β -sekretasa 1 (BACE1), β -sekretasa 2 (BACE2), kathepsin D, kathepsin E, chymosin, napsin-A, nepenthesin, pepsin, plasmepsin, presenilin, renin. Obvykle fungují v kyselém prostředí (Tang & Wong, 1987), tzn. funkce aspartátových proteas je omezena prostředím, aspartátové proteasy se vyskytují v menší míře než jiné skupiny proteas. Nejznámějším

zdrojem aspartátových proteas je žaludek (pepsin, gastricsin a chymozin) lysozomy (katepsiny D a E), ledviny (renin), kvasinky a houby.

Rostliny pomocí proteas degradují nefunkční bílkoviny na aminokyseliny. Rostlinné proteasy jsou klíčovými regulátory markantní řady biologických procesů, včetně meiosis, přežití gametofytu, embryogeneze, depozice kutikuly, vývoje průduchů a plastidů, biogeneze chloroplastů, růstu, lokálních a systémových obranných reakcí, a jsou specificky exprimovány v čase i prostoru a následně akumulovány v subcelulárních strukturách (van der Hoorn, 2008). Proteasy jsou pro rostliny velmi důležité. Mutace proteas mají často za následek smrt rostliny (např. DEK1, ALE1 a PCS1), nebo také zhoršení zdravotního stavu rostliny (např. ESD4, VAR2, EGY1 a MPA1), zatímco mutace některých proteas působí redundantně (např. VAR2, VPEs, BRS1 a UCH1/2), anebo jsou smrtelné, pokud jsou oba geny mutované (např. VAR2/FtsH8), viz Obr 1. Redundance a úmrtnost spojená s mutacemi proteas omezuje možnosti, které by vedly ke genetickým změnám. Mezi rostlinné proteasy řadíme papain, ficin, bromelain.

K bakteriálním proteasám řadíme tyto enzymy: želatinasa (K-toxin), dipeptidasa, subtilisin (Neilands & Stumpf, 1961).



Obr. 1: Biologické role rostlinných proteas. Funkce proteas pro různé etapy v životě rostlin: meióza (MPA1); přežití gametofytu (PCS1); formace suspensoru (mcII-Pa); depozice pokožky embrya (ALE1); tvorba osemení (δ VPE); velikost meristému (AMP1); osud epidermální buňky (DEK1); vývoj průduchů (SDD1); vývoj chloroplastů (VAR2); vývoj plastidů (EGY1); růst (BRS1); ochrana před UV zářením (SNG1); rozpoznávání patogenu (Rcr3); obranné reakce (NbCathB, NbVPE, γ VPE); systémové obranné reakce (CDR1); doba kvetení (ESD4); a větvení (UCH1 / 2). (Upraveno dle van der Hoorn, 2008).

3.1.3 Inhibitory proteas

Činnost proteas je inhibována řadou sloučenin. Inhibitory se člení dle výše uvedeného rozdělení proteas, např. inhibitory serinových proteas, inhibitory cysteinových proteas, atd. Za fyziologických podmínek existuje rovnováha mezi proteasami a jejich inhibitory. Aktivitu enzymu ovlivňují vazbou v jeho aktivním místě. Jsou to obvykle bílkoviny s doménami, které blokují nebo vstupují do aktivního místa proteasy a tak zabraňují přístupu substrátu. Při kompetitivní inhibici se inhibitor váže na aktivní místo, čímž se zabrání interakci enzym-substrát. U nekompetitivní inhibice se inhibitor váže mimo vazebné místo enzymu, nebrání vazbě substrátu na enzym, ale snižuje rychlost přeměny substrátu na produkt.

Serinové proteasy jsou spárovány s inhibitory serinových proteas v případě, kdy už nejsou potřeba. Serinové proteasy jsou inhibovány různorodou skupinou inhibitorů, včetně syntetických či chemických inhibitorů (pro výzkumné a terapeutické účely), a také přírodními proteinovými inhibitory. Mezi přirozené inhibitory patří rodina serpinů, které mohou tvořit kovalentní vazbu se serinovými proteasami a tak inhibovat jejich funkci. Nejlépe prozkoumanými serpiny jsou antitrombin a α -1-antitrypsin, studované pro jejich roli při koagulaci (Breugelmans *et al.*, 2009). V přírodě jsou inhibitory proteas využívány v obranném mechanismu rostlin. Příkladem může být inhibitor trypsinu obsažený v semenech některých rostlin. Například v sójových bobech odrazuje predátory. Syrové sojové boby jsou toxické pro mnoho živočichů, včetně člověka, dokud nejsou denaturovány inhibitory proteas, které obsahují.

Téměř všechny známé aspartátové proteasy jsou inhibovány pepstatinem, pentapeptidem, jenž je produkován různými druhy *Actinomyces* (Szecsi, 1992). Po ošetření metaloproteas chelatačními činidly, jako je ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), dojde k úplné inaktivaci. EDTA odstraňuje z proteas zinek, který je nezbytný pro její aktivitu. Aspartátové proteasy mohou být dále inhibovány i chelátorem *o*-fenantrolinem.

Glutamátové proteasy mohou být inhibovány 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrofenoxy)propanem (EPNP).

K cysteinovým inhibitorům patří serpiny, stefiny a inhibitory apoptózy (IAP).

3.1.4 Využití proteas

Proteasy jsou hojně využívány v průmyslu, medicíně i také jako základní biologický nástroj, z tohoto hlediska je tedy jejich oblast výzkumu obrovská. Trávicí proteasy jsou součástí mnoha pracích prostředků, odstraňují skvrny obsahující bílkoviny. Uplatnění nacházejí v kožedělném průmyslu, při zpracování vlny a surového hedvábí. Pro lepší absorpci živin jsou přidávány do krmiva zvířat. Jiné jsou využívány z lékařského hlediska, např. řídí srážení krve, cíleně odbourávají patogenní proteiny. Velký význam mají při účasti v zánětlivé reakci a apoptóze, při kontrole koagulace či trávení bílkovinné potravy.

Proteasy hrají značnou roli v angiogenezi (proces tvorby nových krevních cév z již existujících cév), a to jak ve vývoji, tak i zejména při patologických stavech. Angiogeneze je rozhodující během normálního fyziologického vývoje, u dospělých se vyskytuje v průběhu zánětu, hojení ran, ischemii, a při patologických stavech, jako je

revmatoidní artritida, hemangiom a rozvoji nádoru (Hublica *et al.*, 1992; Hanahan & Folkman, 1996). Vzhledem k tomu, že jsou důležitými regulátory degradace tkáně a migrace buněk, předpokládá se, že jejich inhibice by byla vhodná pro inhibici nádorového růstu a vaskularizaci (vznik krevních cév v tkáni). Slibné výsledky byly pozorovány při studiích na zvířatech, ale klinické studie podobné výsledky neprokázaly a jsou často doprovázeny vedlejší účinky (Coussens *et al.*, 2002).

Serinové proteasy mohou být značně užitečné v diagnostice, např. stanovení hladiny serinových proteas může být požadováno pro zjištění koagulačního faktoru v diagnostice hemoragických nebo trombotických stavů. Stanovení elastasy je využíváno ke stanovení exokrinní aktivity pankreatu, tedy k průkazu cystické fibrózy či chronické pankreatidy. Serinové proteasy jsou důležitým diagnostickým markerem pro hypersenzitivní reakci typu 1 (př. anafylaxe).

Cysteinové proteasy se používají jako doplňkové látky pro výživu dobytka ke zlepšení stravitelnosti bílkovin. Rostlinné cysteinové proteasy, z plodů či latexu rostlin, jako jsou papája, ananas, mají vysokou proteolytickou aktivitu vůči kutikule hlístic, mají nízkou toxicitu a jsou po celá desetiletí používány v tradiční medicíně proti hlísticím (Stepek *et al.*, 2004).

3.1.5 Bromelain

Bromelain může označovat jeden ze dvou proteasových enzymů extrahovaných z rostliny čeledi *Bromeliaceae*. Nejvíce prostudovaný je bromelain z ananasu (*Ananas comosus*). Známe bromelain obsažený ve stonku (EC 3.4.22.32) a bromelain obsažený v ovoci (EC 3.4.22.33). Řadíme jej mezi cysteinové proteasy. Bromelain štěpí proteiny, peptidy, amidy a estery aminokyselin a peptidů. Preferuje místo štěpení na karbonylovém konci Lys, Ala, Tyr a Gly (IUMBM databáze; Godfrey & Reichelt, 1983). Molekulová hmotnost bromelainu je 23 kDa. Bromelain je glykoprotein, je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem s jedním sacharidovým postranním řetězcem (Ritonja *et al.*, 1989). Bromelain obsahuje 212 aminokyselin. NH₂-terminální aminokyselinou je Val, COOH-terminální je Gly.

Nejvyšší koncentrace enzymu je obsažena ve spodní části stonku rostliny ananasu, velké množství je obsažené i v ovoci a v listech. Ze stonku ananasu se bromelain získává oloupáním, rozdrcením a vylisováním šťávy. Další kroky zahrnují přečištění a zkoncentrování enzymu.

Optimální hodnota pH pro katalytickou aktivitu je závislá na povaze substrátu, typu a koncentraci pufru a přítomnosti či nepřítomnosti redukčního činidla. Optimální rozmezí pH je asi 4.5-7.5. Optimální teplota vzhledem k zachování enzymu je v rozsahu 35-45°C (Stellmach, 1988). Při vyšší teplotě, např. při 50°C je po hodině zachováno 83 % enzymu, zatímco při 40°C zůstává zachováno téměř 100 % enzymu (Jutamongkon & Charoenrein, 2010).

Enzym ve formě prášku je částečně rozpustný ve vodě a nerozpustný ve většině organických rozpouštědel. Stabilní je při pH 3-6 a při teplotě až do 60°C (Stellmach, 1988). Bromelainový prášek může být skladován po dobu dvou let při teplotě nižší než 8°C beze ztráty aktivity. Ztrátě aktivity v důsledku nesprávného skladování se může předejít přidáním cysteinu.

Bromelain obsahuje v aktivním centru vysoce reaktivní cystein, jenž je nezbytný pro katalýzu. Enzym může být aktivován redukčními sloučeninami, jako jsou cystein, 2-merkapt ethanol, dithiothreitol, KCN. Naopak nevratně inhibován může být alkylačními činidly, např. *N*-ethylmaleinimid (NEM), kyselina jodoctová a 1,3-dibromaceton (Lauwers & Scharpe, 1997). Reverzibilní inhibici způsobují ionty rtuti, organické sloučeniny rtuti a tetrathionan (Lauwers & Scharpe, 1997).

Bromelain je společně s papainem využíván k tenderizaci (urychlenému dozrávání) masa (Chaurasiya *et al.*, 2015).

V Evropě je pod obchodním názvem NexoBrid schválen koncentrát proteolytických enzymů obohacených o bromelain. Aplikuje se na popáleniny a používá se k odstranění popálené tkáně z hlubokých nebo částečně hlubokých popálenin kůže. Tento přípravek výrazně snižuje nutnost chirurgického odstranění poškozené tkáně (Rosenberg *et al.*, 2014). Bromelain má vliv na inhibici agregace krevních destiček, fibrinolytickou aktivitu, má protizánětlivý účinek, léčivý účinek na tkáně poškozené popáleninami, zvyšuje absorpci jiných léčiv, dále má mukolytické vlastnosti (snižování vaznosti hlenu, usnadnění vykašlávání), napomáhá trávení, zlepšuje hojení ran a má příznivý vliv na kardiovaskulární a oběhový systém (Blumenthal *et al.*, 2000). Bromelain je po orálním podání u zvířat absorbován zažívacím traktem, v krvi je zjištěno až 40 % molekulové hmotnosti původního enzymu. Nejvyšší koncentrace bromelainu se nachází v krvi 1 hodinu po podání, avšak, jeho proteolytická aktivita se rychle deaktivuje, pravděpodobně běžnými plasmatickými proteasami a sérovým α -2-makroglobulinem. Bromelain byl úspěšně použit jako trávicí enzym v případě exokrinní pankreatické nedostatečnosti a jiných střevních potíží.

Vzhledem k působení v širokém rozmezí pH, je bromelain aktivní jak v žaludku, tak i v tenkém střevě. Bylo také prokázáno, že bromelain může sloužit jako adekvátní náhrada za pepsin či trypsin v případě jejich nedostatku (Blumenthal *et al.*, 2000). Pro své potencionální protizánětlivé účinky bývá využit při léčbě artritidy (Brien *et al.*, 2004). U většiny studií vyvstává problém z hlediska metodiky, není definitivně stanovena účinnost, doporučená denní dávka či nežádoucí interakce s jinými léčivy.

3.1.6 Papain

Papain (EC 3.4.22.2) je řazen mezi cysteinové proteasy. Molekulová hmotnost papainu je 23,4 kDa. Prekurzor papainu, prepropapain, obsahuje 345 aminokyselin, samotný papain se pak skládá z 212 aminokyselin (Mitchel *et al.*, 1970). Je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem, stabilizován třemi disulfidovými můstky a jeho trojrozměrná struktura se skládá ze dvou odlišných strukturních domén. Mezi nimi je štěrbina obsahující aktivní místo. V aktivním centru se nachází vysoce reaktivní Cys-25, jenž je nezbytný pro katalýzu. Společně s His-159 a Asn-175 tvoří katalytickou triádu. Papain hydrolyzuje širokou škálu proteinů a peptidů. Navíc má také esterasovou, thiolesterasovou, transesterasovou a transamidasovou aktivitu. Vykazuje zvláštní specifickou substrátovou preferenci především pro objemné hydrofobní nebo aromatické zbytky. Papain preferuje toto štěpení: (hydrofobní aminokyselina) - (Arg nebo Lys) - štěpí zde - (nesmí být Val); hydrofobní je Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp nebo Tyr.

Nachází se v latexu listů a v zelených plodech stromu papáji (*Carica papaya*, *Vasconcellea cundinamarcensis*). Získává se nařezáváním plodů, zachycená tekutina se suší a následně přečišťuje. Společně s papainem se vyskytuje chymopapain. Oproti papainu je obsažen ve vyšším množství, ale jeho účinky jsou poloviční. Obsah enzymu v plodech zrání klesá.

Papain vykazuje maximální aktivitu při pH 4.0-7.0. Je relativně tepelně rezistentní, s optimálním teplotním rozsahem 60-70°C. Papain je nestabilní v kyselém prostředí, při hodnotách pH nižších než 2.8 dochází rychle a nevratně k inaktivaci enzymu (Lauwers & Scharpe, 1997; Arnon, 1970).

Papain vykazuje vysokou stabilitu vůči močovině a organickým rozpouštědlům. Vystavením až 9 M močovině, 70% methanolu, 15% dimethylsulfoxidu (DMSO) nebyla způsobena žádná ztráta aktivity (Lauwers & Scharpe, 1997; Arnon, 1970).

Papain je téměř úplně rozpustný ve vodě, avšak je nerozpustný ve většině organických rozpouštědel.

Použitím mírných redukčních činidel, jako je cystein, sulfid, kyanid nebo kyselina thioglykolová, doplněné o chelátor (př. EDTA), nebo přidáním 2,3-dimercaptopropanolu, může dojít k aktivaci papainu (Lauwers & Scharpe, 1997; Arnon, 1970). Mezi aktivátory patří i siřičitany či *N*-bromsukcinimid. Enzym je inhibován těžkými kovy (např. Hg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}), H_2O_2 ale i vzduchem. Nevratnou inhibici způsobují alkylační činidla, jako jsou *p*-chlór-merkurybenzoát (PCMB), NEM a jodacetát (White J. & White D., 1997). Dalšími inhibitory jsou fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), tosyl-L-lysin chlormethyl keton (TLCK), α -2-makroglobulin, 4-(2-aminoethyl)benzensulfonyl fluorid (AEBSF), antipain, cystatin a karbonylová činidla.

Papain se v práškové formě, společně s bromelainem, využívá k tenderizaci masa.

Dále se používá při studiu struktury proteinů, mapování peptidů, pro modifikaci buněčného povrchu pro screening nebo identifikaci protilátek, přípravu Fab fragmentů z protilátek IgG a IgM, a také pro rozpouštění integrálních membránových proteinů. Také se využívá jako přísada do různých enzymových přípravků, např. Accuzyme. Ten se používá k ošetření některých chronických ran především k vyčištění od mrtvé tkáně. Papája zlepšuje imunitní systém a brání nemocem, jako jsou opakující se ušní infekce, nachlazení a chřipka (Chukwuemeka & Anthonia, 2010). Extrakty z papáje vykazovaly inhibiční účinek na gram-pozitivní bakterie a gram-negativní bakterie, příkladem jsou tyto organismy: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* a *Proteus vulgaris* (Emeruwa, 1982). U lidí, po léčbě antibiotiky, pomáhá šťáva z papáje obnovit normální střevní flóru zničenou antibiotiky. Slupky papáje slouží jako obklad pro léčení kožních ran, které se rychle nehojí (Chukwuemeka & Anthonia, 2010).

Papain se přidává do některých zubních past jako bělidlo. Účinek bělení je však minimální, protože koncentrace papainu je nízká a navíc je pak ředěn slinami (Chakravarthy & Acharya, 2012).

3.1.7 Trypsin

Trypsin (EC 3.4.21.4) je trávicí enzym vyskytující se v zažívacím ústrojí mnoha obratlovců. Patří do skupiny hydrolas, konkrétně je řazen do serinových proteas.

Trypsin je produkován slinivkou břišní ve formě proenzymu trypsinogenu. Působením enterokinasy nebo trypsinem na trypsinogen, vzniká aktivní forma trypsinu. Trypsinogen může být aktivován odstraněním terminálního hexapeptidu, čímž se získá jednořetězcový β -trypsin. Následným omezením autolýzy se vytváří další aktivní formy, které mají dva nebo více peptidových řetězců propojených disulfidovými vazbami. Převládají formy α -trypsinu, které mají dva peptidové řetězce, a β -trypsin, mající jeden řetězec.

Tento aktivační mechanismus je běžný pro většinu serinových proteas a zabraňuje automatické degradaci slinivky břišní. Trypsinogen, inaktivní forma trypsinu, je produkován acinózními exokrinními buňkami pankreatu. Po stimulaci slinivky cholecystokininem je pak vylučován do první části tenkého střeva, duodena, kde se účastní trávení proteinů. Molekulová hmotnost trypsinu je různá, přičemž záleží na zdroji. Hodnota 23,3 kDa je uváděna pro hovězí a prasečí trypsin. Lidský trypsin má molekulovou hmotnost 22,9 kDa (Feinstein *et al.*, 1974). V roce 1876 byl poprvé popsán trypsin i jeho proteasová aktivita, pojmenoval jej Kühne. 3D struktura hovězího trypsinu byla zjištěna v roce 1974 (Rawlings & Salvesen, 2013). V 90. letech 20. století byla zkoumána role trypsinu u dědičné pankreatitidy. Bylo zjištěno, že mutace v Arg117His je odpovědná za zabránění autolýzy, čímž způsobuje zánět slinivky břišní.

Trypsin je charakteristický specifitou štěpení, štěpí peptidový řetězec na karboxylovém konci aminokyselin argininu a lysinu. Pokud je na C-konci v místě štěpení prolin, ke štěpení nedochází. Podle Rodriguez *et al.*, 2008 dochází i ke štěpení před aminokyselinou prolinem. Toto štěpení není preferováno, avšak k němu může dojít. Enzymový mechanismus, tak jako u ostatních enzymů z rodiny serinových proteas, je stejný. Nejdůležitějším katalytickým reziduem je triáda His-57, Asp-102 a Ser-195 (Barrett *et al.*, 1998). Na obrázku 2 je znázorněna katalytická triáda trypsinu.

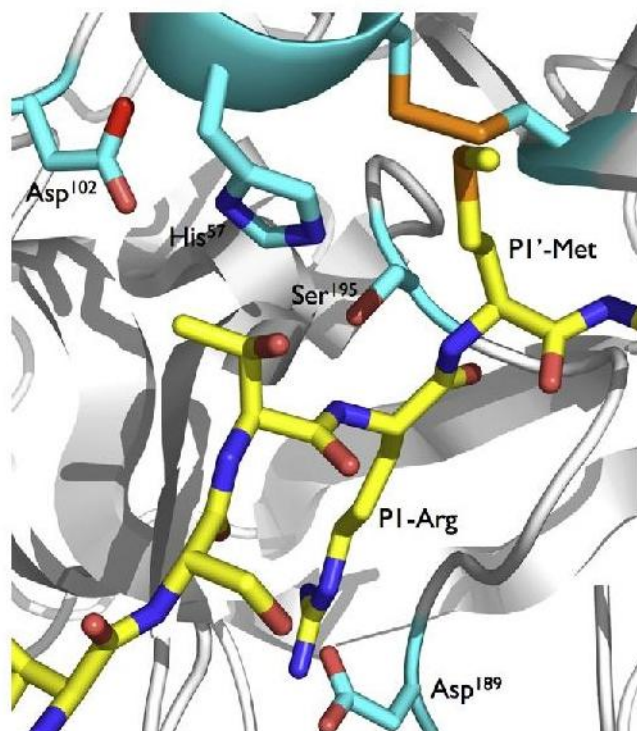
Srážením kyselinou trichloroctovou nebo v přítomnosti vysokých koncentrací močoviny (8 M) vede k reverzibilním ztrátám aktivity trypsinu (Keil, 1971). Lyofilizovaný trypsin skladovaný v chladu, suchu a ve tmě, je téměř neomezeně stabilní (Stellmach, 1988), měl by být skladován při teplotě -20°C až -80°C , aby se zabránilo autolýze. Optimální teplota pro funkci lidského trypsinu je 37°C (Hustoft *et al.*, 2012). Trypsin je rozpustný ve vodě a v isotonických solných roztocích.

Trypsin vykazuje nejvyšší stabilitu při hodnotě pH 3. Při tomto pH a při nízké teplotě si dokáže uchovat aktivitu po týdny (Keil, 1971; Walsh, 1970). Upravením pH

na hodnotu 8 je enzym opět aktivní. Při vyšší hodnotě pH může být autolýza trypsinu zpomalena přidáním vápenatých iontů. Tepelná denaturace závisí na hodnotě pH. Je-li pH nižší než 8, zvýšení teploty způsobuje reverzibilní denaturaci. Pokud je ale pH vyšší než 8, vysokou teplotou je způsobena denaturace nevratná (Walsh, 1970; Lauwers & Scharpe, 1997). Trypsin je rozpustný ve vodě a v izotonickém roztoku chloridu sodného. Optimálně působí při hodnotách pH 6 až 9 (Keil, 1971).

Trypsin je inhibován sloučeninami jako PMSF, diisopropylfosfluorid (DFP), také aromatickými a alifatickými aminy. Mezi inhibitory trypsinu jsou řazeny i EDTA, ionty Ag^+ (White J. & White D., 1997) a ekotin, dimerní periplasmatický protein z *Escherichia coli*. Nejsilnější nízkomolekulární kompetitivní inhibitor trypsinu je *p*-aminobenzamidin (Keil, 1971; Barman, 1985). Nevratnou inhibici trypsinu způsobuje TLCK (Keil, 1971; Walsh, 1970). Inhibitory trypsinu s vysokou molekulovou hmotností zahrnují polypeptidy a proteiny živočišného původu (aprotinin, α -2-makroglobulinu, α -1-antitrypsin atd.) i původu rostlinného, např. izolované ze sójových bobů, fazole měsíční a ječmene. Aktivita trypsinu není ovlivněna tosylfenylalanylchlormethylketonem (TPCK), irreverzibilním inhibitorem chymotrypsinu.

Při zpracování potravin je využíváno přípravků obsahujících směsi různých proteas zahrnujících trypsin. Tyto přípravky jsou pak použity např. pro zlepšení zpracovatelnosti těsta, k tenderizaci masa, při studené stabilizaci piva, zlepšení struktury rybích výrobků, k regulaci tvorby aromat u sýrů a mléčných výrobků. Trypsin se využívá pro přípravu vzorků pro průtokovou cytometrii, izolaci mitochondrií, in vitro studie proteinů, peptidové mapování, sekvencování, odstranění monovrstvy buněk z plastu a skla, snížení hustoty buněk v tkáňové kultuře, subkultivaci buněk, štěpení fúzních proteinů (White J. & White D., 1997).



Obr. 2: Aktivní místo trypsinu tvořící komplex s ekotinem (Rawlings & Salvesen, 2013). Rezidua katalytické triády, aminokyseliny Asp102, His57 a Ser195, jsou zobrazeny tyrkysově. Žlutě je zobrazen ekotin, makromolekulární proteasový inhibitor, interagující s Asp189.

3.1.8 Chymotrypsin

Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) je enzym patřící do skupiny proteas, konkrétně serinových proteas. Jedná se o trávicí enzym, je součástí pankreatické šťávy a účastní se proteolýzy ve dvanáctníku. Obsahuje 241 aminokyselin uspořádaných do tří polypeptidových řetězců, které jsou drženy pohromadě pomocí disulfidových můstků (Lauwers & Scharpe, 1997; Wilcox, 1970). Je znám ve třech formách, a to chymotrypsin A, B a C (označovány také jako α , β a γ). První dvě formy jsou až z 80 % identické. Molekulová hmotnost enzymu je přibližně 25 kDa (Lauwers & Scharpe, 1997). Peptidovou vazbu štěpí za velkými hydrofobními aminokyselinami (Phe, Trp a Tyr) a to na C-konci těchto aminokyselin. Ve slinivce břišní je produkován v inaktivní formě jako chymotrypsinogen a následně je vylučován acinárními buňkami slinivky břišní do dvanáctníku. Chymotrypsinogen je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem a skládá se z 245 aminokyselin (Hartley, 1964). Po stimulaci acinárních buněk hormonálním signálem nebo nervovým impulsem dochází k vylití proenzymu do dvanáctníku. Chymotrypsinogen je aktivován na svou aktivní formu π -chymotrypsin pomocí trypsinu. Tato forma se autokatalyzuje (štěpí sama sebe) na již aktivní α -chymotrypsin.

Katalytickou triádu tvoří aminokyselinové zbytky His57, Asp102 a Ser195, jsou nezbytné pro štěpení peptidové vazby a jsou stabilizovány vodíkovými vazbami (Blow, 1976).

Chymotrypsin je stabilní při skladování na suchém, chladném místě a je mírně rozpustný ve vodě. V roztoku je nejstálejší při hodnotě pH 3. Nad pH 10 přestává být enzym aktivní. Nejvyšší aktivitu vykazuje při hodnotách pH kolem 8.

Bylo prokázáno, že Ca^{2+} ionty zvyšují aktivitu chymotrypsinu a také stabilitu tohoto enzymu proti denaturaci. Aktivita enzymu je inhibována několika látkami s nízkou molekulovou hmotností, ale především velkým počtem látek s vysokou molekulovou hmotností. Mezi inhibitory chymotrypsinu patří hydroxymethylpyrroly, kyselina boritá, deriváty kumarinu, peptidylové aldehydy (Abell & Nabbs, 2001). PMSF a DFP také inhibují chymotrypsin (Blow, 1971; Geiger, 1984). TPCK inhibuje chymotrypsin nevratně. Mezi inhibitory patří i těžké kovy jako jsou Cu^{2+} a Hg^{2+} (Lauwers & Scharpe, 1997; Wilcox, 1970). Mezi nejvýznamnější inhibitory s vysokou molekulovou hmotností patří α -1-antichymotrypsin, α -1-inhibitor proteinas, α -2-makroglobulinu, aprotinin a sójový inhibitor trypsinu (Lauwers & Scharpe, 1997; Geiger, 1984).

Mezi primární využití chymotrypsinu patří pomoc při zažívání a použití jako protizánětlivého prostředku. V klinické oblasti má stanovení chymotrypsinu ve stolici svůj význam, např. pro monitoring substituční terapie pankreatickými enzymy u chronické pankreatitidy. Chymotrypsin, společně s ostatními pankreatickými enzymy, se nejčastěji používá při léčbě pankreatické nedostatečnosti (mohou jí trpět osoby s cystickou fibrózou, osoby, které podstoupily chemoterapii, případně lidé trpící chronickým stresem). Chymotrypsin se běžně využívá při sekvenční analýze, syntéze peptidů a mapování peptidů.

3.1.9 Využití proteas v medicíně

Lidé již dříve využívali ovocných šťáv bohatých na enzymy (papája, ananas) k léčbě ran a vředů. I dnes jsou proteolytické enzymy z tropického ovoce a pankreatů mladých hospodářských zvířat používány místně při léčbě torpidních (přetrvávajících) vředů a ran, oblastně k náhradě nedostatečné sekrece trávicích šťáv a k léčbě koronárních trombóz a embolií do životně důležitých orgánů. Celková injekční aplikace chybějících enzymů umožňuje léčbu vrozených enzymopatií,

např. mukopolysacharidosy (Wraith, 2005). V dnešní době moderní medicína využívá proteasy k léčbě mnoha onemocnění. V posledních letech se velmi rozvíjí systémová enzymoterapie. Za jejího zakladatele je považován prof. Max Wolf. Jeho rozsáhlé příznivé empirické zkušenosti inspirovaly Němce Karla Ransbergera, který zavedl tovární výrobu nejhodnotnějších preparátů a zahájil éru základního výzkumu i četných kontrolovaných klinických studií (Nouza K. & Nouza M., 2006b).

U systémové enzymoterapie se jedná o podávání směsi rostlinných a živočišných enzymů ve formě tablet, kdy tablety jsou chráněny speciálním obalem (ochrana před degradací v prostředí žaludku), který se rozpouští až v tenkém střevě. Zde dojde ke vstřebání části enzymů do tkání, krevního a mízního oběhu. Mezi nejznámější přípravky s obsahem enzymů patří Wobenzym (pankreatin, bromelain, papain, trypsin, chymotrypsin, α -amylasa, lipasa, rutin), Prevenzym (bromelain, papain, trypsin a rutin) a Phlogenzym (bromelain, trypsin a rutin).

Proteasy jsou podávány perorálně (zajištění systémových léčebných účinků v organismu), místně (léčba vředů a ran), oblastně do životně důležitých orgánů (nedostatečná sekrece trávicích šťáv), injekční aplikace (léčba vrozených enzymopatií).

Mezi farmakologické účinky systémové enzymoterapie patří: protizánětlivý účinek, antiedematózní (působící proti otokům, edémům) a edém-protekční účinek, fibrinolytický a trombolytický účinek, analgetický účinek, imunomodulační účinek posilující slabou imunitu (Nouza K. & Nouza M., 2006a). Systémová enzymoterapie podporuje obranný zánět a antibiotickou léčbu, omezuje opakované a chronické záněty tkání a orgánů. Využívá se i v prevenci a léčbě otoků. Na oslabenou imunitu působí systémová enzymoterapie podnětně, na nadměrnou a patologickou imunitu (imunokomplexové a autoimunitní procesy) působí tlumivě. Uplatňuje se i v komplexní protinádorové léčbě (Nouza K. & Nouza M., 2006a). Systémová enzymoterapie může snížit nepříznivé účinky způsobené radioterapií a chemoterapií (Leipner & Saller, 2000). Systémová enzymoterapie stupňuje resorpci perorálně užívaných antibiotik a zvyšuje jejich koncentrace v krvi (Barsom *et al.*, 1983). Antibiotika také vlivem systémové enzymoterapie pronikají i do těžko přístupných oblastí organismu. Stále častěji se uplatňuje preventivně i léčebně v dětském věku a u stárnoucích osob. U dětí se využívá především k posílení imunity, ve vyšším věku k omezení výskytu infekčních onemocnění, oddálení nástupu předčasného stárnutí a potlačení výskytu přidružených závažných chorob (Honzíková, 2004; Nouza K. & Nouza M., 2000).

V České republice první systematicky používaná systémová enzymoterapie byla u dětí léčba Wobenzymem (Nouza K. & Nouza M., 2006b). Získané zkušenosti ukazují, že systémová enzymoterapie je u dětí každého věku výborně snášena a její efekty jsou stejně dobré, ne-li lepší než u dospělých a starších jedinců. Uvažuje se o specifických vlastnostech dětského organismu a trávicího systému, umožňujících rychlejší postup preparátů z žaludku do střeva, o sníženém štěpení a rychlejším vstřebávání enzymů a o snazším navozování imunologické tolerance na enzymy (Nouza K. & Nouza M., 2006b). Někteří lékaři prověřili u dětí i účinnost dalšího preparátu, Phlogenzymu, který se užívá stejně jako Wobenzym, ovšem v polovičních dávkách. Na trhu existuje ještě potravinový doplněk Prevenzym, vhodný pro lehčí případy a pro preventivní užívání. Systémová enzymoterapie byla v Evropě zkoumána z hlediska vyhodnocení účinnosti proteolytických enzymů v léčbě karcinomu prsu, tlustého střeva (Beuth, 2008).

3.1.10 Absorpce proteinů přes střevní stěnu

Mnoha publikacemi bylo vyvráceno dogma o nevstřebatelnosti bílkovinných (enzymových) makromolekul při dodržení určitého postupu perorálně podaných enzymů. Akceptaci systémového působení perorálně podávaných proteolytických enzymů bránily zpočátku pochybnosti o zachování jejich funkční aktivity při průchodu kyselým prostředím žaludku a zastaralá dogmata o nemožnosti vstřebávání neporušených molekul bílkovin střevní stěnou (Kostiuk & Jirásek, 2010). Nyní je nade vše pochybnost přijímáno, že malé, ale přesto významné, množství mnoha makromolekul může být absorbováno v neporušené a biologicky aktivní formě (Steffens, 1995). Castell *et al.* (1997) ve své publikaci dokazují, že u zdravých jedinců dochází k resorpci malého množství perorálně podaných enzymů v makromolekulové formě a plné funkční účinnosti. Enzymy, které takto přestoupily do krevního oběhu, v něm zůstávají ve volném stavu jen po krátkou dobu. Trypsin, stejně jako ostatní trávicí enzym (kromě lipasy), je docela rezistentní vůči enzymové degradaci, je proto možné, že značná část projde skrz střevní stěnu a může být detekována v plazmě (Steffens, 1995).

Dnes je prokázáno, že při zajištění ochrany enzymů před žaludečním obsahem (obalem rozpouštějícím se až v neutrálním nebo alkalickém střevním prostředí) a aplikací nalačno s velkým množstvím tekutiny dochází k resorpci několika procent perorálně podaných enzymů v makromolekulární formě a plné funkční účinnosti (Nouza

K. & Nouza M., 2006b). Hlavním mechanismem využití vstřebaných enzymů je však jejich navázání na krevní antiproteasy (vazebné proteiny proteas). Perorálně podávané proteolytické enzymy mohou být detekovány přechodně jako intaktní, s vysokou molekulovou hmotností, fyziologicky aktivní molekuly proteinu, a to buď volně (v nanomolárních koncentracích), nebo v komplexu s anti-proteasami v plazmě, lymfě nebo poraněné tkáni (Lorkowski, 2012).

3.1.11 Wobenzym

Wobenzym patří mezi nejznámější enzymové preparáty, je to farmakologický preparát produkován německou firmou Mucos-Pharma. Příznivě ovlivňuje imunitu a potlačuje zánět. Urychluje vstřebávání otoků, krevních podlitin a krevních výronů, ustupuje bolest, urychluje hojení. Je využíván jako podpůrná léčba při zánětech, pooperačních a pourazových stavů. Možné terapeutické indikace Wobenzymu jsou uvedeny jako alternativa k dosud užívaným léčebným postupům. Wobenzym je možno použít u dalších stavů jako jsou pourazové otoky, lymfedémy různé etiologie, fibrocystická mastopatie. Wobenzym je vhodné užívat také jako podpůrnou léčbu při pooperačních stavech v chirurgii (artroskopické výkony, stomatochirurgie, ORL), při zánětech povrchových žil, revmatoidní artritidě, revmatismu měkkých tkání, artróze (pokročilá stádia), při chronických a recidivujících zánětech. Je vhodné jej užívat při podávání antibiotik (WOBENZYM homepage, 2016).

Každá tableta Wobenzymu obsahuje papain (60 mg), bromelain (45 mg), trypsin (24 mg) a chymotrypsin (1 mg). Mimo to obsahuje rutin, pankreatin, lipasu a α -amylasu (Galebskaya *et al.*, 2000). Trypsin a chymotrypsin jsou enzymy živočišného původu, papain a bromelain původu rostlinného.

Sukhikh *et al.*, 1997, ve své studii dokazují, že zatímco u 70 mužů i žen s chlamydiovými, mykoplazmovými a ureaplazmovými urogenitálními infekcemi léčenými 20 dnů antibiotiky bylo zaznamenáno klinické vyléčení v 61,4 %, u 78 nemocných léčených 20 dnů 1/2 dávkou antibiotik a preparátem Wobenzymem došlo k vyléčení v 92,3 %. Chlamydie určované v slizničních buňkách metodou PCR byly plně odstraněny z organismu při léčbě samotnými antibiotiky jen v 30 %, při léčbě antibiotiky a Wobenzymem vymizely chlamydie plně v 90 %.

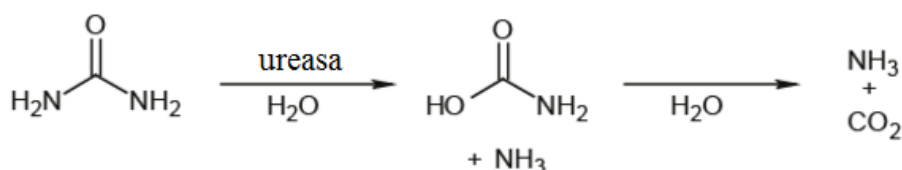
U nás v České republice (průmyslové oblasti Kralup I. Vokálová) byl třiceti dětem ve věku 3–15 let s recidivujícími infekcemi horních a dolních dýchacích cest

podáván 6 měsíců Wobenzym v denních dávkách 1 dražé na 6 kg tělesné hmotnosti. Už v průběhu léčby a v následujících 6 měsících byl pozorován ve srovnání s předchozím obdobím a s dětmi neléčenými Wobenzymem výrazný pokles recidiv infekcí, zmírnění jejich závažnosti (téměř vymizely laryngospasmy - křečovitě uzavření hrtanu, které vede k nedostatečnému přísunu vzduchu do plic) a omezení spotřeby antibiotik. Zlepšily se i některé imunologické laboratorní ukazatele (IgE a další). Léčba byla obecně dobře snášena i u alergických dětí (Nouza K. & Nouza M., 2006b).

Od roku 2002 jsou každoročně prováděny pravidelné průzkumy, které mapují používání léku systémové enzymoterapie Wobenzymu u laické veřejnosti. Ze získaných údajů vyplývá, že s Wobenzymem má osobní zkušenost 7-8 % dospělé populace ČR a spokojenost u pacientů s výsledky léčby se v různých letech pohybovala od 82 % do 90 % (Kostiuk & Jirásek, 2010).

3.2 Ureasa

Ureasa (EC 3.5.1.5) je enzym patřící do rodiny amidohydrolas (amydas) a fosfotriesteras. Katalyzuje hydrolýzu močoviny na oxid uhličitý a amoniak (viz Obr. 3), přesněji vzniká amoniak a karbamát, ten je následně degradován spontánní hydrolýzou za vzniku kyseliny uhličitě a další molekuly amoniaku (Zimmer, 2000). Působením ureasy dochází k alkalizaci okolního prostředí. V přírodě se podílí na koloběhu dusíku a uhlíku.



Obr. 3: Ureasa katalyzující hydrolýzu močoviny

3.2.1 Historie ureasy

V roce 1909 objevil Takeuchi ureasu v sóji. J. B. Sumner ji v roce 1926 izoloval a jako první enzym byla krystalizována. Podal důkaz o tom, že enzymy jsou bílkovinné povahy a také to, že proteiny mohou být krystalizovány. V roce 1946 mu byla udělena Nobelova cena za chemii. Ureasa má historický význam, protože se jedná o první

enzym, u kterého bylo zjištěno, že obsahuje sulfhydrylové skupiny. Dále pak, ureasa je prvním enzymem, u kterého bylo zjištěno, že obsahuje nikl.

Důležitým zjištěním Dixona v roce 1975 bylo prokázání nikelnatých iontů v aktivním místě ureasy z *Canavalia ensiformis*, jež jsou důležité pro její činnost a aktivaci. Strukturu ureasy vyřešil v roce 1995 P. A. Karplus.

3.2.2 Vlastnosti ureasy

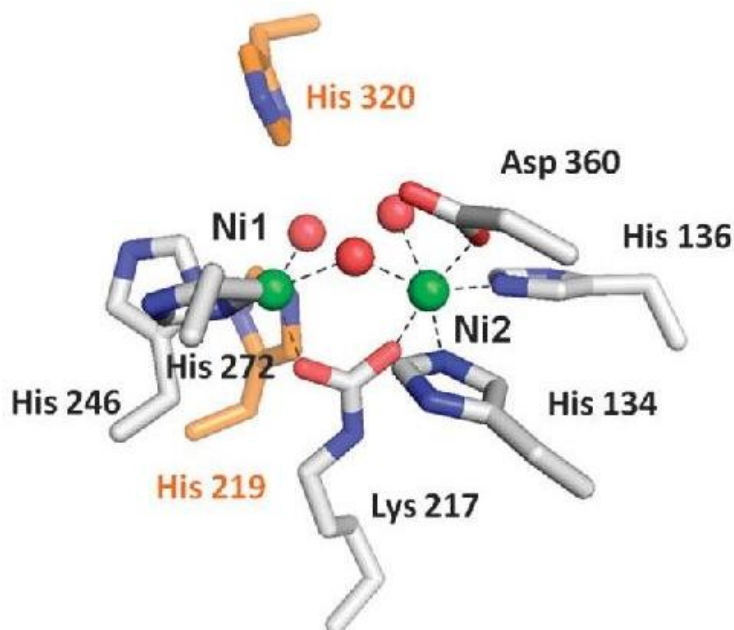
Ureasa obsahuje v aktivním centru ionty Ni^{2+} . V poměru hmotností obsahuje ureasa $2,0 \pm 0,3$ g atomu niklu na 105 000 g enzymu (Dixon et al., 1980). Vykazuje enzymovou specifitu k močovině a hydroxymočovině. Bylo prokázáno, že acetamid a *N*-methylmočovina mohou sloužit jako substrát pro ureasu z *Canavalia ensiformis*. Dnes je známo velké množství substrátů ureasy, které se však hydrolyzují mnohem nižší rychlostí než močovina. Příkladem jsou: hydroxymočoviny, dihydroxymočovina, semikarbazid, formamid, acetamid, thioacetamid, thiomočovina, methylmočovina, ethylmočovina, methylkarbamát, ethylkarbamát, amidy a estery kyseliny fosforečné. V životním prostředí vede aktivita ureasy ke zvyšování pH. Optimální aktivitu vykazuje ureasa při pH 7,4.

Bylo navrženo několik mechanismů katalýzy ureasy na základě známé krystalové struktury enzymu, modelových komplexů a výpočetních pokusů, ale přesné kroky katalýzy a požadavku niklu v porovnání s jinými kovy zůstávají nejasné (Carter et al., 2009). Čištěná bakteriální ureasa je částečně aktivována inkubací s oxidem uhličitým a ionty niklu, nicméně, *in vitro* aktivace byla také zjištěna v přítomnosti manganu a kobaltu. *In vivo* aktivace ureasy z většiny zdrojů vyžaduje příslušné proteiny, které fungují jako niklové metalochaperony (chaperon = speciální protein, který v buňce pomáhá skládat většinu bílkovin do jejich správného prostorového uspořádání), a GTP závislé molekulární chaperony nebo proteiny, které hrají jiné role v procesu zrání. Kromě toho, některé mikroorganismy mohou kontrolovat jejich hladinu ureasy regulačními mechanismy, jež jsou závislé na iontech kovu.

3.2.3 Struktura ureasy

Ureasy rostlin a hub jsou tvořeny z identických podjednotek, majících typicky cca 90 kDa. Nejčastěji jsou sestaveny trimery a hexamery.

Podjednotka ureasy z *Canavalia ensiformis* se skládá z 840 aminokyselin, její molekulová hmotnost bez Ni^{2+} iontů má hodnotu 90,77 kDa (Krajewska, 2009a). Tedy hmotnost hexameru, jehož součástí je 12 nikelnatých iontů, je 545.34 kDa (590 kDa zjištěno sedimentační metodou). Dalším příkladem homohexamerické struktury rostlinných ureas jsou ty obsažené v sóji, v kajanu indickém a v bavlníkových semenech, ale také v listu moruše. Z hub má tuto strukturu ureasy *Schizosaccharomyces pombe*, z plísní *Coccidioides immitis*. Bakteriální ureasy se skládají ze tří odlišných podjednotek, z jedné velké (α , 60 - 76 kDa) a dvou malých (β , 8 až 21 kDa a γ , 6-14 kDa), vytvářejících trimery, což má za následek molekulovou hmotnost enzymu mezi 190 a 300 kDa. Typickými příklady jsou ureasy z *Klebsiella aerogenes* a *Bacillus pasteurii*. Shodou okolností, kyselé ureasy mohou být také složeny ze tří podjednotek, podobným bakteriálním neutrálním ureasám, α (66-68 kDa), β (15-17 kDa) a γ (8-14 kDa). Naproti tomu ureasy z druhů *Helicobacter* se skládají ze dvou podjednotek α (61-66 kDa) a β (26 až 31 kDa), pro ureasu z *Helicobacter pylori* bylo prokázáno, že tvoří komplex dodekamer (Ha et al., 2001). Pozoruhodné je, že i když jsou ureasy z různých zdrojů (bakterií, rostlin, hub) složeny z různých typů podjednotek, vykazují vysokou homologii aminokyselinových sekvencí. Významné je to, že aktivní místo ve všech známých ureasach je vždy umístěno v α podjednotce. Ureasa je enzym bohatý na aminokyselinu cystein. Celkový počet cysteinů na podjednotku ureasy je 15. Celkově molekula ureasy obsahuje 90 cysteinů. Všechny rostlinné a bakteriální ureasy, mimo té z *Helicobacter pylori*, jsou cytoplazmatické. Struktura aktivního centra ureasy z *Canavalia ensiformis* je zobrazena na Obr. 4.

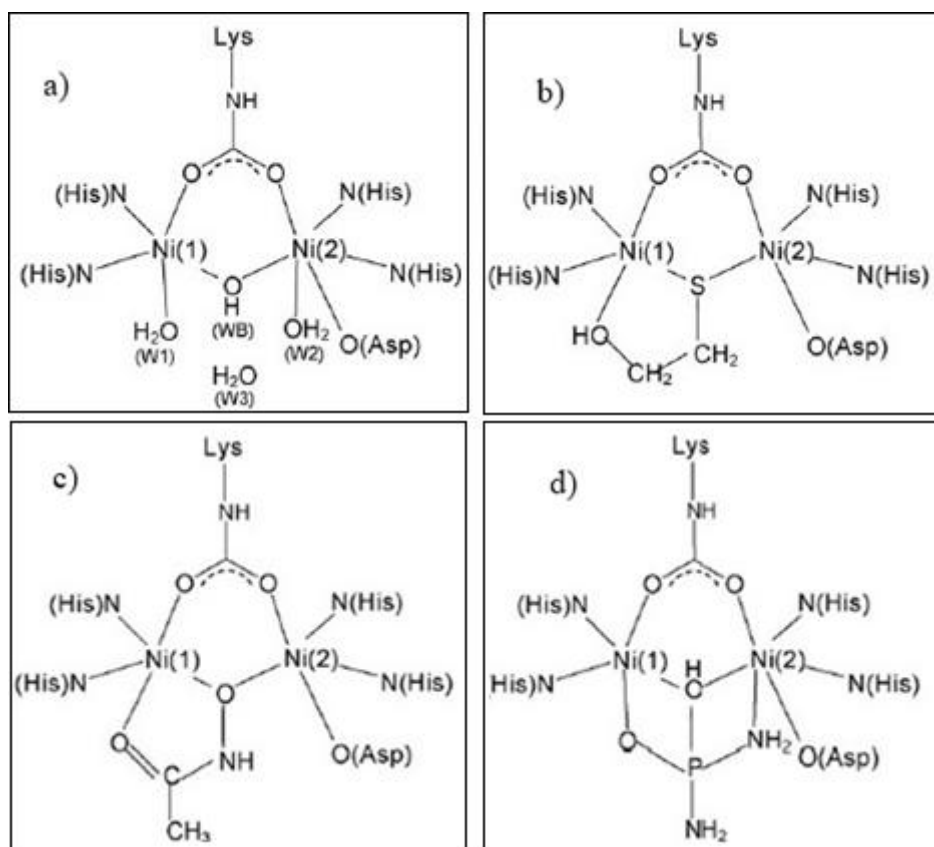


Obr. 4: Aktivní místo ureasy. Aktivní místo obsahuje dva atomy niklu, znázorněny zeleně. Červeně jsou znázorněny molekuly vody. Rezidua histidinů účastnících se katalýzy jsou znázorněny oranžovými atomy uhlíku. Bíle znázorněné atomy uhlíku značí aminokyselinové zbytky jenž koordinují s atomy niklu (Carter *et al.*, 2009).

3.2.4 Aktivní centrum ureasy

Znalosti o aktivním centru ureasy byly zjištěny z krystalických struktur bakteriálních ureas z *Klebsiella aerogenes* a *Bacillus pasteurii*. Bylo prokázáno, že aktivní místo obsahuje binukleární nikl, bylo zjištěno, že vzdálenosti Ni-Ni je podobných hodnot u obou ureas, 3.7 a 3.5 Å v *Bacillus pasteurii* a *Klebsiella aerogenes*, v daném pořadí. V centru (viz Obr. 5) jsou Ni²⁺ ionty přemostěny karbamylowanými lysiny prostřednictvím atomů kyslíku, s Ni (1) dále koordinují dva histidiny prostřednictvím svých atomů dusíku, a s Ni (2) dva histidiny také prostřednictvím atomů dusíku a dále s kyselinou asparagovou přes atom kyslíku. Kromě toho, ionty niklu jsou přemostěny hydroxidovým iontem (WB). Dále pak se dvěma koncovými molekulami vody, W1 (první molekula vody) na Ni (1), W2 (druhá molekula vody) na Ni (2), a W3 (třetí molekula vody) směřují k otvoru aktivního místa.

Předpokládá se, že v aktivním místě ureasy (viz Obr. 5), se močovina váže na více elektrofilní Ni (1), jenž je více citlivý na nukleofilní atak. Při výměně vody W1-W3 (první za třetí molekulu vody), je močovina dále vázána na Ni (2) přes dusík jedné z jejích aminových skupin. Předpokládá se, že tato vazba usnadňuje nukleofilní atak vody na karbonylový uhlík, což vede k tvorbě meziprojektu, uvolní se amoniak a karbamát (Dixon *et al.*, 1980).



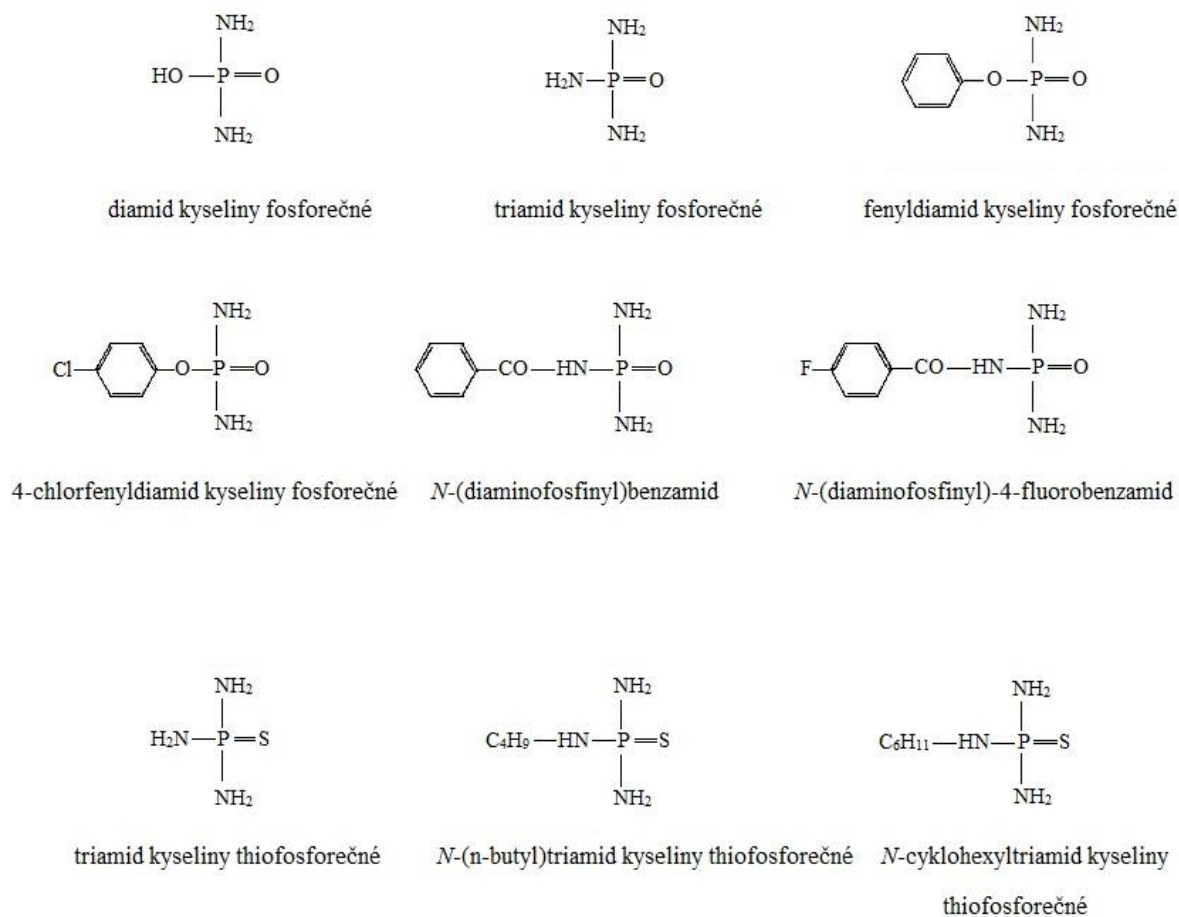
Obr. 5: Schématické struktury aktivního centra ureasy: (a) nativní ureasa, (b) ureasa inhibována β -merkptoethanolem, (c) kyselinou acetohydroxámovou, (d) fenylfosfodiamidem (upraveno dle Krajewska, 2009a).

3.2.5 Inhibitory ureasy

Ureasy jsou inhibovány mnoha sloučeninami, a to např. β -merkptoethanolem, kyselinou acetohydroxámovou, fenylfosfodiamidem, fosfátem, kyselinou boritou (viz Obr. 5). Kyselina hydroxámová je vzhledem ke své nízké toxicitě jedním z nejvíce intenzivně studovaných inhibitorů, a to pro využití v medicíně. Amidy a estery kyseliny fosforečné a kyseliny thiofosforečné patří též mezi inhibitory ureasy (viz Obr. 6). Amidy a estery kyseliny fosforečné bývají klasifikovány jako nejsilnější inhibitory. Činnost ureasy inhibují též těžké kovy, ionty sodíku a draslíku.

Mezi inhibitory ureasy patří *N*-(*n*-butyl)triamid kyseliny thiofosforečné (NBPT) jenž je obsažen v přípravku StabilureN[®]. Tento přípravek je aplikován společně s hnojivem obsahujícím močovinu, výrazně snižuje aktivitu ureasy v místě kontaktu hnojiva s půdou nebo rostlinou a brání tak rozkladu močoviny až do prvních větších srážek. Mezi výhody přípravku patří zvýšení dostupnosti dusíku pro rostliny a omezení

ztrát dusíku únikem amoniaku do ovzduší (<http://www.agra.cz/aktualni-informace/aktualizovane-7-3-2013-inhibitor-ureazy-pojistka-prednosti-mocoviny.html>). NBPT je dále obsažen v hnojivu UREA stabil.



Obr. 6: Amidy a estery kyseliny fosforečné a kyseliny thiofosforečné jako inhibitory ureasy (upraveno dle Krajewska, 2009a).

3.2.6 Výskyt ureasy

Ureasa se nachází v bakteriích, houbách, řasách, rostlinách i u některých bezobratlých živočichů, také se vyskytuje jako půdní enzym (viz Tab. 9).

Ureasa je produkována mnoha organismy, hojně se vyskytuje v rostlině *Canavalia ensiformis* (Jackova fazole). *Canavalia ensiformis* je rostlina patřící do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Dorůstá až 1 m na výšku, roste v bohatých půdách a na slunných teplých místech. Velikost lusků je až 36 cm, obsahují velká bílá semena. Fazole jsou mírně toxické, toxicitu lze odstranit tepelnou úpravou. Celá rostlina se používá jako krmivo, nelze ji však použít ve směsi krmiv obsahujících močovinu, neboť

ureasa obsažená v rostlině by uvolnila velké množství škodlivého amoniaku z močoviny. Kromě ureasy je také významným zdrojem konkanavalinu A. Ureasa v *Canavalia ensiformis* tvoří mezi 0,07 % až 0,14 % celkové hmotnosti (Sumner & Hand, 1928).

Jednou z nejčastěji studovaných bakteriálních ureas je z *Helicobacter pylori*, protože se podílí na tvorbě peptických vředů a vzniku rakoviny žaludku (Covacci *et al.*, 1999).

Rostliny	Houby
<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Glycine max</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Cajanus cajan</i>	<i>Coccidioides immitis</i>
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Řasy	Bezobratlí
<i>Nitellopsis obtusa</i>	<i>Otala lactea</i>
Bakterie	
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>arthobacter oxydans</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>Bacillus pasteurii</i>	<i>Staphylococcus leei</i>
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	<i>Streptococcus mitior</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Arthrobacter mobilis</i>

Tab. 9: Zdroj ureasy (upraveno dle Krajewska, 2009a)

3.2.7 Purifikace ureasy

Ureasa byla poprvé získána v krystalické formě v roce 1926, a to Sumnerem (Gorin *et al.*, 1959). Metoda izolace byla poměrně jednoduchá. Moučka z fazole *Canavalia ensiformis* byla extrahována 32% acetonem, extrakt byl následně filtrován. Krystalky enzymu, které se utvořily ve filtrátu, jenž byl ponechán v chladu, byly odděleny centrifugací.

Ureasa splňující požadavky na čistotu pro analytické použití se čistí z moučky *Canavalia ensiformis* následovně: extrakcí 20% acetonem, tepelným ošetřením, vysrážením kyselinou a lyofilizací. Pro extrakci ureasy se jeden díl fazolové moučky smísí s 5 díly 20% acetonu, který obsahuje 1 mmol·l⁻¹ EDTA a 1 mmol·l⁻¹ 2-

merkapt ethanol, směs se míchá při teplotě 20°C po dobu 5 min. Tepelným ošetřením se z extraktu odstraní mléčné zbarvení. Ureasa se z čirého žlutého supernatantu vysráží úpravou pH roztoku na 5,4 pomocí kyseliny citrónové. Ureasa se rozpustí v 15 mmol·l⁻¹ fosfátovém pufru, pH 8,5 (konečná hodnota pH je 6,8 až 7,0), poté následuje lyofilizace. Tímto postupem byl enzym přečištěn 14,7 krát a bylo dosaženo výtěžku 6,75 g enzymu z 1 kg semen fazolí (Sung *et al.*, 1989).

Ureasu z *Canavalia ensiformis* lze přečistit i pomocí poly(hydroxyethylmethakrylát-N-methakryloyl-(L)histidinamid methylester) cryogelu chelátovaného s Cu²⁺ (cryogel na bázi PHEMAH-Cu²⁺). PHEMAH-Cu²⁺ cryogel byl syntetizován a charakterizován pro stupeň nabobtnání, morfologii (pomocí skenovacího elektronového mikroskopu), včlenění Cu²⁺ do N-methacryloyl- (L)histidinamid methylesteru (podle elementární analýzy a atomové absorpční spektrofotometrie). Vazba ureasy k PHEMAH-Cu²⁺ cryogelu byla optimalizována tím, že byl zkoumán vliv pH, průtok a vliv koncentrace ureasy na navázání. Maximální vazba ureasy byla 23,2 mg na 1 g suchého adsorbentu. Maximální vazba ureasy extrahované z moučky *Canavalia ensiformis* byla 67,8 mg na 1 g suchého adsorbentu. Eluce ureasy z kolony cryogelu byla provedena 1,0 mol·l⁻¹ NaCl v 20 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru (pH 8,0). Bylo zjištěno, že ureasa by mohla být opakovaně vázána a vymývána z (PHEMAH-Cu²⁺) cryogelu s méně než 10% ztrátou ve sloupci kapacity (Tekiner *et al.*, 2012).

K dalším zdrojům ureasy patří semena vodního melounu (*Citrullus vulgaris*). Prakash & Brushan, 1997, získali ureasu následovně: loupaná semena vodního melounu byla namočená na 8 hodin do extrakčního pufru při teplotě 4-6°C. Poté byla směs homogenizována a filtrována. Byla provedena centrifugace směsi, směs byla opět filtrována. K extraktu byl přidán ledový aceton, tato směs byla protřepána a centrifugována. Pelet byl resuspendován v 25 mmol·l⁻¹ Tris-acetátovém pufru (pH 7,5). Suspenze byla ponechána 6 hodin na ledu a poté centrifugována, supernatant byl naředěn extrakčním pufrům a byl přidán chlazený aceton. Směs byla opět centrifugována, k supernatantu byl přidán opět aceton. Následovala centrifugace směsi, pelet byl poté resuspendován v extrakčním pufru a směs byla centrifugována. Supernatant byl aplikován na kolonu Sephadex G-200, eluce byla provedena Tris-acetátovým pufrům (25 mmol·l⁻¹, pH 7,5) obsahujícím 1 mmol·l⁻¹ 2-merkapt ethanol, s průtokem 20 ml za hodinu. Frakce obsahující ureasu byly smíchány a zakonzentrovány. Enzym byl tímto postupem přečištěn 45,8 krát.

3.2.8 Imobilizace ureasy

Enzymy v porovnání s běžnými chemickými katalyzátory mají širší využití a řadu výhod. Jejich použití je omezeno z praktického hlediska. Kromě vysokých nákladů na izolaci a čištění enzymů je hlavním problémem jejich citlivost na změny podmínek prostředí, což zahrnuje zejména teplotu, pH a citlivost na inhibitory (Krajewska, 2009b). Následkem toho je omezení životnosti enzymů a obtížný návrat do jejich aktivní formy pro opakované použití (Chaplin & Bucke, 1990; Sheldon, 2007).

Pravděpodobně nejběžnějším a nejúspěšnějším řešením jak překonat tyto problémy, je imobilizace enzymů. Imobilizace se sestává z převedení enzymů do nerozpustné formy, a to nejčastěji jejich upevněním na pevné nosiče, kdy je dosaženo heterogenity enzymového systému a stabilizace struktury enzymů, což je důležité pro jejich činnost (Chaplin & Bucke, 1990; Sheldon, 2007). Heterogenita systému umožňuje i snadné oddělení od produktu a tím opakované znovupoužití. Umožněna je také nepřetržitá činnost enzymových procesů, jejich rychlé ukončení a větší rozmanitost použití.

Pro použití v různých analytických, lékařských, průmyslových a biotechnologických procesech byla studována imobilizace nejrůznějších enzymů. Několik těchto procesů bylo realizováno ve výrobě, a to zejména v potravinářském průmyslu a při výrobě některých chemikálií a léčiv (Chaplin & Bucke, 1990).

Mezi rozsáhle studované enzymy pro imobilizaci a praktické aplikace patří ureasy, a to vzhledem k významu procesů, kterých se zúčastňuje (Krajewska, 2009b). Byly vyvinuty rozmanité techniky imobilizace. Základním rozdělením je na chemické a fyzikální, velmi často jsou používány jejich kombinace (Cao, 2005). K chemickým metodám patří: kovalentní vazba na pevný nosič, zesíťování s nízkomolekulárním činidlem, někdy je také prováděno s přidavkem neutrálních sloučenin (co-zesíťování). Mezi fyzikální techniky patří např. adsorpce na pevný nosič, zachycení do gelu, či mikroenkapsulace. Volba materiálů pro imobilizaci je prakticky neomezená a zahrnuje organické, anorganické, přírodní a syntetické látky, které mohou být v podobě (mikro, nano) kuliček, membrán, vláken, dutých vláken a (mikro) kapslí. Imobilizace enzymu není obtížná, problémem je získání enzymu s požadovanými vlastnostmi, neexistuje univerzální protokol jak imobilizovat enzymy a nelze předvídat jejich výsledné vlastnosti (Krajewska, 2009b). Každá metoda má své výhody i nevýhody a je potřeba k nim při volbě imobilizace přihlídnout. Adsorpce je jednoduchá, levná a efektivní, avšak velmi často reverzibilní. Naopak kovalentní vazba a zesíťování jsou účinné

a trvalé, ale nákladné a snadno snižují aktivitu enzymu. U zachycení a mikroenkapsulace je omezena činnost enzymu difuzí substrátu a produktu v reakční směsi. Při volbě nosného materiálu by měly být vzaty v úvahu jeho vlastnosti: vysoká afinita k proteinům, dostupnost reaktivních skupin pro přímou reakci s enzymy nebo pro chemické modifikace, mechanická stabilita. Velmi důležitá je volba nosného materiálu vzhledem ke zvolené aplikaci imobilizovaného enzymu. Pro potravinářské, farmaceutické, lékařské a zemědělské účely by to měla být netoxičnost a/nebo biokompatibilita. Materiál by měl být případně biologicky rozložitelný a finančně nenáročný (Sheldon, 2007; Krajewska, 2004). Velký důraz pro praktické aplikace je kladen na stabilitu enzymu, což zahrnuje teplotní a skladovací stabilitu také v porovnání s volným enzymem, funkční stabilitu a opakované použití.

Vývoj jednoduché a spolehlivé techniky pro imobilizaci enzymů je důležitou součástí biotechnologie. Pomocí imobilizace na magnetické nanočástice lze snadno izolovat produkt z reakční směsi, která umožňuje řídit reakci a zároveň snižuje náklady na enzym (Sahoo *et al.*, 2011). Ureasa byla již imobilizovaná na mnoho různých nosičů, ale ne vždy splňují její vlastnosti po imobilizaci podmínky pro praktické využití (Pogoryliy *et al.*, 2013). V Tabulce 10 jsou shrnuty některé metody imobilizace ureasy z různých zdrojů použitých v posledních dvou desetiletích, kdy byla prozkoumána řada technik a podpůrných materiálu pro imobilizaci ureasy.

Zdroj ureasy	Metoda imobilizace	Nosič	Literatura
<i>C. ensiformis</i>	kovalentní vazba	vlákna hedvábí	(Unuma <i>et al.</i> , 2007)
<i>C. ensiformis</i>	kovalentní vazba	polypropylenová vlákna	(Yeon & Lueptow, 2006)
<i>C. ensiformis</i>	kovalentní vazba	nylonová membrána	(Teke & Baysal, 2007; Di Martino <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. ensiformis</i>	kovalentní vazba	polyakrylonitrilová dutá vlákna	(Lin & Yang, 2003; Yang & Lin, 2001)
<i>C. ensiformis</i>	kovalentní vazba	chitosanové kuličky	(Chen & Chiu, 1999)
<i>Cajanus cajan</i>	kovalentní vazba	alkylaminové skleněné kuličky	(Reddy & Kayastha, 2006)
<i>Cajanus cajan</i>	kovalentní vazba	arylaminové skleněné kuličky	(Reddy & Kayastha, 2006)
<i>C. ensiformis</i>	adsorbce	poly(2-hydroxyethylmethakrylát- <i>N</i> -methakryoyl- <i>L</i> -histidin-methylester) kuličky	(Bayramoğlu <i>et al.</i> , 2005)
<i>C. ensiformis</i>	adsorbce	poly(2-hydroxyethylmethakrylát- <i>N</i> -methakryoyl- <i>L</i> -histidin-methylester- Ni^{2+}) kuličky	(Bayramoğlu <i>et al.</i> , 2005)
<i>C. ensiformis</i>	adsorbce	polyanilinová membrána	(Laska <i>et al.</i> , 1999)
<i>C. ensiformis</i>	adsorbce	hydroxyapatit	(Marzadori <i>et al.</i> , 1998; Borghetti <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. ensiformis</i>	adsorbce	poly(ethyltereftalátová) vlákna	(Elçin & Saçak, 1995)
<i>C. ensiformis</i>	adsorbce	aminovaná polysulfonová membrána	(Poźniak <i>et al.</i> , 1995)
<i>C. ensiformis</i>	adsorbce	kaolinit	(Sundaram & Crook, 1971)
<i>Cajanus cajan</i>	adsorbce	želatinové kuličky	(Srivastava & Kayastha, 2001)
<i>Dolichos biflorus</i>	adsorbce	porézni křemík	(Chaudhari <i>et al.</i> , 2005)
<i>C. ensiformis</i>	enkapsulace	alginátové kuličky	(Nakarani & Kayastha, 2007)
<i>C. ensiformis</i>	enkapsulace	kapsule chitosanu obaleného alginátem	(DeGroot & Neufeld, 2001)
<i>C. ensiformis</i>	enkapsulace	nylonové kapsule	(Sundaram, 1973)
<i>C. ensiformis</i>	enkapsulace	nylonové mikrokapsule obsahující ureasu a hemoglobin	(Monshipouri & Neufeld, 1992)
<i>C. ensiformis</i>	enkapsulace	magnetické alginátové kuličky	(Hamaya <i>et al.</i> , 1993)
<i>Citrullus vulgaris</i>	enkapsulace	alginátové kapsule	(Prakash & Upadhyay, 2005; Prakash & Upadhyay, 2006)
<i>Helicobacter pylori</i>	enkapsulace	hydrofobní modifikované alginátové kapsule	(Leonard <i>et al.</i> , 2004)
<i>C. ensiformis</i>	zachycení	poly- <i>N</i> -isopropylakrylamidový gel	(Eremeev & Kukhtin, 1997; Eremeev <i>et al.</i> , 1999)

<i>C. ensiformis</i>	zachycení	polyakrylamidový gel zesíťovaný <i>N,N'</i> -methylenbisakrylamidem	(Shah <i>et al.</i> , 1994)
<i>C. ensiformis</i>	zachycení	celulosová-TiO ₂ kompozitní gelová vlákna	(Kurokawa <i>et al.</i> , 1993; Hatayama <i>et al.</i> , 1996)
<i>Cajanus cajan</i>	zachycení	agarový gel	(Mulagalapalli <i>et al.</i> , 2007)
<i>Citrullus vulgaris</i>	zachycení	agarosová gelová membrána	(Prakash <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus pasteurii</i>	zachycení	polyurethanová pěna	(Bachmeier <i>et al.</i> , 2002)

Tab. 10: Přehled metod imobilizace ureasy různými metodami (upraveno dle Krajewska 2009b)

3.2.9 Praktické aplikace imobilizované ureasy

Potenciál ureasy byl stále více studován pro různé laboratorní, technické a biotechnologické aplikace. S ohledem na významy procesů, kterých se ureasa účastní, je velká možnost využití ureasy v praktických aplikacích (Krajewska, 2009b).

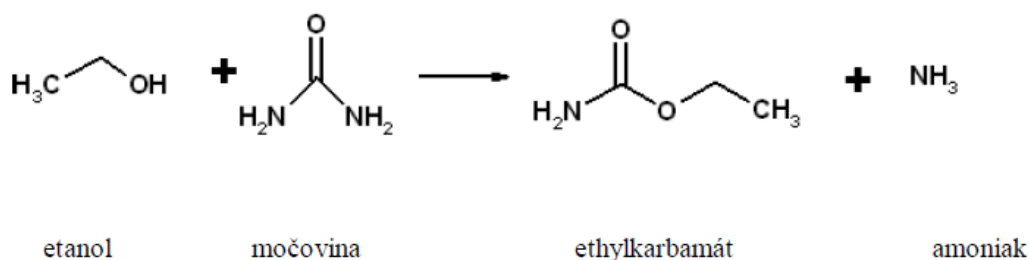
Imobilizovaná ureasa byla již aplikována v mnoha odvětvích, z nichž můžeme zmínit následující: odstranění močoviny z krve v dialyzačním přístroji, kdy byla ureasa imobilizována na povrch polyakrylonitrilového (PAN) dutého vlákna kovalentní vazbou v přítomnosti glutaraldehydu (Lin & Yang, 2003). Povrch dutých vláken PAN byl hydrolyzován a amidován ve vodném roztoku, který obsahoval NaOH a 1,6-hexandiamin. Poté byla vlákna vložena do glutaraldehydu a následně ponořena do vodného roztoku ureasy. Takto imobilizovaná ureasa vykazovala vyšší relativní aktivitu a stabilitu než nativní ureasa během skladování při různých hodnotách pH. Pro skladování jak nativní tak imobilizované ureasy na dutých vláknech PAN byla optimální hodnota pH 7. Avšak i při této hodnotě pH relativní aktivita nativní ureasy se prudce snížila po 14 dnech na 66 %, po 42 dnech byla zachována pouze 1,8 % při skladování při teplotě 4°C. Oproti tomu imobilizovaná ureasa si udržela vyšší relativní aktivitu: bylo zachováno 90 % aktivity po 42 dnech. Kromě toho je výhodou imobilizované ureasy to, že může být znovu použita vícekrát, a to až 15x při zachování 80% aktivity. Pomocí dialyzačního experimentu byla prokázána účinnost odstranění močoviny při použití dialyzátoru s ureasou imobilizovanou na dutých vláknech. Močovina byla odstraněna z krve 2x rychleji než běžnou dialýzou. Množství močoviny odstraněné při použití dialyzátoru s imobilizovanou ureasou bude za 1 hodinu stejné jako v případě dialýzy pomocí běžného dialyzátoru během 4 hodin. To naznačuje, že

dialyzátor s imobilizovanou ureasou může významně zkrátit čas potřebný pro dialýzu (Lin & Yang, 2003).

Ureasa (pomocí zesíťování na alkylaminovém skle) z kajanu indického (*Cajanus cajan*) byla imobilizována kovalentně na alkylaminové sklo v přítomnosti glutaraldehydu a na arylaminové sklo byla navázána diazotací (Reddy & Kayastha, 2006). V těchto případech došlo k 92,5% a 90% imobilizaci, imobilizovaná ureasa vykazovala optimální aktivitu při 77°C a zachovala si 50 % své aktivity po inkubaci při této teplotě po dobu 90 minut. Imobilizovaná ureasa byla poměrně stabilní při vyšších teplotách a v širokém rozmezí pH, neobvykle stabilní byla při skladování při teplotě 4°C, po 25 opakovaných použitích si zachovala i 50% aktivitu. Takto imobilizovaná ureasa byla použita v dialyzačním sáčku obsahujícím vzorek krevního séra, měřeno bylo množství močoviny ve vzorcích potenciometricky pH elektrodou.

Ureasa z *Cajanus cajan* byla také imobilizovaná na agar a byla použita pro stanovení močoviny v krvi pacientů se sníženou funkcí ledvin. Zvýšená hladina močoviny v krvi je klinicky významná při ledvinových potížích či urémii. Hodnoty koncentrace močoviny v klinických vzorcích krve stanovené imobilizovanou ureasou obstály ve srovnání s výsledky získanými v klinické laboratoři. Takto imobilizovaná ureasa není nákladná na přípravu, má dobrou stabilitu a může být použita i v bioreaktorech (Mulagalapalli *et al.*, 2007).

Dnes je velkou snahou odstranit močovinu nejen z biologických vzorků, ale také např. ze vzorků vína. Zde dochází ke vzniku karcinogenního ethylkarbamátu při reakci močoviny s ethanolem (Francis, 2006), viz Obr. 7.



Obr. 7: Reakcí ethanolu s močovinou vzniká ethylkarbamát.

3.2.10 Močovina ve víně

Až do posledních let byl přikládán přítomnosti močoviny v alkoholických nápojích malý význam. Zjištěním, že močovina může reagovat s ethanolem za vzniku ethylkarbamátu, zejména za zvýšené teploty, je věnována pozornost odstranění

močoviny z alkoholických nápojů, a to především z vína (Zimmerli & Schlatter 1991). Další sloučeniny nalezené ve víně, jako je citrulin a karbamylfosfát, mohou též v reakci s ethanolem produkovat ethylkarbamát, ale močovina je hlavním prekurzorem pro vznik tohoto karcinogenu a mutagenu (Stevens & Ough, 1993; DeIanni, 1996).

3.2.11 Metody stanovení močoviny ve víně

Metody pro stanovení obsahu močoviny ve víně lze rozdělit do tří kategorií, a to na metody založených na reakcích tvořících barevné produkty, enzymovou hydrolyzu a chromatografickou separaci (Francis, 2006). K podpoře pro enzymové odstranění močoviny z vína byly použity ureasové kmeny aktivní při nízkém pH (Fujinawa *et al.*, 1990).

Koncentrace močoviny ve víně je obvykle nižší než $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Fujinawa *et al.*, 1992), ve vínech ošetřených ureasou je množství močoviny výrazně nižší. V sácké se normální koncentrace močoviny pohybuje mezi 5 až $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Matsumoto, 1993), a proto se značná část výzkumu zaměřuje na tento alkoholický nápoj.

Enzymové metody jsou založeny na stanovení amoniaku (nebo méně často uhličitanu), který se uvolňuje působením ureasy na močovinu, tyto metody jsou často označovány jako nepřímé (Taylor & Vadgama 1992). Hodnota pH požadovaná pro optimální aktivitu pro většinu známých rostlinných a bakteriálních ureas se pohybuje v neutrálních nebo mírně alkalických podmínkách (Mobley & Hausinger 1989). Kyselé ureasy ze střevních bakterií, jako je *Lactobacillus* (Kodama, 1996), mají optimální aktivitu při pH v rozmezí 2 až 4, což je mnohem vhodnější pro snížení močoviny ve kvašených nápojích.

Třebaže se kyselé ureasy lépe hodí ke snížení koncentrace močoviny ve vínech, tak obojí, neutrální ureasy a kyselé ureasy, byly úspěšně použity pro stanovení močoviny ve víně a jiných alkoholických nápojích (Francis, 2006). Je třeba poznamenat, že bylo pozorováno několik rozdílů v charakteru těchto enzymů, a to nejen v jejich optimální hodnotě pH. Specifická aktivita neutrálních ureas ($1000 - 5500 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) je obecně vyšší než ta, kterou vykazují kyselé ureasy ($350 - 450 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ pro kmeny *Lactobacillus*) (Miyagawa *et al.*, 1999).

3.2.12 Stanovení aktivity ureasy

Pro stanovení aktivity ureasy bylo již vyvinuto mnoho analytických technik, z nichž žádná není dominantní, protože se liší v oblastech aplikace (Francis *et al.*,

2002). Tyto techniky můžeme rozdělit na metody přímé a nepřímé. K přímým metodám řadíme ty, které vedou k barevným produktům. Nepřímou metodou je enzymová degradace močoviny.

Kolorimetrické přímé stanovení močoviny nejčastěji využívá reakce s butan-2,3-dionem, kdy v přítomnosti kyseliny sírové dochází k tvorbě žlutého chromogenního produktu (Butler & Walsh, 1982). Toto činidlo má vysokou stabilitu a selektivitu k mnoha matricím.

Pro stanovení močoviny může být využito infračervené spektroskopie. Tato metoda je vhodná pro stanovení v mlékárenském průmyslu a byla již použita pro analýzu tuků a bílkovin (Marshall, 1992). Nevýhodou je potřebný odhad příspěvku z překrývajících se absorpčních pásů ostatních složek a močoviny.

Vysoce efektivní metodou s pozoruhodnou citlivostí je chemiluminiscence, dochází k tvorbě fluorescenčního produktu reakcí amoniaku s o-ftalaldehydem. Metoda je vhodná pro kombinaci s analytickými technikami jako je HPLC (Francis *et al.*, 2002).

Stanovení amonných iontů iontově-selektivní elektrodou je založené na vytěsnění amoniaku z roztoku silnou zásadou, přičemž dochází ke změně potenciálu elektrody. Z kalibrační přímky vytvořené na základě hodnot potenciálu standardních roztoků je dopočtena koncentrace amonných iontů.

Vznik amonných iontů může být stanoven pomocí Nesslerova činidla, které obsahuje tetrajódotuřnatan draselný, díky němuž je možná detekce už malého množství vznikajících amonných iontů, kdy dochází ke vzniku hnědožluté sraženiny. Spektrofotometricky je stanovena absorbance při absorpčním maximu 400-435 nm (Francis *et al.*, 2002).

Nikelnatý enzym ureasa, často extrahovaný z *Canavalia ensiformis* či *Bacillus pasteurii*, je schopen vysoce selektivní degradace močoviny na amoniak a oxid uhličitý. Kyselá ureasa z *Lactobacillus fermentum* je účinná v oblasti pH 3,0 – 4,0 a byla využita ke snížení močoviny ve víně, aby bylo zabráněno vzniku vysokých hladin ethylkarbamátu (Kodama & Suzuki, 1995). Ke stanovení močoviny při aplikaci ureasy byla použita metodika využívající UV-VIS fotometrickou nebo elektrochemickou detekci. První z nich zahrnuje Berthelotovu reakci, při které uvolněný amoniak reaguje s fenolem a s chlornanovými ionty za vzniku modré barvy, a to zejména v přítomnosti nitritopentakynoželezitého komplexu (Taylor & Vadgama, 1992).

Pro stanovení močoviny v klinických vzorcích dominuje ureasou katalyzovaná hydrolýza, následně je často využívanou metodou kolorimetrie a elektrochemická detekce.

4 Experimentální část

4.1 Materiály

hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)	PENTA (Česká republika)
dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	PENTA (Česká republika)
jodistan sodný ($NaIO_4$)	Sigma-Aldrich (Německo)
ureasa (<i>Canavalia ensiformis</i> , Jack bean)	Sigma-Aldrich (Německo)
magnetické mikročástice MG 100	IONTOSORB(Česká republika)
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich (Německo)
methanol (99%)	Lach-Ner (Česká republika)
kyselina fosforečná (H_3PO_4), 99,9%	Lachema (Česká republika)
močovina	Sigma-Aldrich (Německo)
trifluoroctová kyselina	Sigma-Aldrich (Německo)
pyridin	Sigma-Aldrich (Německo)
<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA)	Sigma-Aldrich (Německo)
trimethylchlorsilan (TMCS)	Sigma-Aldrich (Německo)
glycin	Lachema (Česká republika)
tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Německo)
kyselina chlorovodíková	Lach-Ner (Česká republika)
moč od pacienta, 28 let	
víno:	
Rulandské šedé, Znovín Znojmo, 2014	Kaufland (Česká republika)
Ryzlink vlašský, Vinné sklepy Valtice, 2012	Albert (Česká republika)
Pálava, PPS AGRO Strachotín, 2014	Albert (Česká republika)
Veltlínské zelené, Vinice Hnanice, 2013	Kaufland (Česká republika)
Irsai Oliver, Vinice Hnanice, 2013	Kaufland (Česká republika)

4.2 Přístroje

Analytické váhy	Sartorius (Německo)
Automatický rotátor	Biosan (Lotyšsko)
Centrifuga chlazená	Eppendorf (Německo)
Vortex V-1 plus	Biosan (Lotyšsko)
Pipety 1 μ l-5ml	Eppendorf (Německo), Gilson (Francie)
pH metr digitální	WTW (Německo)
Mikrodestičkový reader Synergy HT	BioTek (USA)
Lyofilizátor LYOVAC GT2	Leybold Heraeus (Německo)
Plynový chromatograf Agilent 7820A	Agilent Technologies (USA)
Lázeň inkubační suchá	Major Science (USA)
Odstředivka laboratorní stolní	MPW Med. Instruments
Třepačka TS-100	Biosan (Lotyšsko)

4.3 Metody

4.3.2 Imobilizace ureasy pomocí jodistanu

Do 2 ml mikrokumavek bylo naváženo 100 mg magnetických mikročásteček Perlosa MG 200. K nim byly přidány 2 ml 50 mmol.l⁻¹ roztoku NaIO₄. Mikrokumavky byly umístěny na automatický rotátor a byly protřepávány při 4°C v lednici do druhého dne. Mikročástečky byly od roztoku separovány pomocí vnějšího magnetického pole, roztok byl odpipetován a mikročástečky byly 5x promyty fosfátovým pufrům (0,1 mol.l⁻¹ K-Pi; pH 8,0). K promytným mikročástečkám bylo dále přidáno 500 µl roztoku ureasy (10 mg.ml⁻¹) z *Canavalia ensiformis*, 950 µl pufru (0,2 mol.l⁻¹ K-Pi; pH 8,0) a 450 µl vody. Tato směs byla protřepávána na automatickém rotátoru při 4°C v lednici do druhého dne. Mikročástečky byly od roztoku separovány pomocí vnějšího magnetického pole, roztok byl odpipetován a mikročástečky byly 10x promyty fosfátovým pufrům (0,1 mol.l⁻¹ K-Pi; pH 7,0) za účelem odstranění nenavázaného enzymu. Po přidání enzymu k mikročástečkám, po imobilizaci a po prvním promytí fosfátovým pufrům bylo vždy odebráno 50 µl roztoku pro stanovení koncentrace proteinu.

4.3.2 Stanovení koncentrace proteinů (množství imobilizované ureasy)

Koncentrace celkových proteinů ve vzorcích byla měřena pomocí metody Bradfordové. Do jamek mikrodestičky bylo vždy pipetováno 50 µl vzorku nebo vody a 200 µl pracovního roztoku Bradfordova činidla. 50 µl vzorku bylo vždy odebráno před imobilizací, po imobilizaci enzymu a po prvním promytí mikročásteček. Pracovní roztok Bradfordova činidla byl připraven smícháním vody a zásobního roztoku Coomassie Brilliant Blue G250 v poměru 4:1. Zásobní roztok Coomassie Brilliant Blue G250 byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 v 25 ml MeOH a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Roztok byl doplněn do 100 ml deionizovanou vodou. Destička byla protřepána a po 5 minutách byla změřena absorbance na mikrodestičkovém readeru při vlnové délce 595 nm. Z rozdílu naměřených hodnot absorbancí před imobilizací, po imobilizaci a po prvním promytí mikročásteček bylo stanoveno množství imobilizovaného enzymu.

4.3.3 Stanovení aktivity ureasy

Aktivita ureasy byla stanovena nepřímou metodou, a to měřením nezreagovaného substrátu, močoviny, pomocí plynové chromatografie.

K promytým mikročasticím s imobilizovanou ureasou bylo pipetováno 800 μl vody a 1200 μl roztoku 500 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ močoviny ve 41,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovém pufru (K-Pi, pH 7,0). Mikrozkušavky byly promíchávány na třepačce, kde proběhla reakce při 37°C po dobu 40 minut. Reakce byla zastavena odebráním 180 μl reakční směsi a přidáním k 20 μl 10% trifluoroctové kyselině (TFA). Vzorky byly poté centrifugovány (14000 g, 8 minut, 4°C). Do krimpovacích vialek bylo pipetováno 50 μl supernatantu, nato byly vzorky zmrazeny na teplotu -80°C po 30 minut, následovala lyofilizace vzorků po dobu 3 hodin. Ke vzorkům bylo vždy pipetováno 300 μl derivatizační směsi. Derivatizační směs byla připravena smícháním 150 μl pyridinu, 150 μl *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) s obsahem 1% trimethylchlorsilan (TMCS), a 10 μl TMSC. Vzduch z vialky byl odstraněn plynným dusíkem, vialky byly ihned opatřeny víčky a uzavřeny pomocí krimpovacích kleští. Vzorky byly dány do inkubační lázně, kde proběhla derivatizace močoviny při 80°C po dobu 45 minut. Měření zderivatizované močoviny proběhlo na plynovém chromatografu, kde píky odpovídaly retenčním časům 8,4; 8,9 a 9,2 minuty. Obsahy ploch pod jednotlivými píky byly sečteny a bylo zjištěno množství nezreagované močoviny v reakční směsi. Následně bylo dopočteno zreagované množství močoviny a byla stanovena aktivita ureasy. Aktivita ureasy je vyjádřena v nkat, zreagované množství močoviny v μmol , případně v procentech (%).

4.3.4 Plynová chromatografie

K detekci derivatizované močoviny byl použit plynový chromatograf Agilent 7820A od firmy Agilent Technologies (USA) s detekcí ionizační plamenem (FID). Pro ovládání plynového chromatografu byl používán software Agilent OpenLAB CDS EZChrom Compact. Zdrojem nosného plynu byla tlaková lahev obsahující dusík (průtok 30 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Pro FID byla potřeba tlaková láhev s vodíkem (průtok 25 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) a vzduchu (průtok 400 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$), jejichž přívod byl veden do oblasti detektoru. Vzorek o objemu 1 μl byl automaticky dávkován injekční stříkačkou přes pryžové septum do proudu nosného plynu. Čas analýzy vzorku byl 11,7 min. Pro termostat byl použit následující teplotní režim: v čase 0-4 min 80°C, 4-8,5 min 170°C, 8,5-11,7 min 250°C, 11,7-13,7 min 300°C. Po tomto teplotním režimu následovalo zchlazení

detektoru na teplotu 80°C aby mohla být provedena analýza dalšího vzorku. Píky derivatizované močoviny odpovídaly retenčním časům 8,4; 8,9 a 9,2 minuty.

4.3.5 Stanovení specifické aktivity ureasy

Specifická aktivita ureasy byla stanovena z měření množství navázaného enzymu a z hodnot aktivity ureasy. Specifická aktivita ureasy je vyjádřena v $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$.

4.3.6 Vytvoření kalibrační přímky pro močovinu

Pro vytvoření kalibrační přímky byly použity koncentrace čisté močoviny 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 40 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 60 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do krimpovacích vialek bylo pipetováno 50 μl vzorku, nato byly vzorky zmrazeny, lyofilizovány a derivatizovány. Po analýze na plynovém chromatografu byly naměřené hodnoty píků přiřazeny odpovídajícím koncentracím a z těchto údajů byla vytvořena kalibrační přímka a získána rovnice regrese.

4.3.7 Ověření přesnosti práce a měření plynového chromatografu

Ověření přesnosti měření bylo stanoveno změřením pěti vzorků obsahujících močovinu v koncentraci 300 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do krimpovacích vialek bylo pipetováno 50 μl vzorku, nato zmrazeny, lyofilizovány a derivatizovány. Skutečná koncentrace močoviny byla zjištěna pomocí plynového chromatografu. Po dosažení hodnot intenzit píků do rovnice regrese byla zjištěna koncentrace močoviny.

4.3.8 Volba vhodného množství ureasy pro imobilizaci

Imobilizace ureasy proběhla podobně jako v postupu imobilizace ureasy pomocí jodistanu. K částicím, které byly promyty 5x ve fosfátovém pufru (0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-Pi, pH 8,0), byla přidána ureasa o různých koncentracích tak, aby v imobilizační směsi bylo obsaženo 1, 3, 5, 7, 9, 11 a 13 mg ureasy. U všech vzorků byla stanovena aktivita ureasy, specifická aktivita ureasy a zreagované množství močoviny.

4.3.9 Vliv koncentrace pufru na imobilizaci

Imobilizace ureasy proběhla podobně jako v postupu imobilizace ureasy pomocí jodistanu. Pro imobilizaci ureasy byly zvoleny následující podmínky: voda; 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$;

0,25 mol·l⁻¹; 0,5 mol·l⁻¹ a 1 mol·l⁻¹ K-Pi pufr (pH 8,0). U všech vzorků byla stanovena aktivita ureasy, specifická aktivita ureasy a zreagované množství močoviny.

4.3.10 Blokace reaktivních skupin ureasy

Imobilizace ureasy proběhla podobně jako v postupu imobilizace ureasy pomocí jodistanu. V prvním případě byly po promytí mikročástice s imobilizovanou ureasou vystaveny po dobu 15 minut 0,2 mol·l⁻¹ glycinu. V druhém případě byly po promytí mikročástice s imobilizovanou ureasou vystaveny po dobu 15 minut 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pufru. V třetím případě byla ureasa imobilizována v přítomnosti substrátu (0,1 mol·l⁻¹ močoviny). U všech vzorků byla změřena aktivita ureasy, specifická aktivita ureasy a zreagované množství močoviny.

4.3.11 Stabilita imobilizované a volné ureasy

Imobilizace ureasy proběhla stejně jako v postupu imobilizace ureasy pomocí jodistanu. Imobilizovaná ureasa byla ponechána při laboratorní teplotě (25°C) po dobu 0, 4, 6, 24 a 30 hodin. Při stejných podmínkách byla ponechána také volná ureasa a imobilizovaná ureasa, která byla ošetřena po dobu 15 minut 0,2 mol·l⁻¹ glycinem. Poté byla u všech vzorků změřena aktivita ureasy, specifická aktivita ureasy a zreagované množství močoviny.

4.3.12 Odstranění močoviny ze vzorků moči

Imobilizace ureasy proběhla stejně jako v postupu imobilizace ureasy pomocí jodistanu. K imobilizované urease byla přidána moč neznámého pacienta v různých koncentracích. Koncentrace močoviny v moči byla 330 mmol·l⁻¹. Ředěna byla na koncentraci 10, 25, 50, 100 a 150 mmol·l⁻¹. U těchto vzorků byla stanovena aktivita ureasy, specifická aktivita ureasy a zreagované množství močoviny.

4.3.13 Odstranění močoviny ze vzorků vína

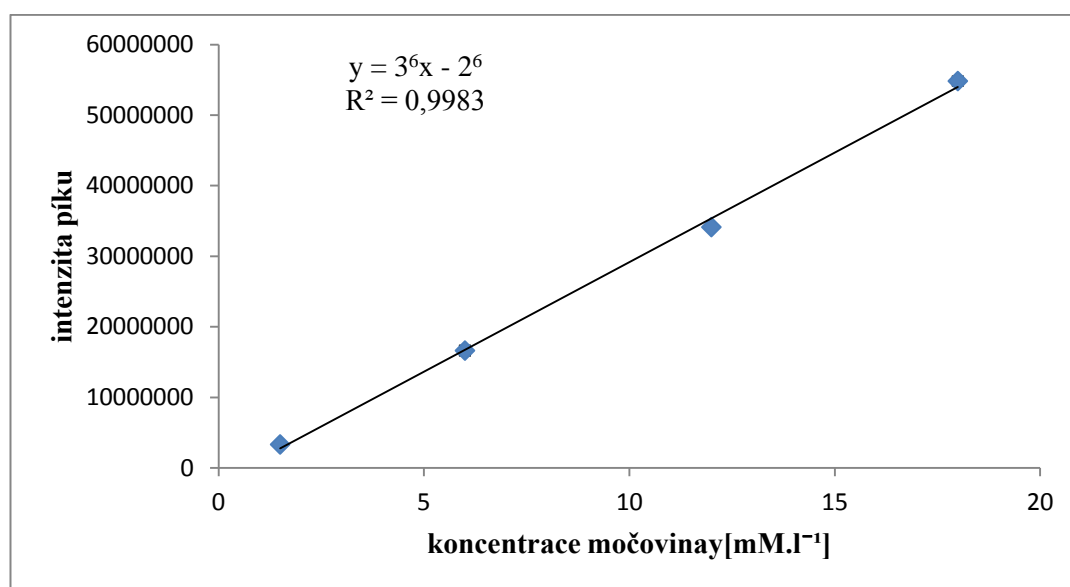
Imobilizace ureasy proběhla stejně jako v postupu imobilizace ureasy pomocí jodistanu. K imobilizované urease byly přidány vždy 2 ml vína bez přídavku močoviny. Ke stanovení bylo použito celkem 5 druhů vín (Rulandské šedé, Ryzlink vlašský, Pálava, Veltlínské zelené a Irsai Oliver). Pouze ke vzorku vína Rulandské šedé bylo pro

další stanovení přidáno takové množství močoviny, aby byla ve vzorku celková koncentrace močoviny $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. U vzorků byla stanovena aktivita ureasy, specifická aktivita ureasy a zreagované množství močoviny.

4.4 Výsledky

4.4.1 Vytvoření kalibrační přímky pro močovinu

Pro vytvoření kalibrační přímky byly použity koncentrace čisté močoviny 5 mmol.l⁻¹, 20 mmol.l⁻¹, 40 mmol.l⁻¹ a 60 mmol.l⁻¹. Z chromatogramu byly zjištěny naměřené hodnoty intenzit píků. Z těchto hodnot byla sestrojena kalibrační přímka, která je znázorněna na Obr. 8. Z rovnice regrese byly vždy vypočítány koncentrace močoviny v daných vzorcích.



Obr. 8: Graf závislosti intenzity píku na koncentraci močoviny se zobrazenou rovnicí regrese. Pro každou koncentraci močoviny byla provedena tři měření.

4.4.2 Ověření přesnosti práce a měření plynového chromatografu

Přesnost měření byla stanovena změřením pěti vzorků obsahujících močovinu v koncentraci 300 mmol.l⁻¹. Po derivatizaci vzorků byla skutečná koncentrace zjištěna pomocí plynového chromatografu. Množství močoviny ve 2 ml je teoreticky 600 μmol, prakticky byla zjištěna průměrná hodnota 599,9 μmol (viz Tab. 11). Hodnota relativní odchylky měření je 2,5 %.

Koncentrace močoviny [mmol.l ⁻¹]	Látkové množství močoviny ve 2 ml [μmol]	Φ látkové množství močoviny ve 2 ml [μmol]
300	614,58	599,90 ± 14,8
	616,36	
	578,98	
	602,54	
	587,02	

Tab. 11: Hodnoty koncentrace a množství čisté močoviny (množství močoviny bylo přepočteno na 2 ml, což byl objem mikrokumavky používané pro imobilizaci ureasy).

4.4.3 Imobilizace ureasy na magnetické částice

Ureasa byla imobilizována na magnetické mikročástice Perlosa MG 200 jodistanovou metodou. Pro navázání ureasy byly voleny různé podmínky, aby byly zjištěny optimální podmínky pro navázání tohoto enzymu.

4.4.3.1 Volba vhodného množství ureasy pro imobilizaci

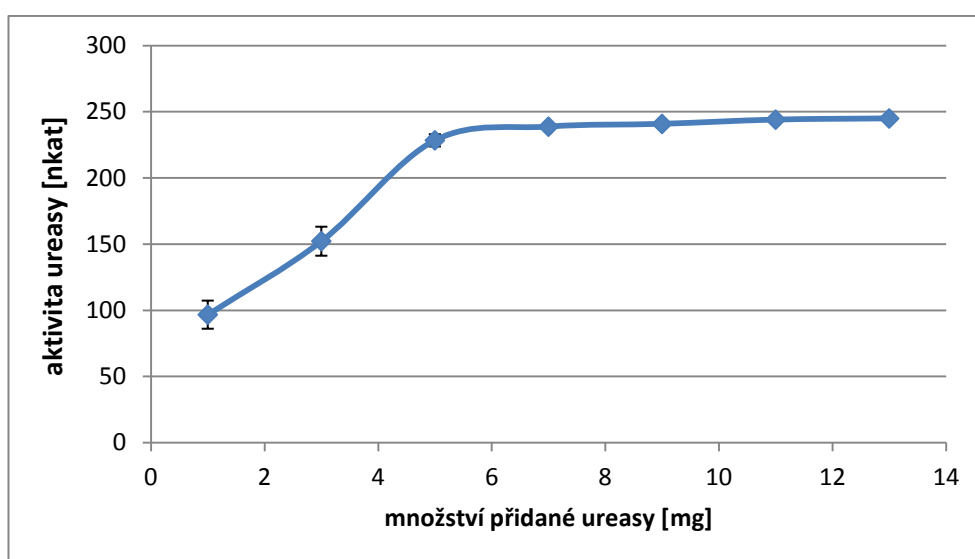
Pro imobilizaci na magnetické mikročástice Perlosa MG 200 bylo použito množství 1 – 13 mg ureasy z *Canavalia ensiformis*. Ureasa byla imobilizována na 100 mg mikročastic v prostředí K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹; pH 8,0). V Tab. 12 jsou uvedena množství přidané ureasy v mg, dále pak hodnoty množství navázané ureasy v mg a v procentech. Hodnota množství navázané ureasy na magnetické mikročástice se zvyšovala na základě přidaného množství ureasy. Nejvyšší nárůst navázání ureasy byl u hodnoty 5 mg, hodnota imobilizované ureasy vzrostla o 7,1 %.

U imobilizované ureasy byla stanovena její aktivita (nkat). Hodnota aktivity ureasy se zvyšovala na základě přídavku ureasy, a to tak, že do hodnoty 5 mg je pozorován velký nárůst aktivity enzymu (viz Obr. 9). Mezi přídavky 5 mg až po 13 mg není již tolik patrný nárůst aktivity enzymu.

Z těchto výsledků vyplývá to, že nejvhodnější množství ureasy z *Canavalia ensiformis* pro imobilizaci na magnetické mikročástice Perlosa MG 200 v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ K-Pi pufru při pH 8,0 je hodnota 5 mg.

Přidaná ureasa [mg]	Množství navázané ureasy [mg]	Navázaná ureasa [%]	Nárůst navázání ureasy [%]
1	0	8,2 ± 0,92	-
3	0,28 ± 0,070	9,3 ± 0,76	1,1
5	0,82 ± 0,274	16,4 ± 1,7	7,1
7	1,25 ± 0,475	17,8 ± 2,7	1,4
9	1,76 ± 0,342	19,6 ± 1,7	1,8
11	2,73 ± 0,622	24,8 ± 2,5	5,2
13	3,34 ± 0,287	25,7 ± 1,1	0,9

Tab. 12: Hodnoty množství navázané ureasy z *Canavalia ensiformis* v mg a procentech pro daný přídavek ureasy do imobilizace. Pro každé stanovení byly provedeny 3 měření.



Obr. 9: Graf závislosti aktivity ureasy z *Canavalia ensiformis* imobilizované na magnetické mikročástici (Perlosa MG 200) na množství přidané ureasy. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

4.4.3.2 Vliv koncentrace pufru na imobilizaci

Pro imobilizaci enzymu na magnetické mikročástici má značný vliv koncentrace pufru. Pro imobilizaci ureasy z *Canavalia ensiformis* na magnetické mikročástici Perlosa MG 200 byly zvoleny následující podmínky: voda; 0,1 mol·l⁻¹; 0,25 mol·l⁻¹; 0,5 mol·l⁻¹ a 1 mol·l⁻¹ K-Pi pufr (pH 8,0). Pro imobilizaci bylo použito 5 mg ureasy z *Canavalia ensiformis*. Množství navázané ureasy bylo zjištěno z celkové koncentrace proteinů před a po imobilizaci enzymu pomocí metody Bradfordové. V přítomnosti vody bylo navázáno 0,09 mg ureasy z celkového množství 5 mg, což odpovídá 1,77 %

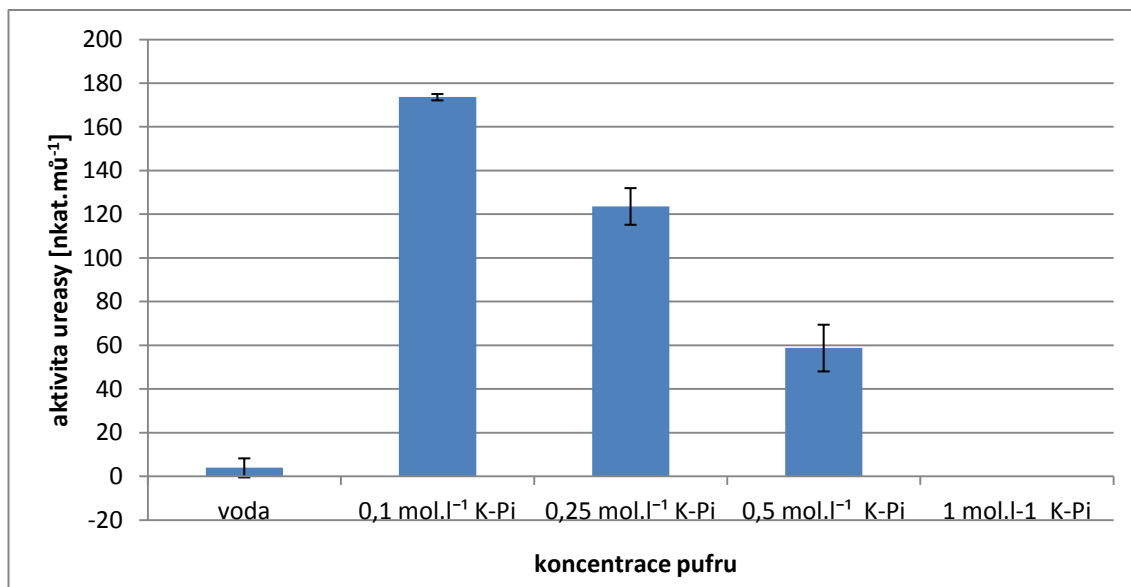
(viz Tab. 13). V případě K-Pi pufru se navázalo nejvíce ureasy u 0,1 mol.l⁻¹ K-Pi pufru, a to 0,64 mg ureasy z celkového množství 5 mg, což odpovídá 12,83 %. U 1 mol.l⁻¹ K-Pi pufru byla koncentrace pufru tak vysoká, že bylo bráněno správnému měření celkového množství proteinů stanovených pomocí metody Bradfordové. Vlivem tohoto prostředí nedošlo k navázání ureasy.

U imobilizované ureasy byla stanovena aktivita (nkat.ml⁻¹). V prostředí vody byla aktivita ureasy nejnižší, 3,9 nkat.ml⁻¹ (viz Obr. 10). Naopak nejvyšší aktivitu vykazovala ureasa imobilizovaná v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ K-Pi pufru, 173,6 nkat.ml⁻¹. Aktivita ureasy imobilizované v prostředí 0,25 mol.l⁻¹ K-Pi pufru byla 123,6 nkat.ml⁻¹, v prostředí 0,5 mol.l⁻¹ K-Pi pufru 58,8 nkat.ml⁻¹. Aktivita ureasy, jenž byla imobilizována v prostředí 1 mol.l⁻¹ K-Pi pufru, byla nulová, nedošlo totiž k navázání enzymu.

Z výsledků vyplývá, že nejvhodnější koncentrace pufru pro imobilizaci ureasy z *Canavalia ensiformis* na magnetické mikročástice Perlosa MG 200 je prostředí 0,1 mol.l⁻¹ K-Pi pufru.

Koncentrace pufru	Navázáno ureasy [mg]	Navázáno ureasy [%]
voda	0,09 ± 0,008	1,8 ± 0,44
0,1 mol.l ⁻¹ K-Pi	0,64 ± 0,071	12,8 ± 0,55
0,25 mol.l ⁻¹ K-Pi	0,51 ± 0,042	10,2 ± 0,42
0,5 mol.l ⁻¹ K-Pi	0,19 ± 0,049	3,8 ± 1,29
1 mol.l ⁻¹ K-Pi	0	0

Tab. 13: Hodnoty množství navázané ureasy uvedené v mg a v procentech pro různé koncentrace pufru. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.



Obr. 10: Graf závislosti aktivity ureasy z *Canavalia ensiformis* imobilizované na magnetické mikročástice (Perlosa MG 200) na koncentraci pufru. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

4.4.3.3 Blokace reaktivních skupin ureasy

Reaktivní skupiny ureasy byly blokovány za účelem zvýšení stability enzymu. Pro blokaci reaktivních skupin byla použita imobilizace ureasy z *Canavalia ensiformis* magnetické mikročástice (Perlosa MG 200) v přítomnosti 0,1 mol.l⁻¹ močoviny, dále pak ošetření imobilizované ureasy 0,2 mol.l⁻¹ glycinem či 0,1 mol.l⁻¹ Tris-HCl pufrům po dobu 15 minut.

V přítomnosti 0,1 mol.l⁻¹ močoviny došlo k imobilizaci 15,1 % ureasy, při imobilizaci v optimálních podmínkách bylo navázáno 12,1 % (viz Tab. 15). Imobilizace v přítomnosti močoviny byla úspěšnější.

Vliv podmínek na množství zreagované močoviny je uveden v Tab. 16. Při uvážení relativní odchylky bylo odstraněno stejné množství močoviny, pouze množství močoviny odstraněné ureasou ošetřenou glycinem po imobilizaci bylo nižší.

Podmínky	Množství navázané ureasy [mg]	Navázaná ureasa [%]
imobilizace s 0,1 mol.l ⁻¹ močovinou	0,75 ± 0,098	15,06 ± 0,65
imobilizace bez močoviny	0,61 ± 0,152	12,13 ± 1,25

Tab. 15: Množství navázané ureasy z *Canavalia ensiformis* na magnetické mikročástice (Perlosa MG 200) v mg, v %, pro imobilizaci s 0,1 mol.l⁻¹ močovinou v porovnání s imobilizací ureasy bez přídavku močoviny. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

Podmínky	Množství zreagované močoviny [μmol]	Zreagovaná močovina [%]
imob. se 0,1 mol.l ⁻¹ močovinou	320,41 ± 30,42	53,4 ± 5,1
0,1 mol.l ⁻¹ K-Pi	372,75 ± 15,74	62,1 ± 2,6
po imob. – Tris-HCl pufr (0,1 mol.l ⁻¹ ; pH 8)	361,73 ± 34,27	60,3 ± 6,8
po imob. - glycin (0,2 mol.l ⁻¹)	309,94 ± 29,78	51,7 ± 5,0

Tab. 16: Hodnoty zreagovaného množství močoviny uvedených v μmol a v % pro podmínky zvolené pro imobilizaci ureasy z *Canavalia ensiformis* na magnetické mikročástice (Perlosa MG 200). Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

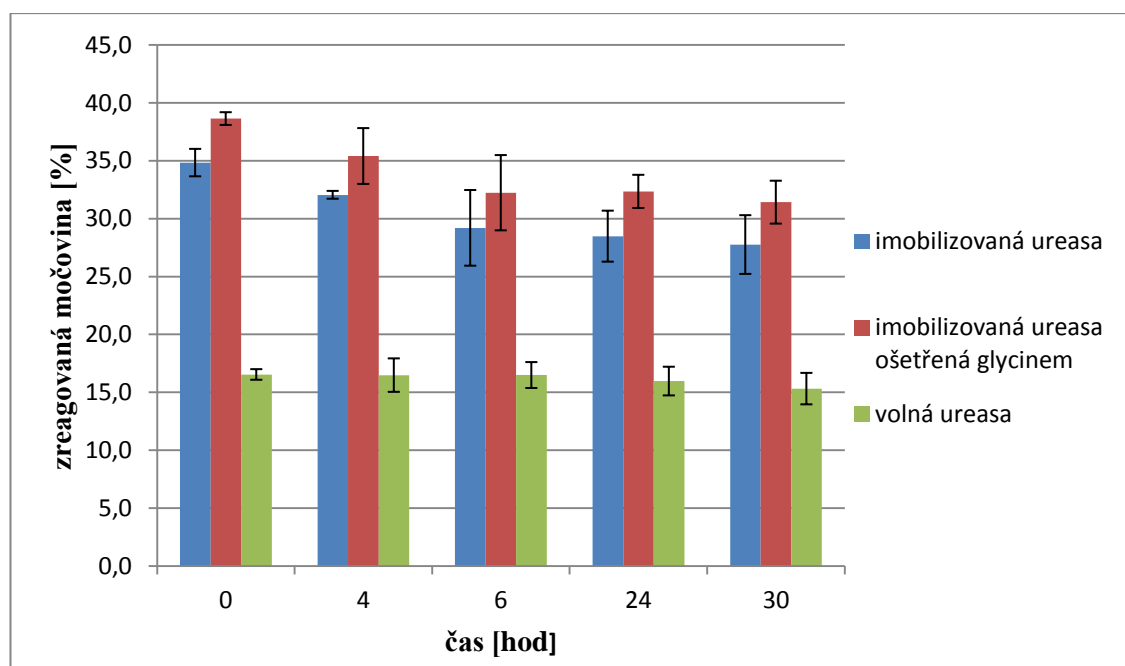
4.4.4 Stabilita volné a imobilizované ureasy

Stabilita volné a imobilizované ureasy byla stanovena v čase 0 hodin, dále pak po 4, 6, 24 a 30 hodinách, kdy po tuto dobu byla ureasa ponechána při laboratorní teplotě. V prvním případě byla pro stanovení použita ureasa z *Canavalia ensiformis* imobilizovaná na magnetické mikročástice (Perlosa MG 200). V druhém případě byla ureasa z *Canavalia ensiformis* imobilizovaná na magnetické mikročástice (Perlosa MG 200) a následně ošetřena 0,2 mol.l⁻¹ glycinem po dobu 15 minut. Ke srovnání byla použita volná ureasa z *Canavalia ensiformis*.

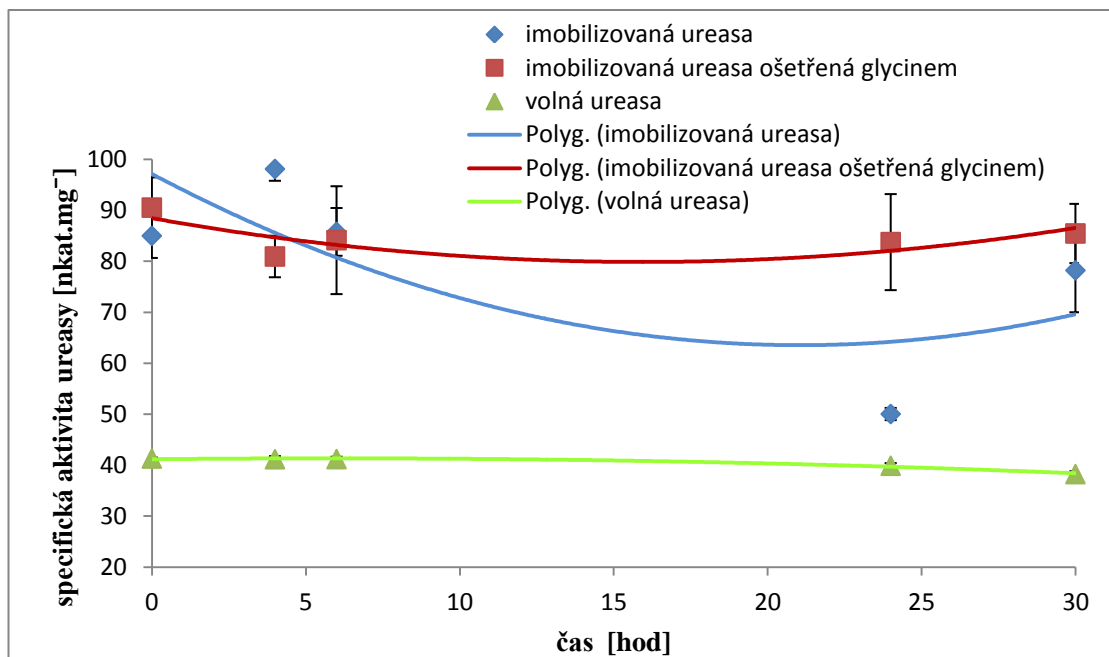
U imobilizované ureasy, imobilizované ureasy následně ošetřené glycinem a volné ureasy, bylo stanoveno množství zreagované močoviny vztažené na 1 mg enzymu obsaženém v reakční směsi (viz Obr. 11). U imobilizované ureasy množství zreagované močoviny v závislosti na čase klesalo, a to z 34,8 % (v čase 0 hodin) na 27,8 % (po 30 hodinách). Imobilizovaná ureasa ošetřená glycinem v čase 0 hodin přeměnila 38,6 % substrátu, po 30 hodinách 31,4 % močoviny. Úbytek přeměněného substrátu v závislosti na čase je přičítán nestabilitě enzymu. Volná ureasa v čase 0 hodin

přeměnila 16,5 % močoviny, po 30 hodinách došlo ke zreagování 15,3 %. Po přihlídnutí ke směrodatné odchylce nelze říct, že by došlo ke snížení zreagovaného množství močoviny v závislosti na čase. V tomto případě by bylo vhodné stanovit stabilitu enzymu v delším časovém úseku.

Specifická aktivita imobilizované ureasy, imobilizované ureasy následně ošetřené glycinem a volné ureasy v závislosti na čase je vyjádřena v jednotkách $\text{nkcat} \cdot \text{mg}^{-1}$ (viz Obr. 12). Hodnota specifické aktivity imobilizované ureasy klesla za 30 hodin z původních $85 \text{ nkcat} \cdot \text{mg}^{-1}$ (100 %) na $78,2 \text{ nkcat} \cdot \text{mg}^{-1}$ (92 %). U imobilizované ureasy ošetřené glycinem klesla specifická aktivita v průběhu 30 hodin z $90,6 \text{ nkcat} \cdot \text{mg}^{-1}$ (100 %) na $85,5 \text{ nkcat} \cdot \text{mg}^{-1}$ (94,4 %). Specifická aktivita volné ureasy byla téměř 2x nižší než u obou případů imobilizované ureasy. Z počáteční hodnoty specifické aktivity, jež byla $41,3 \text{ nkcat} \cdot \text{mg}^{-1}$ (100 %), klesla po 30 hodinách na $38,3 \text{ nkcat} \cdot \text{mg}^{-1}$ (92,6 %). Pokles specifické aktivity ve všech třech případech nebyl tak výrazný, a bylo by proto vhodné stanovit specifickou aktivitu pro delší časové úseky.



Obr. 11: Graf závislosti zreagované močoviny v čase. Zobrazení množství zreagované močoviny (%) vztažené na 1 mg ureasy v reakční směsi pro imobilizovanou ureasu, pro ureasu imobilizovanou a následně ošetřenou $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ glycinem a volnou ureasu. Stanovení bylo provedeno po 4, 6, 24 a 30 hodinách, kdy byla po tuto dobu ureasa ponechána při laboratorní teplotě (25°C). Měření bylo provedeno ve třech opakováních.



Obr. 12: Graf závislosti aktivity imobilizované ureasy, imobilizované ureasy ošetřené glycinem a volné ureasy (nkat.mg⁻¹) na čase. Enzym byl po tuto dobu ponechán při laboratorní teplotě (25°C). Ureasa z *Canavalia ensiformis* byla imobilizována na magnetické mikročástice Perlosa MG 200. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

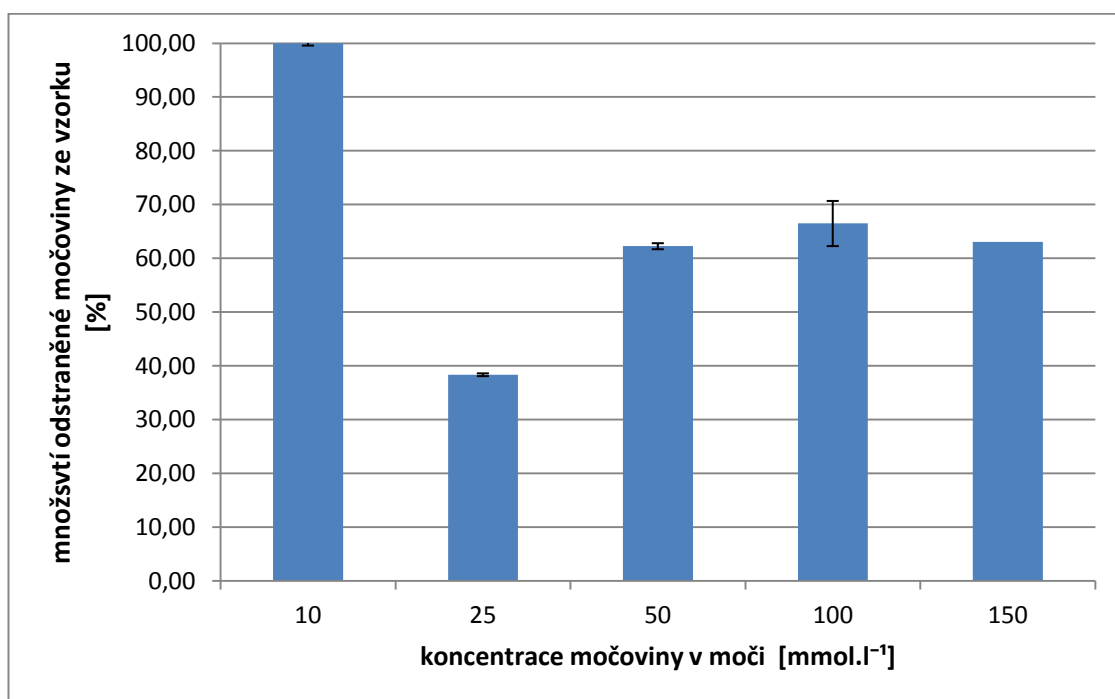
4.4.5 Praktické využití imobilizované ureasy

Pro praktické využití ureasy z *Canavalia ensiformis* imobilizované na magnetické mikročástice Perlosa MG 200 bylo provedeno odstranění močoviny ze vzorků moči a vína.

4.4.5.1 Odstranění močoviny ze vzorků moči

Pro odstranění močoviny z moči byl použit vzorek moči muže (28 let). Ve vzorku moči byla naměřena koncentrace 330 mmol.l⁻¹ močoviny, měření bylo provedeno v laboratoři Fakultní nemocnice Olomouc. Ureasa z *Canavalia ensiformis* byla imobilizována na magnetické mikročástice Perlosa MG 200 v prostředí K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹; pH 8,0). Pro imobilizaci bylo použito 5 mg enzymu.

Moč byla ředěna na koncentraci 10, 25, 50, 100 a 150 mmol.l⁻¹ a následně z ní byla odstraňována močovina. Množství odstraněné močoviny (%) pro jednotlivé koncentrace močoviny je znázorněno na Obr. 12. U koncentrace 25 mmol.l⁻¹ bylo odstraněno 38,4 % močoviny ze vzorku, u koncentrace 50 mmol.l⁻¹ bylo odstraněno 62,3 % močoviny. V případě koncentrace 100 a 150 mmol.l⁻¹ bylo odstraněno 66,5 a 63,1 % močoviny. U nejnižší koncentrace 10 mmol.l⁻¹ došlo k úplnému odstranění močoviny.



Obr. 13: Znázornění množství odstraněné močoviny ze vzorku (%) u daných koncentrací močoviny v moči (mmol.l⁻¹). Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

4.4.5.2 Odstranění močoviny ze vzorků vína

Pro odstranění močoviny z vína bylo použito celkem 5 druhů vín (Tab. 17). U těchto vín bylo změřeno pH. Nejvyšší pH mělo Rulandské šedé, 3,64. Naopak nejnižší pH měl Ryzlink vlašský, 3,32.

Ve vzorcích vín byly naměřeny různé koncentrace močoviny (Tab. 18). Nejvyšší koncentrace močoviny byla naměřena v Pálavě, a to 8,94 mg.l⁻¹ vína. Nejnižší hodnota močoviny byla v Rulandském šedém, 2,13 mg.l⁻¹ vína.

Ureasa z *Canavalia ensiformis* byla imobilizována na magnetické mikročástice Perlosa MG 200 v prostředí K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹; pH 8,0). Pro imobilizaci bylo použito 5 mg enzymu. K imobilizované urease byly přidány vždy 2 ml vína. Množství odstraněné močoviny je shrnuto v Tab. 19. Rulandské šedé obsahovalo ve 2 ml 71,1 μmol močoviny, odstraněno bylo 41 μmol (57,6 %). Ryzlink vlašský obsahoval ve 2 ml 214,7 μmol močoviny, imobilizovanou ureasou bylo odstraněno 93,1 μmol (43,4 %). V Pálavě bylo obsaženo ve 2 ml 297,7 μmol močoviny, odstraněno bylo 128 μmol (43 %). Veltlínské zelené obsahovalo ve 2 ml 197,3 μmol močoviny, zreagovalo 66,4 μmol (33,6 %). Irsai Oliver obsahoval 198,3 μmol močoviny ve 2 ml, bylo odstraněno 84,4 μmol (42,6 %). V případě vína Rulandské šedé, kde byla přidána močovina do výsledné koncentrace 3 mg.l⁻¹, bylo ze 2 ml z množství 99,9 μmol odstraněno 50,8 μmol močoviny (50,8 %).

Víno	Ročník	Producent	pH
Rulandské šedé	2014	Znovín Znojmo	3,64
Ryzlink vlašský	2012	Vinné sklepy Valtice	3,32
Pálava	2014	Strachotín	3,47
Veltlínské zelené	2013	Vinice Hnanice	3,43
Irsai Oliver	2013	Vinice Hnanice	3,61

Tab. 17: Základní informace vín použitých k odstranění močoviny, uveden je ročník, producent a hodnota pH vína.

Víno	Koncentrace močoviny [μmol.ml ⁻¹] ve víně	Koncentrace močoviny [mg.l ⁻¹] ve víně
Rulandské šedé	35,55 ± 0,30	2,13 ± 0,02
Ryzlink vlašský	107,33 ± 0,66	6,45 ± 0,04
Pálava	148,87 ± 5,22	8,94 ± 0,31
Veltlínské zelené	98,67 ± 3,29	5,93 ± 0,20
Irsai Oliver	99,17 ± 2,46	5,96 ± 0,15

Tab. 18: Naměřené hodnoty koncentrace močoviny ve víně v μmol.ml⁻¹ převedené na mg.l⁻¹. Hodnoty koncentrace močoviny bývají v literatuře uváděny v jednotkách mg.l⁻¹ vína. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

Víno	Množství močoviny ve 2 ml vína [μmol]	Odstraněná močovina [μmol]	Odstraněná močovina [%]
Rulandské šedé	$71,1 \pm 0,6$	$41,0 \pm 1,14$	$57,63 \pm 1,60$
Ryzlink vlašský	$214,7 \pm 1,3$	$93,1 \pm 5,70$	$43,37 \pm 2,66$
Pálava	$297,7 \pm 10,4$	$128,0 \pm 6,60$	$42,99 \pm 2,22$
Veltlínské zelené	$197,3 \pm 6,6$	$66,4 \pm 3,93$	$33,64 \pm 2,00$
Irsai Oliver	$198,3 \pm 4,9$	$84,4 \pm 0,27$	$42,55 \pm 0,13$
Rulandské šedé + močovina*	$99,9 \pm 0,7$	$50,7 \pm 1,30$	$50,77 \pm 1,30$

Tab. 19: Hodnoty množství močoviny (μmol) ve víně a množství odstraněné močoviny (μmol , %) pro daný druh vína. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

* přídavek močoviny na výslednou koncentraci 3 mg.l^{-1}

4.5 Diskuze

Hlavním cílem diplomové práce je optimalizace imobilizace ureasy z *Canavalia ensiformis* na magnetické mikročástice Perlosa MG 200. Pro imobilizaci byla zvolena jodistanová metoda, kdy pomocí jodistanu sodného byla aktivována celulóza na povrchu magnetických mikročástic. Na takto aktivované mikročástice byla imobilizována ureasa. Bylo posuzováno množství navázané ureasy na mikročástice Perlosa MG 200, dále pak byl zkoumán vliv koncentrace pufru na imobilizaci a vliv na blokaci reaktivních skupin ureasy. Byla testována stabilita volné a imobilizované ureasy při laboratorní teplotě (25°C).

Bylo testováno, jak koncentrace ureasy přidané k aktivovaným částicím ovlivní množství navázané ureasy. Pro zjištění optimálních podmínek bylo zkoumáno procentuální množství navázané ureasy, kdy bylo pro imobilizaci použito množství 1, 3, 5, 7, 9, 11 a 13 mg ureasy na 100 mg částic. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo v případě použití 5 mg na 100 mg částic pro imobilizaci, kdy došlo k navázání 0,82 mg ureasy na 100 mg částic. Zvolením vhodného množství pro imobilizaci se zabrání zbytečnému plýtvání enzymem (Krajewska, 2009b), což by při použití ve velkém měřítku mohlo mít i negativní dopad z ekonomického hlediska.

Dále bylo zkoumáno optimální prostředí pro imobilizaci ureasy z *Canavalia ensiformis* na magnetické mikročástice Perlosa MG 200. Použity byly tyto podmínky: voda; 0,1 mol·l⁻¹; 0,25 mol·l⁻¹; 0,5 mol·l⁻¹ a 1 mol·l⁻¹ K-Pi pufr (pH 8,0). Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při imobilizaci v podmínkách 0,1 mol·l⁻¹ K-Pi pufru, kdy se navázalo 0,64 mg (12,83 %) ureasy na 100 mg částic z celkového množství 5 mg ureasy přidané do imobilizace. Takto imobilizovaná ureasa vykazovala aktivitu 173,63 nkat.ml⁻¹. β-Galaktosidasa z *Bacillus circulans* byla imobilizována na Eupergit C (Hernaiz & Crout, 2000) při různých koncentracích K-Pi pufru. Byly použity pufrы o koncentraci 0,2 – 1,4 mol·l⁻¹. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo, když imobilizace probíhala při koncentraci 1 mol·l⁻¹, kdy se navázalo nejvíce proteinu (100 %) a zároveň při této koncentraci měla β-galaktosidasa nejvyšší aktivitu. Je tedy důležité zvolit pro daný enzym vhodnou koncentraci pufru pro imobilizaci, neboť každý enzym má jiné vlastnosti a efektivita imobilizace velmi závisí i na prostředí, ve kterém je enzym imobilizován.

Pro blokaci reaktivních skupin ureasy byla ureasa imobilizována v přítomnosti 0,1 mol·l⁻¹ močoviny. Tato koncentrace (která je 2x vyšší) byla zvolena na základě potřebné koncentrace pro maximální rychlost reakce ureasy, jenž je 0,05 mol·l⁻¹

(Krajewska, 2012). V této diplomové práci byl dále zkoumán vliv ošetření imobilizované ureasy 0,2 mol.l⁻¹ glycinem či 0,1 mol.l⁻¹ Tris-HCl pufrům po dobu 15 minut. V přítomnosti 0,1 mol.l⁻¹ močoviny bylo navázáno 15,1 % ureasy, při imobilizaci bez použití močoviny se navázalo 12,1 %. Komerčně dostupná ureasa ztratí asi 50 % své aktivity během skladování v lednici v lyofilizovaném stavu po dobu půl roku. Během skladování při laboratorní teplotě nebo v rozpuštěné formě je ztráta aktivity rychlejší (Schneider *et al.*, 1980). Byly provedeny pokusy pro zvýšení stability ureasy, a to např. v přítomnosti různého pH pufru, při různé iontové síle, přidáním malátu, či citrátu, nebo přidávkem sloučenin obsahujících sulfhydrylovou skupinu, jako je cystein a merkaptoethanol, nicméně tyto pokusy byly neúspěšné. Dobrých výsledků dosáhlo přidání stabilizačního činidla obsahujícího směs glutationu, EDTA a citrátu. Tato směs po lyofilizaci a po skladování po dobu 12 týdnů při teplotě 33°C vykazovala 100 % původní aktivity. Enzym bez přídavku směsi ztratil po skladování za stejných podmínek 20 % původní aktivity (Schneider *et al.*, 1980). Ureasa z *Lactobacillus fermentum* byla kovalentně vázaná na Eupergit C 250 L (Andrich *et al.*, 2009) v 0,05 mol.l⁻¹ K-Pi pufru (pH 7), následně byla stabilizovaná glycinem o koncentraci 0,075 mol.l⁻¹ při 4°C po 20 minut. Takto imobilizovaná ureasa vykazovala lepší výsledky než ureasa neošetřená glycinem. Po skladování při 4°C po dobu 34 dnů vykazovala 69 % své původní aktivity.

Měřena byla také stabilita ureasy z *Canavalia ensiformis*. Stabilita byla testována pro imobilizovanou ureasu, pro ureasu imobilizovanou a následně ošetřenou 0,2 mol.l⁻¹ glycinem po dobu 15 minut a pro volnou ureasu. Stabilita byla měřena při laboratorní teplotě (25°C) v čase 0 hodin, poté po 4, 6, 24 a 30 hodinách. Specifická aktivita imobilizované ureasy klesla z hodnoty 85,0 nkat.mg⁻¹ za 30 hodin na 78,2 nkat.mg⁻¹ (na 92 %). Imobilizovaná ureasa ošetřená glycinem vykazovala po 30 hodinách specifickou aktivitu 85,5 nkat.mg⁻¹ (pokles na 94,4 %) oproti počáteční specifické aktivitě (90,6 nkat.mg⁻¹). Specifická aktivita volné ureasy byla téměř 2x nižší než u obou případů imobilizované ureasy, kdy specifická aktivita klesla po 30 hodinách na 38,3 nkat.mg⁻¹ (92,6 %) z počáteční specifické aktivity 41,3 %. Obecně platí, že enzymy nejsou stabilní při skladování v roztoku, jejich aktivita se v průběhu času postupně snižuje nebo je ztracena úplně. Danial *et al.*, 2015, imobilizovali ureasu z *Canavalia ensiformis* na alginátové částice. Takto imobilizovaná ureasa vykazovala po skladování při laboratorní teplotě po 21 dnech aktivitu 83 %, úplnou ztrátu vykazovala po 50 dnech. Oproti tomu volná ureasa ztratila veškerou aktivitu již po

14 dnech. Imobilizovaná ureasa vykazovala vyšší stabilitu než volná ureasa. Chellapandian & Krishnan, 1998, imobilizovali kovalentně ureasu z *Canavalia ensiformis* na kopolymer chitosan-poly(glycidyl methakrylát). Imobilizovanou ureasu skladovali při laboratorní teplotě (25°C) a při 4°C ve fosfátovém pufru (pH 7,5). Po 60 dnech vykazovala ureasa po skladování při 4°C 73 % své původní aktivity, po skladování při laboratorní teplotě si uchovala 58 % původní aktivity. Ureasa z *Canavalia ensiformis* imobilizovaná na magnetické nanočástice pomocí karbodiimidové reakce si po 45 dnech skladování při teplotě 4°C zachovala 70 % své původní aktivity (Sahoo, *et al.*, 2011). Všechny tyto studie zkoumaly aktivitu ureasy po delší časové úseky. V této diplomové práci byla stabilita měřena pouze po dobu 30 hodin, kdy byl sice zaznamenán pokles specifické aktivity ureasy, ale bylo by vhodné změřit stabilitu i pro delší časový úsek.

Na základě výše získaných výsledků, byly pro praktické aplikace zvoleny pro imobilizaci tyto optimální podmínky, které zajišťují vyšší množství enzymu, které je schopno navázání se na částice (Danial *et al.*, 2015). Tímto způsobem imobilizovaná ureasa byla použita pro odtranění močoviny ze vzorků moči či ze vzorků vína.

Ve stanovovaném vzorku moči byla zjištěna koncentrace močoviny 330 mmol.l⁻¹ (tato hodnota byla stanovena v laboratoři Fakultní nemocnice Olomouc). Koncentrace močoviny v moči u zdravých lidí se pohybuje v rozmezí 166,5 – 333,0 mmol.l⁻¹ (Alqasimeh *et al.*, 2014). Vzorek moči byl ředěn na různé koncentrace a následně z něj byla pomocí imobilizované ureasy odstraňována močovina. U koncentrace 25 mmol.l⁻¹ močoviny se podařilo odstranit 38,4 % močoviny ze vzorku, u koncentrace 50 mmol.l⁻¹ 62,3 % močoviny, v případě koncentrace 100 mmol.l⁻¹ 66,5% a u koncentrace 150 mmol.l⁻¹ bylo odstraněno 63,1 % močoviny. Odstranění nebo snížení koncentrace močoviny v moči je důležité z hlediska stanovení metabolitů obsažených v moči v nízkých koncentracích metodou plynové chromatografie, kdy močovina při tomto stanovení interferuje. Vysoká koncentrace močoviny ve vzorku komplikuje mnohá měření, především metody založené na separaci pomocí plynové chromatografie. Použití volné ureasy v tomto případě není možné, je zapotřebí ureasu od vzorku oddělit, aby mohly být stanoveny metabolity. Využívá se proto imobilizovaných enzymů, u nichž je výhodou jednoduchá separace od produktu či reakční směsi (Sheldon, 2007).

Plynovou chromatografií byly stanoveny takovéto koncentrace močoviny ve víně: Rulandské šedé 35,6 μmol.ml⁻¹ (2,1 mg.l⁻¹), Ryzlink vlašský 107,3 μmol.ml⁻¹

(6,5 mg.l⁻¹), Pálava 148,9 μmol.ml⁻¹ (8,9 mg.l⁻¹), Veltlínské zelené 98,7 μmol.ml⁻¹ (5,9 mg.l⁻¹), Irsai Oliver 99,2 μmol.ml⁻¹ (5,9 mg.l⁻¹). Močovina ve víně vzniká důsledkem činnosti kvasinek (Fujinawa *et al.*, 1990), je prekurzorem vzniku ethylkarbamátu, který vzniká degradací argininu. Ethylkarbamát je klasifikován jako pravděpodobně karcinogenní, proto je důležité jeho vzniku předcházet (Pflaum *et al.*, 2016). Jeho přítomnost byla zjištěna u fermentovaných potravin, avšak nejvyšší množství bylo detekováno u alkoholických nápojů. Koncentrace močoviny v komerčním víně se běžně vyskytuje v koncentraci kolem 3 mg.l⁻¹ (Fujinawa *et al.*, 2012). Nižší hodnotu koncentrace močoviny mělo pouze víno Rulandské šedé. Ethylkarbamát je v metabolické dráze postupně oxidován na epoxid vinylkarbamátu, který interferuje s DNA což má za následek mutagenní a karcinogenní účinky (Pflaum *et al.*, 2016). V této diplomové práci byla odstraněna močovina z 5 druhů vín pomocí ureasy z *Canavalia ensiformis* imobilizované na magnetické mikročástice Perlosa MG 200, po 40 minutách došlo k odstranění 33,6 – 57,6 % močoviny ze vzorků. Většina známých ureas je v kyselém prostředí inaktivována. K odstranění močoviny se proto dnes využívají kyselé ureasy získané z *Lactobacillus fermentum*, enzym je komerčně používán k odstranění močoviny z vína a jiných fermentovaných nápojů (Weber & Sharypov, 2009). Například kyselá ureasa byla přidána do japonského saké (20 % ethanolu, 35 mg.l⁻¹ močoviny), koncentrace močoviny byla snížena na nedetekovatelnou úroveň (Miyagawa *et al.*, 1999). Ve studii Esti *et al.*, 2007, bylo k odstranění močoviny z vína použito celkem 5 vzorků vín. Koncentrace močoviny v těchto vínech byla 0,9 – 7,1 mg.l⁻¹. Vzorky vína byly ošetřeny kyselou ureasou v množství 25 mg.l⁻¹ po dobu 30 dnů. Koncentrace močoviny byla ve všech případech snížena pod hranici detekce. Ureasa z *Lactobacillus fermentum* imobilizovaná kovalentně na Eupergit C 250 L a následně stabilizovaná glycinem, byla použita na odstranění močoviny v modelovém víně (Andrich *et al.*, 2009).

5 Závěr

- V této diplomové práci byly optimalizovány podmínky pro imobilizaci ureasy z *Canavalia ensiformis* na magnetické mikročástice Perlosa MG 200 jodistanovou metodou. Ureasa imobilizovaná za optimálních podmínek byla následně využita pro odstranění močoviny ze vzorků moči a vína.
- Při stanovení vhodného množství ureasy pro imobilizaci byla ureasa přidána k 100 mg částic v množství 1 – 13 mg. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo přidáním 5 mg ureasy k 100 mg částic, což vedlo k navázání 0,82 mg ureasy (16,4 %). Aktivita takto imobilizované ureasy byla 228,4 nkat.ml⁻¹.
- Pro stanovení vhodné koncentrace pufru pro imobilizaci byl zvolen 0,1 mol.l⁻¹ K-Pi pufr, kdy se navázalo 0,64 mg ureasy (12,8 %). Aktivita ureasy byla 173,6 nkat.ml⁻¹.
- Při imobilizaci ureasy v přítomnosti 0,1 mol.l⁻¹ močoviny došlo k navázání 15,1 % ureasy na rozdíl od imobilizace bez močoviny, kdy se navázalo pouze 12,1 % ureasy.
- Nejvyšší hodnotu specifické aktivity po 30 hodinách při laboratorní teplotě (25°C) vykazovala imobilizovaná ureasa ošetřená glycinem, a to 85,5 nkat.mg⁻¹, imobilizovaná ureasa neošetřená glycinem vykazovala specifickou aktivitu 78,2 nkat.mg⁻¹. Nejnižší hodnotu specifické aktivity po 30 hodinách měla volná ureasa, 38,3 nkat.mg⁻¹.
- Imobilizovaná ureasa byla použita pro odstranění močoviny z moči. Při koncentraci 100 mmol.l⁻¹ močoviny bylo odstraněno 66,5 % močoviny.
- Imobilizovaná ureasa byla použita pro odstranění močoviny z pěti druhů vín. Pomocí imobilizované ureasy se podařilo snížit koncentraci močoviny v případě 3 druhů vín na 57,0 %, u Veltlínského zeleného na 66,4 % a u Rulandského šedého na 42,4 %.

6 Literatura

Abell A. D., Nabbs B. K. (2001): Ring-deactivated hydroxymethylpyrroles as inhibitors of α -chymotrypsin. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **9**, 621-628.

AGRA homepage: <http://www.agra.cz/aktualni-informace/aktualizovane-7-3-2013-inhibitor-ureazy-pojistka-prednosti-mocoviny.html> (25.5.2016)

Alqasaimeh M., Heng L. Y., Ahmad M., Raj A. S., Ling T. L. (2014): A large response range reflectometric urea biosensor made from silica-gel nanoparticles. *Sensors*, **14**, 13186-13209.

Andrich L., Esti M., Moresi M. (2009): Urea degradation in model wine solutions by free or immobilized acid urease in a stirred bioreactor. *Journal of agricultural and food chemistry*, **57**, 3533-3542.

Arnon R. (1970): *Methods of Enzymology* (G. E. Perlmann, L. Lorand, eds.) Vol. XIX, p. 226. *Academic Press*, Inc.

Bachmeier K. L., Williams A. E., Warmington J. R., Bang S. S. (2002): Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*, **93**, 171-181.

Barman T. E. (1985): *Enzyme Handbook*. Springer.

Barrett A. J., Rawling N. D., Woessner J. F. (1998): *Handbook of proteolytic enzymes*.

Barrett A. J., Rawlings N. D. (1995): Families and clans of serine peptidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **318**, 247-250.

Barsom S., Sasse-Rollenhagen K., Bettermann A. (1983): Zur Behandlung von Zystitiden und Zystopyelitiden mit hydrolytischen Enzymen. *Erfahrungsheilkunde*; **32**, 125-129.

Bayramoğlu G., Yalçın E., Arica M. Y. (2005): Immobilization of urease via adsorption onto L-histidine-Ni (II) complexed poly (HEMA-MAH) microspheres: preparation and characterization. *Process Biochemistry*, **40**, 3505-3513.

Beuth J. (2008): Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: fact of fiction. *Integr. Cancer Ther*, **7**, 311-316.

Blow D. M. (1971): *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.) 3rd ed., Vol. III, p. 185. *Academic Press*.

Blow D. M. (1976): Structure and mechanism of chymotrypsin. *Accounts of chemical research*, **9**, 145-152.

Blumenthal M., Goldberg A., Brinckmann J. (2000): *Herbal Medicine. Expanded Commission E monographs*.

Borghetti C., Gioacchini P., Marzadori C., Gessa C. (2003): Activity and stability of urease-hydroxyapatite and urease-hydroxyapatite-humic acid complexes. *Biology and fertility of soils*, **38**, 96-101.

Breugelmans B., Simonet G., van Hoef V., Van Soest S., Vanden Broeck J. (2009): Pacifastin-related peptides: structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. *Peptides*, **30**, 622–32.

Brien S., Lewith G., Walker A. (2004): Bromelain as a Treatment for Osteoarthritis: a Review of Clinical Studies. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*. **1**, 251–257.

Butler A. R., Walsh D. (1982): Colorimetric non-enzymic methods for the determination of urea: Consideration of the chemical principles upon which an analytical method is based is an essential step in the optimization of that method. It can also contribute to the simplification of procedures used and hence cut the costs of many routine analyses. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **1**, 120-124.

Cao L. (2005): Immobilised enzymes: science or art?. *Current opinion in chemical biology*, **9**, 217-226.

Carter E. L., Flugge N., Boer J. L., Mulrooney S. B., Hausinger R. P. (2009): Interplay of metal ions and urease. *Metallomics* **1**, 207–21.

Castell J. V., Friedrich G., Kuhn C. S., Poppe G. E. (1997): Intestinal absorption of undegraded proteins in men: presence of bromelain in plasma after oral intake. *American Journal of Physiology*.

Coussens L., Fingleton B., Matrisian L. M. (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, **295**, 2387–2392.

Covacci A., Telford J. L., Del Giudice G., Parsonnet J., Rappuoli R. (1999): *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, **284**, 1328–1333.

Danial E. N., Hamza A. H., Mahmoud R. H. (2015): Characteristics of immobilized urease on grafted alginate bead systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **58**, 147-153.

DeGroot A. R., Neufeld R. J. (2001): Encapsulation of urease in alginate beads and protection from α -chymotrypsin with chitosan membranes. *Enzyme and Microbial Technology*, **29**, 321-327.

DeIanni S. C. (1996): Investigating Methods of Detecting Urea in Wine. M. Sc. Thesis, University of California.

Di Cera E. (2009): Serine proteases. *IUBMB Life*, **61**, 510–515.

Di Martino S., El-Sheriff H., Diano N., De Maio A., Grano V., Rossi S., Mita D. G. (2003): Urea removal from agricultural waste waters by means of urease immobilized on nylon membranes grafted with cyclohexyl-methacrylate. *Applied Catalysis B: Environmental*, **46**, 613-629.

Dixon N. E., Riddles P. W., Gazzola C., Blakeley R. L., Zerner B. (1980): Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. *Canadian journal of biochemistry*, **58**, 1335-1344.

Elçin Y. M., Saçak M. (1995): Methacrylic acid–acrylamide-g-poly (ethyleneterephthalate) fibres for urea hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **63**, 174-180.

Emeruwa A. C. (1982): Antibacterial substances from *Carica papaya* fruit extract, J. Nat. Products, **45**, 123-127.

Eremeev N. L., Kukhtin A. V. (1997): Stimuli-sensitive hydrogel material for biosensor-chemical trigger. *Analytica chimica acta*, **347**, 27-34.

Eremeev N. L., Kukhtin A. V., Belyaeva E. A., Kazanskaya N. F. (1999): Effect of thermosensitive matrix-phase transition on urease-catalyzed urea hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, **76**, 45-55.

Esti M., Fidaleo M., Moresi M., Tamborra P. (2007): Modeling of urea degradation in white and rose wines by acid urease. *Journal of agricultural and food chemistry*, **55**, 2590-2596.

ExPASy homepage: <http://enzyme.expasy.org/peptidas.txt> (27.2.2016)

Feinstein G., Hofstein R., Koifmann J., Sokolovsky M. (1974): Human pancreatic proteolytic enzymes and protein inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, **43**, 569-581.

Francis P. S. (2006): The determination of urea in wine—a review. *Australian journal of grape and wine research*, **12**, 97-106.

Francis P. S., Lewis S. W., Lim K. F. (2002): Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *TrAC trends in analytical chemistry*, **21**, 389-400.

Fujinawa S., Burns G., De la Teja P. (1990): Application of acid urease to reduction of urea in commercial wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **41**, 350–354.

Fujinawa S., Kodama S., Todoroki H., Suzuki T. (1992): Trace urea determination in red wine and its degradation rate by acid urease. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 362–366.

Galebskaya L. V., Ryumina E. V., Niemerovsky V. S., Matyukov A. A. (2000): Human complement system state after wobenzyme intake. *VESTNIK MOSKOVSKOGO UNIVERSITETA*, **41**, 148-149.

Geiger R. (1984): Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer J., Graál M., eds.) 3rd ed., Vol. V, p.99. *Verlag Chemie*.

Giuffrida P., Biancheri P., MacDonald T. T. (2014): Proteases and small intestinal barrier function in health and disease. *Current Opinion In Gastroenterology*.

Godfrey T., Reichelt J. (1983): Industrial Enzymology. *Macmillan Publishers Ltd.*

- Gorin G., Butler M. F., Katyal J. M., Buckley J. E. (1959): Isolation of Crystalline Urease. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Sciences*. Retrieved Dec 7, 2014.
- Grudkowska M., Zagdańska B. (2004): Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* **51**, 609–24.
- Ha N. C., Oh S. T., Sung J. Y., Cha K. A., Lee M. H., Oh B. H. (2001): Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Structural Biology* **8**, 505–509.
- Hamaya T., Takizawa T., Hidaka H., Horikoshi K. (1993): A new method for the preparation of magnetic alginate beads. *Journal of chemical engineering of Japan*, **26**, 223-224.
- Hanahan D., Folkman J. (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. **86**, 353–364.
- Hartley B. S. (1964): Amino-acid sequence of bovine chymotrypsinogen-A. *Nature*, **201**, 1284.
- Hase C. C., Finkelstein R.A. (1993): Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol. Rev.*, **57**, 823-837.
- Hatayama H., Swabe T., Kurokawa Y. (1996): Immobilization of urease on composite fibre by using a gel formation of cellulose acetate and titanium iso-propoxide. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **7**, 13-17.
- Hedstrom L. (2002): Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, **102**, 4501–24.
- Hernaiz M. J., Crout D. H. (2000): Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and microbial technology*, **27**, 26-32.
- Honzíková, M. (2004): Systémová enzymoterapie v komplexní léčbě recidivujících zánětů dýchacích cest u dětí – postregistrační retrospektivní multicentrické hodnocení. *Českoslov. Pediat.*, **59**, 513-521.
- Hublica O., Brown M., Egginton S. (1992): Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev.*, **72**, 369–417.
- Hustoft H. K., Malerod H., Wilson S. R., Reubsæet L., Lundanes E., Greibrokk T. (2012): "A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics". *Integrative Proteomics*.
- Chakravarthy P., Acharya S. (2012): Efficacy of extrinsic stain removal by novel dentifrice containing papain and bromelain extracts. *Journal of Young Pharmacist*, **4**, 245–9.
- Chaplin M. F., Bucke C. (1990): The large-scale use of enzymes in solution. *Enzyme technology*.
- Chapman H. A., Riese R. J., Shi G. P. (1997): Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual review of physiology*, **59**, 63-88.

Chaudhari P. S., Gokarna A., Kulkarni M., Karve M. S., Bhoraskar S. V. (2005): Porous silicon as an entrapping matrix for the immobilization of urease. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **107**, 258-263.

Chaurasiya R. S., Sakhare P. Z., Bhaskar N., Hebbar H. U. (2015): Efficacy of reverse micellar extracted fruit bromelain in meat tenderization. *Journal of Food Science Technology*, **52**, 3870–80.

Chellapandian M., Krishnan M. R. V. (1998): Chitosan-poly (glycidyl methacrylate) copolymer for immobilization of urease. *Process Biochemistry*, **33**, 595-600.

Chen J. P., Chiu S. H. (1999): Preparation and characterization of urease immobilized onto porous chitosan beads for urea hydrolysis. *Bioprocess Engineering*, **21**, 323-330.

Chukwuemeka N. O., Anthonia A. B. (2010): Antifungal effects of pawpaw seed extracts and papain on post harvest *Carica papaya* L. fruit rot. *African Journal of Agricultural Research*, **5**, 1531-1535.

IUBMB homepage: <http://iubmb.org/biochemical-nomenclature/> (17.3.2016)

Jutamongkon R., Charoenrein S. (2010): Effect of Temperature on the Stability of Fruit Bromelain from Smooth Cayenne Pineapple. *Kasetsart Journal: Natural Sciences*, **44**, 943–8.

Keil B. (1971): The enzymes (Boyer, PD, ed.) vol. 3.

Kodama S., Suzuki T. (1995): Highly sensitive method for urea detection in wine. *Journal of food science*, **60**, 1097-1099.

Kodama, S. (1996): Optimal conditions for effective use of acid urease in wine. *Journal of Food Science* **61**, 548–552.

Kohei O. (2012): New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *Journal of Biochemistry*, **151**, 13–25.

Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K. (2004): Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant Journal*, **37**, 370-378.

Kostiuk P., Jirásek R. (2010): Využití systémové enzymoterapie v ordinaci praktického lékaře. *Edukofarm*, 50-51.

Krajewska B. (2004): Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and microbial technology*, **35**, 126-139.

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

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

Krajewska B., van Eldik R., Brindell M. (2012): Temperature- and pressure-dependent stopped-flow kinetic studies of jack bean urease. Implications for the catalytic mechanism. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **17**, 1123-1134.

- Kurokawa Y., Sano T., Ohta H., Nakagawa Y. (1993): Immobilization of enzyme onto cellulose–titanium oxide composite fiber. *Biotechnology and bioengineering*, **42**, 394-397.
- Laska J., Włodarczyk J., Zaborska W. (1999): Polyaniline as a support for urease immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **6**, 549-553.
- Lauwers A., Scharpe S. (1997). Pharmaceutical enzymes. *Marcel Dekker*.
- Leipner J., Saller R. (2000): Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. *Drugs*, **4**, 769-778.
- Leonard M., De Boisseson M. R., Hubert P., Dalencon F., Dellacherie E. (2004): Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. *Journal of controlled release*, **98**, 395-405.
- Lin Ch. Ch., Yang Ch. M. (2003): Urea permeation and hydrolysis through hollow fiber dialyzer immobilized with urease: storage and operation properties. *Biomaterials* **24**, 1989-1944.
- Lorkowski G. (2012): Gastrointestinal absorption and biological activities of serine and cysteine proteases of animal and plant origin: review on absorption of serine and cysteine proteases. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, **4**, 10–27.
- Marshall R. T. (1992): Standard Methods for the Examination of Dairy Products: 16th Edition, American Public Health Association. *Washington, DC, USA*.
- Marzadori C., Miletto S., Gessa C., Ciurli S. (1998): Immobilization of jack bean urease on hydroxyapatite: urease immobilization in alkaline soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**, 1485-1490.
- Matsumoto K. (1993): Removal of urea from alcoholic beverages by immobilized acid urease. *Bioprocess Technology*, **16**, 255–273.
- MEROPS homepage: <https://merops.sanger.ac.uk/> (27.2.2016)
- Mitchel R. E., Chaiken I. M., Smith E. L. (1970): The Complete Amino Acid Sequence of Papain ADDITIONS AND CORRECTIONS. *Journal of Biological Chemistry*, **245**, 3485-3492.
- Miyagawa K., Sumida M., Nakao M., Harada M., Yamamoto H., Kusumi T., Yoshizawa K., Amachi T., Nakayama T. (1999): Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*. *Journal of Biotechnology*, **68**, 227–236.
- Miyagawa K., Sumida M., Nakao M., Harada M., Yamamoto H., Kusumi T., Nakayama T. (1999): Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*. *Journal of biotechnology*, **68**, 227-236.
- Mobley H. L. T., Hausinger R., P. (1989): Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, **53**, 85–108.

- Monshipouri M., Neufeld R. J. (1992): Kinetics and activity distribution of grease coencapsulated with hemoglobin within polyamide membranes. *Applied biochemistry and biotechnology*, **32**, 111-126.
- Mulagalapalli S., Kumar S., Kalathur R. C. R., Kayastha A. M. (2007): Immobilization of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan*) on agar tablets and its application in urea assay. *Applied biochemistry and biotechnology*, **142**, 291-297.
- Nakarani M., Kayastha A. M. (2007): Kinetics and diffusion studies in urease-alginate biocatalyst beads. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, **7**, 79-84.
- Neilands J. B., Stumpf P. K. (1961): Úvod do enzymologie. Vyd. 1. Nakladatelství Československé akademie věd. 390 s.
- Nouza K., Nouza M. (2000): Zánět optimalizující a imunitu normalizující působení systémové enzymoterapie. *Solutio, Medon*, 99–117.
- Nouza K., Nouza M. (2006a): Systémová enzymoterapie – perorální podávání kombinace proteáz: farmakologie a využití v léčebné praxi. *Praktické lékařství*, 3/2006.
- Nouza K., Nouza M. (2006b): Systémová enzymoterapie v pediatrii. *Pediatric pro Praxi*, **5**, 244–246.
- Oda K. (2012): New families of karboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *Journal of Biochemistry*, **151**, 13–25.
- Otto H. H., Schirmeister T. (1997): Cysteine proteases and their inhibitors. *Chemical reviews*, **97**, 133-172.
- Ovaere P., Lippens S., Vandenabeele P., Declercq W. (2009): The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in Biochemical Science*, **34**, 453–63.
- Page M. J., Di Cera E. (2008): Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**, 1220-1236.
- Pflaum T., Hausler T., Baumung C., Ackermann S., Kuballa T., Rehm J., Lachenmeier D. W. (2016): Carcinogenic compounds in alcoholic beverages: an update. *Archives of toxicology*, **90**, 2349-2367.
- Pogorilyi R. P., Melnyk I. V., Zub Y. L., et al. (2013): Urease adsorption and activity on magnetite nanoparticles functionalized with monofunctional and bifunctional surface layers. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **68**, 447–454.
- Poźniak G., Krajewska B., Trochimczuk W. (1995): Urease immobilized on modified polysulphone membrane: Preparation and properties. *Biomaterials*, **16**, 129-134.
- Prakash O., Brushan G. (1997): Isolation, purification and partial characterisation of urease from seeds of water melon (*Citrullus vulgaris*). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **6**: 45–47.

Prakash O., Puliga S., Upadhyay L. S. B. (2007): Immobilization of watermelon (*Citrullus vulgaris*) urease in agarose gel for urea estimation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **12**, 131-135.

Prakash O., Upadhyay L. S. B. (2005): Physico-chemical characterization of watermelon urease upon immobilization in alginate beads. *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, **14**, 209-213.

Prakash O., Upadhyay L. S. B. (2006): Immobilization imparts stability to watermelon urease to work in water miscible organic media. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **11**, 140-145.

Rawlings N. D., Barrett A. J. (1993): Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, **290**, 205-218.

Rawlings N. D., Barrett A. J. (1995): Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods in enzymology*, **248**, 183-228.

Rawlings N. D., Barrett A. J., Bateman A. (2011): Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 38321–8.

Rawlings N. D., Salvesen G. (2013): Handbook of proteolytic enzymes. *Academic press*.

Rawlings N. D., Waller M., Barrett A. J., Bateman A. (2014): *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, **42**(Database issue), D503–D509.

Reddy K. R. C., Kayastha A. M. (2006): Improved stability of urease upon coupling to alkylamine and arylamine glass and its analytical use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **38**, 104-112.

Ritonja A., Rowan A. D., Buttle D. J., Rawlings N. D., Turk V., Barrett A. J. (1989): Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS letters*, **247**, 419-424.

Rodriguez J., Gupta N., Smith R. D., Pevzner P. A. (2008): "Does trypsin cut before proline?". *Journal of Proteome Research*, **7**, 300–305.

Rosenberg L., Krieger Y., Bogdanov-Berezovski A., Silberstein E., Shoham Y., Singer A. J. (2014): A novel rapid and selective enzymatic debridement agent for burn wound management: A multi-center RCT. *Burns*, **40**, 466–74.

Sahoo B., Sahu S. K., Pramanik P. (2011): A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **69**, 95-102.

Sahoo B., Sahu S. K., Pramanik P. (2011): A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **69**, 95-102.

- Shah Y., Shah D., Kothari R. M., Trivedi B. M. (1994): Behavior of polyacrylamide encapsulated urease. *Research and Industry*, **39**, 184-190.
- Sheldon R. A. (2007): Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **349**, 1289-1307.
- Schneider W., Roder A., Mollering H., Gutmann I. (1980): *U.S. Patent No. 4,188,465*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Srivastava P. K., Kayastha A. M. (2001): Characterization of gelatin-immobilized pigeonpea urease and preparation of a new urea biosensor. *Biotechnology and applied biochemistry*, **34**, 55-62.
- Steffens, M. G. K. J. (1995): Absorption of Orally Administered Enzymes.
- Stellmach B. (1988): Bestimmungs methoden Enzyme für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin. *Steinkopff Verlag*.
- Stepek G., Behnke J. M., Buttle D. J., Duce I. R. (2004): Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics?. *Trends in Parasitology*, **20**, 322-7.
- Stevens D. F., Ough C. S. (1993): Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, **44**, 309-312.
- Sukhikh G. T., Loginova N. S., Faizullin L. Z. (1997): The use of Wobenzym® to facilitate interferon synthesis in the treatment of chronic urogenital chlamydiosis. *International Journal of Immunotherapy*; XIII (3/4): 131-133.
- Sumner J. B., Hand D. B. (1928): Crystalline urease. II. *Journal of Biological Chemistry*, **76**, 149-162.
- Sundaram P. V. (1973): The kinetic properties of microencapsulated urease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, **321**, 319-328.
- Sundaram P. V., Crook E. M. (1971): Preparation and properties of solid-supported urease. *Canadian journal of biochemistry*, **49**, 1388-1394.
- Sung H. Y., Lee W. M., Chiou M. J., Chang C. T. (1989): A procedure for purifying jack bean urease for clinical use. Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, *Life sciences*, **13**, 250-257.
- Szecsí P. B. (1992): The aspartic proteases. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **52**, 5-22.
- Tang J., Wong R. N. (1987): Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *Journal of cellular biochemistry*, **33**, 53-63.
- Taylor A. J., Vadgama, P. (1992): Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of urea. *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine*, **29**, 245-264.

- Teke A. B., Baysal Ş. H. (2007): Immobilization of urease using glycidyl methacrylate grafted nylon-6-membranes. *Process biochemistry*, **42**, 439-443.
- Tekiner P., Perçin I., Ergün B., Yavuz H., Aksöz E. (2012): Purification of urease from jack bean (*Canavalia ensiformis*) with copper (II) chelated poly (hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-(l)-histidine methyl ester) cryogels. *Journal of Molecular Recognition*, **25**, 549-554.
- Unuma H., Hiroya M., Ito A. (2007): Deposition of bone-like hydroxyapatite on the surface of silk cloth with the aid of immobilized urease. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **18**, 987-990.
- van der Hoorn R. A. L. (2008): Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual review of plant biology*, **59**, 191–223.
- Walsh K. A. (1970) in: *Methods in Enzymology* (Perlmann G. E., Lorand L., eds.), p. 41. *Academic Press*, Inc.
- Weber J. V., Sharypov V. I. (2009): Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. *Environmental Chemistry Letters*, **7**, 233-247.
- White J., White D. (1997): *Source Book of Enzymes*, C.R.C. Press.
- Wilcox P.E. (1970): *Methods in Enzymology* (Perlmann G. E., Lorand L., eds.), p. 64. *Academic Press*, Inc.
- WOBENZYM homepage: <http://www.wobenzym.cz/cdweb/spc-wob.htm> (29.3.2016)
- Wraith J. E. (2005): The first 5 years of clinical experience with laronidase enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I. *Expert Opin Pharmacother*; **6**, 489–506.
- Yang M. C., Lin C. C. (2001): Urea permeation and hydrolysis through hollow fiber dialyzer immobilized with urease. *Biomaterials*, **22**, 891-896.
- Yeon K. H., Lueptow R. M. (2006): Urease immobilization on an ion-exchange textile for urea hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **81**, 940-950.
- Zimmer M. (2000): Molecular mechanics evaluation of the proposed mechanisms for the degradation of urea by urease. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamic*, **17**, 787–97.
- Zimmerli B., Schlatter J. (1991): Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutation Research*, **259**, 325–350.

7 Seznam použitých zkratek

AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzensulfonyl fluorid
BACE1	β -sekretasa 1
BACE2	β -sekretasa 2
DFP	diisopropylfosfofluorid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EPNP	1,2-epoxy-3-(<i>p</i> -nitrofenoxy)propan
FID	detekce ionizací plamenem
IAP	inhibitory apoptózy
NBPT	<i>N</i> -(<i>n</i> -butyl)triamid kyseliny thiofosforečné
NEM	<i>N</i> -ethylmaleinimid
PAN	polyakrylonitril
PCMB	<i>p</i> -chlór-merkurybenzoát
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
TLCK	tosyl-L-lysin chlormethyl keton
TPCK	tosylfenylalanylchlormethylketon