

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Imobilizace α -amylas na magnetické nosiče

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Martina Pospíšilová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí diplomové práce:	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	26. 4. 2010

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

V Olomouci dne 26. 4. 2010

.....

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. za odborné vedení a konzultace při vypracování této diplomové práce. Děkuji také Mgr. Michaela Pečové za pomoc při práci s imobilizací enzymů a prof. Mgr. Marku Šebelovi, Ph.D. za pomoc při analýze MALDI-TOF MS, dále pak celému kolektivu katedry biochemie PřF UP v Olomouci za vytvoření optimálních podmínek pro vypracování této práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Martina Pospíšilová
Název práce	Imobilizace α -amylas na magnetické nosiče
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>Teoretická část této diplomové práce se zabývá klasifikací amylolytických enzymů, obzvláště α-amylasami. Dále jsou zde popsány rozličné techniky ukotvení enzymů na pevné nosiče a vlastnosti, příprava a použití magnetických nosičů.</p> <p>Experimentální část se věnuje zejména kovalentní imobilizaci α-amylas (vepřový pankreas, <i>Bacillus subtilis</i>) na magnetické mikro- a nanočástice (Fe_3O_4 obalené chitosanem), kde magnetické nosiče byly aktivovány glutaraldehydem popř. karbodiimidem a N-hydroxysukcinimidem. U volných a imobilizovaných α-amylas byla stanovena specifická aktivita, teplotní a operační stabilita, stabilita při skladování. Dále byla u bakteriální α-amylasy provedena chemická modifikace lisylových zbytků pomocí β-cyklodextrinu. U modifikovaného enzymu byla stanovena molekulová hmotnost, specifická aktivita a teplotní stabilita.</p>
Klíčová slova	α -amylasa, magnetické částice, imobilizace enzymů, chemická modifikace
Počet stran	82
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Martina Pospíšilová
Title	Imobilization of α -amylases on magnetic carriers
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc.RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstract	<p>The theoretical part of this diploma thesis deals with classification of amyolytic enzymes, especially α-amylases. It also describes several techniques of enzyme immobilization on solid supports and properties, preparation and applications of magnetic carriers.</p> <p>The experimental part is focused mainly on covalent immobilization of α-amylases (porcine pancreas, <i>Bacillus subtilis</i>) on magnetic micro- and nanoparticles (Fe_3O_4 coated with chitosan). Magnetic carriers were activated by using glutaraldehyde or carbodiimide and N-hydroxysuccinimide. The properties (specific activity, thermostability, operational and storage stability) of immobilized enzymes were investigated and compared with those of free ones. In addition, chemical modification of lysine residues in bacterial α-amylase was carried out using β-cyclodextrine. Modified enzyme was characterized in terms of molecular mass, specific activity, and thermostability.</p>
Keywords	α -amylase, magnetic particles, enzyme imobilization, chemical modification
Number of pages	82
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE	9
2. ÚVOD	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3. 1. Klasifikace α-amylas	11
3. 1. 1. α -Amylasy	11
3. 1. 2. β -Amylasy	12
3. 1. 1. γ -Amylasy	12
3. 2. Struktura α-amylas	13
3. 3. Aktivátory a inhibitory α-amylas	14
3. 4. Stanovení aktivity α-amylas	15
3. 4. 1. Metody amyloklastické	16
3. 4. 2. Metody sacharogenní	16
3. 4. 3. Metody chromogenní	16
3. 4. 4. Metody s biosenzorem	18
3. 5. Použití α-amylas v průmyslu	18
3. 5. 1. Průmyslová výroba glukosy a fruktosy	18
3. 5. 2. Pekařský průmysl	19
3. 5. 3. Textilní a papírenský průmysl	20
3. 5. 4. Biodetergenty a prací prášky	20
3. 6. Chemická modifikace α-amylas	21
3. 7. Imobilizace enzymů	22
3. 7. 1. Techniky imobilizace enzymů	23
3. 7. 1. 1. Adsorpce na povrch nosiče	23
3. 7. 1. 2. Kovalentní imobilizace	24
3. 7. 1. 3. Zesítnění	26
3. 7. 1. 4. Zachycení do polymerní matrice	27
3. 7. 1. 5. Uzavření mezi semipermeabilní membrány	27
3. 7. 2. Imobilizace α -amylas	27
3. 8. Magnetické nosiče	31
3. 8. 1. Příprava magnetických částic	31
3. 8. 2. Povrchová modifikace magnetických částic	33
3. 8. 3. Aplikace magnetických částic	35
3. 8. 3. 1. Biotechnologické a lékařské aplikace	35
3. 8. 3. 2. Magnetické separace	37

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4. 1. Magnetické částice	38
4. 2. Chemikálie	38
4. 3. Přístroje	39
4. 4. Použité metody	40
4. 4. 1. Imobilizace α -amylas na magnetické mikro- a nanočástice	40
4. 4. 1. 1. Karbodiimidová metoda	40
4. 4. 1. 2. Glutaraldehydová metoda	40
4. 4. 2. Chemická modifikace α -amylasy	40
4. 4. 3. Stanovení aktivity volné a imobilizované α -amylasy	41
4. 4. 4. Stanovení koncentrace proteinů metodou bicinchoninovou	41
4. 4. 5. Stanovení specifické aktivity	42
4. 4. 6. Stanovení vazebné kapacity	42
4. 4. 7. Stanovení operační stability	42
4. 4. 8. Stanovení teplotní stability	43
4. 4. 9. Stanovení stability při skladování	43
4. 4. 10. Měření intaktní hmoty proteinu pomocí MALDI-TOF	43
4. 4. 11. SDS-PAGE elektroforéza	43
4. 4. 12. MALDI-TOF peptide mass fingerprinting	44
5. VÝSLEDKY	46
5. 1. Celková koncentrace proteinů	46
5. 2. Imobilizace α-amylas na magnetické mikro- a nanočástice	46
5. 2. 1. Stanovení specifické aktivity	46
5. 2. 2. Stanovení vazebné kapacity	47
5. 2. 3. Stanovení teplotní stability	47
5. 2. 4. Stanovení operační stability imobilizované α -amylasy	50
5. 2. 5. Stanovení stability při skladování	51
5. 3. Chemická modifikace α-amylas	54
5. 3. 1. Měření intaktní hmoty proteinu pomocí MALDI-TOF	54
5. 3. 2. SDS-PAGE elektroforéza	56
5. 3. 3. MALDI-TOF peptide mass fingerprinting	57
5. 3. 3. Stanovení specifické aktivity	58
5. 3. 4. Stanovení teplotní stability	58

6. DISKUSE	60
7. ZÁVĚR	65
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	66
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	82

1. CÍLE PRÁCE

Teoretická část

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

Experimentální část

- Imobilizace α -amylas (vepřový pankreas, *B. subtilis*) na magnetické mikro- a nanočástice.
- Charakterizace imobilizovaných α -amylas na magnetických mikro- a nanočásticích, srovnání s volnými α -amylasami (stanovení specifické aktivity, operační, teplotní stability a stability při skladování).
- Chemická modifikace α -amylas a jejich následná charakterizace (stanovení molekulové hmotnosti, specifické aktivity a teplotní stability).

2. ÚVOD

α -Amylasy (EC 3.2.1.1.) patří mezi hydrolytické enzymy, které katalyzují štěpení 1,4- α -D-glykosidické vazby uvnitř polysacharidového řetězce amylosy, amylopektinu i glykogenu. Uvedené glykosidasy jsou poměrně rozšířené, vyskytují se u savců (jako slinná a pankreatická α -amylasa), mikroorganismů a v semenech rostlin. α -Amylasy produkované bakteriemi či plísněmi našly své uplatnění v různých oblastech průmyslu jako např. textilním a papírenském průmyslu, v potravinářství (pekařství, výroba glukosových a fruktosových sirupů), dále jsou součástí biodetergentů a pracích prášků.

Jelikož jsou α -amylasy používány v průmyslu často vystaveny extrémním podmínkám (zvýšená teplota a tlak, vysoké nebo nízké hodnoty pH, oxidační činidla, proteasy), je výhodné tyto enzymy stabilizovat chemickou modifikací či imobilizací. Chemickou modifikaci lze provést např. s použitím sacharidů, které se váží na aminoskupiny v proteinu. Nejprve je však nutno sacharid aktivovat, a to nejčastěji metodou jodistanovou (oxidační štěpení). Takto vzniklé konjugáty často vykazují zvýšenou stabilitu vůči tepelné denaturaci. Ukotvení, neboli imobilizace, enzymů na pevné nosiče s sebou přináší řadu výhod. Nejen že se enzym stává stabilnějším vůči teplotě, pH a denaturačním činidlům, ale lze jej použít opakovaně a snadno odstranit z reakční směsi. Pokud je biokatalyzátor imobilizován na magnetické nosiče, není nutná vysokorychlostní centrifugace, neboť částice je možné separovat za použití vnějšího magnetického pole.

V porovnání s objemovými nosiči mají magnetické partikule, mikro- (1 – 100 μm) a nanočástice (0,1 – 100 nm), velký funkční povrch, na který je možné imobilizovat různé biologické molekuly. Magnetické partikule jsou obvykle připravovány synteticky, ale mohou být izolovány i z magnetotaktických bakterií. Partikule jsou tvořeny magnetickým jádrem, pro jehož přípravu se nejčastěji volí oxidy železa, a funkcionalizační skupkou. Ta magnetický materiál stabilizuje a umožňuje zavedení funkčních skupin na jeho povrch. Na vhodně upravený povrch magnetické mikro- či nanočástice lze imobilizovat cílovou molekulu. Základní požadavky, které jsou kladeny na částice používané v medicíně, jsou biokompatibilita, biodegradabilita a netoxičita. Pokud jsou nosiče určeny pro průmyslové aplikace, neměly by ohrožovat životní prostředí a jejich příprava musí být jednoduchá a levná.

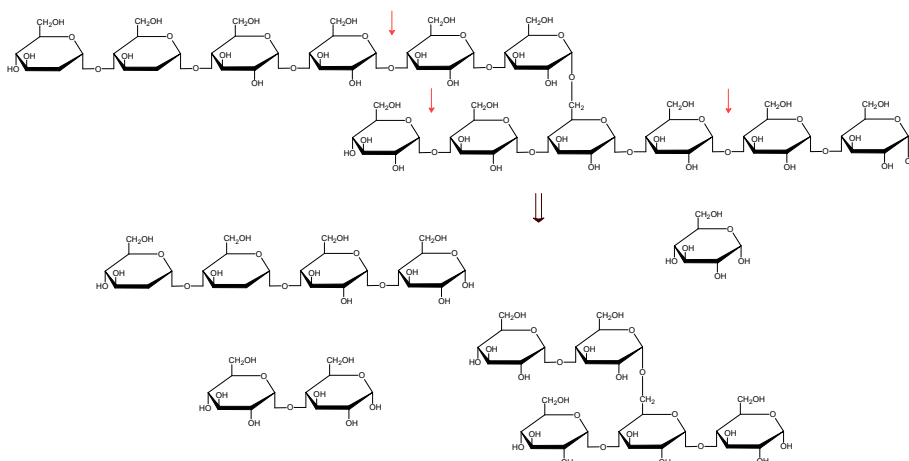
3. TEORETICKÁ ČÁST

3. 1. Klasifikace amylas

Amylasy se řadí mezi hydrolytické enzymy, jež katalyzují štěpení 1,4- α -D-glykosidických vazeb větvené (amylopektin) i nevětvené (amylosa) formy škrobu, glykogenu a jiných polysacharidů obsahujících tuto vazbu. V podstatě lze amylasy rozdělit do tří základních skupin, kde příslušné enzymy atakují glykosidické vazby na rozličných místech řetězce a tím dávají vzniku různým produktům.

3. 1. 1. α -Amylasy

α -Amylasa (1,4- α -D-glukan-glukanohydrolasa; EC 3.2.1.1.) katalyzuje štěpení 1,4- α -D-glykosidické vazby uvnitř polysacharidového řetězce, který obsahuje tři a více těchto spojení. Přestože je působení α -amylasy v rámci řetězce náhodné, některé práce navrhují určitý vzor štěpení, který se liší podle toho, z jakého zdroje α -amylasa pochází. Tato endoamylasa je schopna obejít větvení s vazbou 1,6- α . Hydrolytickým působením α -amylasy na amylosu vzniká glukosa a maltosa s hydroxylovými skupinami na C₁ uhlíku v konfiguraci α . Substrátem mohou být i větvené polysacharidy amylopektin a glykogen. I v tomto případě dochází k hydrolýze 1,4- α -D-glykosidických vazeb, zatímco vazby 1,6- α jsou zachovány. Výsledným produktem jsou větvené a nevětvené α -dextriny (Obr.1). V průmyslové hydrolýze škrobu se využívají dva druhy α -amylas. Zkapalňující α -amylasa štěpí řetězce obsahující více jak 15 glukosových jednotek, zcukrující α -amylasa hydrolyzuje tetramery glukosy.



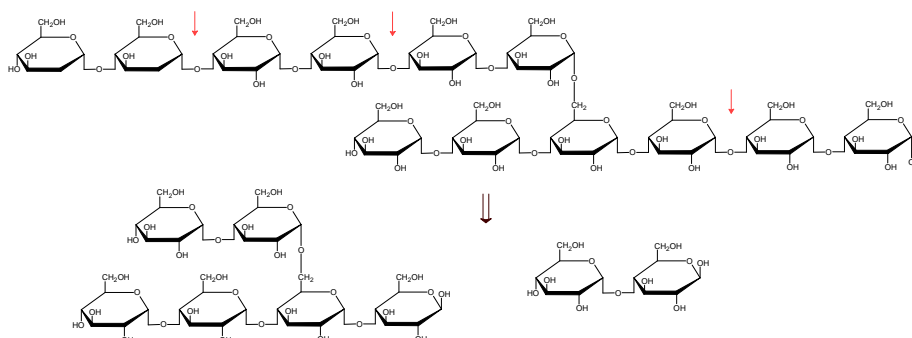
Obr.1 Štěpení škrobu α -amylasou (upraveno dle Goesaert *et al.*, 2009).

U člověka a zvířat napomáhá α -amylasa trávení potravy obsahující škrob. Vyskytuje se především ve slinách a slinivce břišní. Rostlinná α -amylasa má důležitou funkci při klíčení semen. α -Amylasy produkované bakteriemi (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*) či plísněmi (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*) našly své uplatnění v biotechnologii (Wong, 1995; James & Lee, 1997).

3. 1. 2. β -Amylasy

β -Amylasa (1,4- α -D-glukan-maltohydrolasa; EC 3.2.1.2.) je exoglukosidasa, která postupně odštěpuje maltosové jednotky z neredukujícího konce polymerního řetězce. Produktem štěpení amylosy je maltosa s hemiacetalovými hydroxyly v konformaci β . Na rozdíl od α -amylasy, β -amylasa není schopna obejít větvení 1,6- α , a proto se v těchto místech degradace polymeru zastaví. Hydrolyzou amylopektinu a glykogenu vznikají tzv. limitní dextriny, které jsou opět β -anomery (Obr.2).

Rostlinná β -amylasa je syntetizována při klíčení semen a také během zrání ovoce. Uvedená exoamylasa je produkována některými mikroorganismy, u nichž zajišťuje degradaci extracelulárních škrobů (Wong, 1995; James & Lee, 1997).

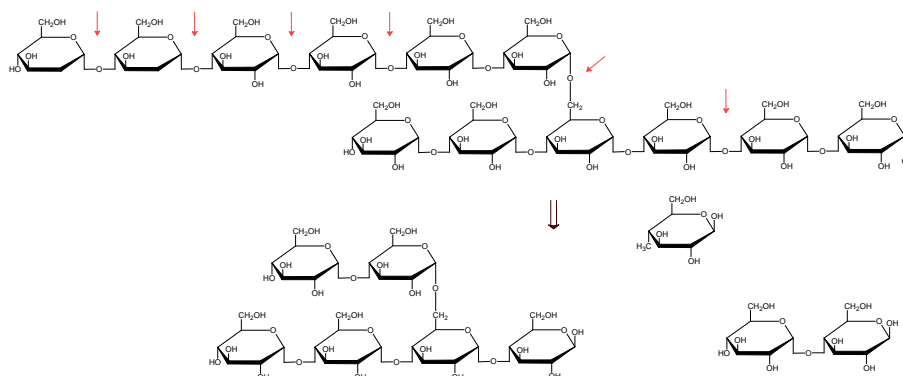


Obr.2 Štěpení škrobu β -amylasou (upraveno dle Goesaert *et al.*, 2009).

3. 1. 3. γ -Amylasy

γ -Amylasa (1,4- α -D-glukan-glukohydrolasa; EC 3.2.1.3.), též nazývaná glukoamylasa, štěpí nejen glykosidické vazby 1,4- α , ale s menší rychlostí i vazby 1,6- α . Jedná se o exoamylasu, která odštěpuje glukosové jednotky z neredukujícího konce oligosacharidů. Vzniká tak glukosa s konformací β , maltosa a limitní dextriny (Obr.3).

U člověka se glukoamylasa vyskytuje v játrech a hraje důležitou roli v metabolismu glykogenu. U rostlin se nachází glukoamylasa pouze v semenech (Wong, 1995; James & Lee, 1997).



Obr.3 Štěpení škrobu glukoamylasou (upraveno dle Goesaert *et al.*, 2009).

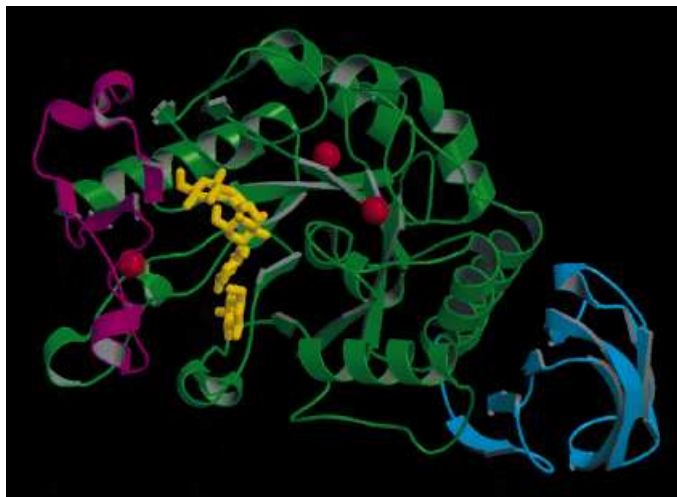
3. 2. Struktura a vlastnosti α -amylas

α -Amylasy pocházející z různých zdrojů (mikroorganismy, rostliny a živočichové) jsou vysoce odlišné v jejich primární sekvenci aminokyselin, s homologií pouze 10% (Brayer *et al.*, 1995). Molekulová hmotnost α -amylas se pohybuje od 10 kDa (Grootegoed *et al.*, 1973) do 210 kDa (Ratanakhanokchai *et al.*, 1992), ale může být navýšena různým obsahem sacharidů. Mikrobiální enzymy jsou však glykosylovány jen zřídka, výjimku tvoří např. amylasa z *Bacillus subtilis* (Matsuzaki *et al.*, 1974) *Aspergillus oryzae* (Eriksen *et al.*, 1998), *Bacillus stearothermophilus* (Srivastava, 1984). U savců obsahuje polypeptidový řetězec několik disulfidových můstků, jež u bakterií nebyly prokázány.

Přestože jsou bakteriální α -amylasy evolučně vzdálené od eukaryotních, rentgenostrukturní analýza prokázala, že se všechny tyto amylolytické enzymy skládají ze tří strukturálních domén A, B a C (Obr.4). Doména A je tvořena osmivláknovým β -barelem a obsahuje tři důležité aminokyseliny Asp176, Glu208 a Asp269 (číslování dle *B. subtilis*), jež se účastní vlastní katalytické reakce. Doména B, vystupující z domény A, se skládá převážně z β -struktur a několika málo helixů. Doména C se skládá z antiparalelních β -vláken a vytváří motiv řeckého klíče. Přesná funkce domény C je prozatím neznámá, avšak předpokládá se, že hraje určitou roli ve stabilizaci domény A (Fujimoto *et al.*, 1998).

Veškeré známé α -amylasy jsou metaloenzymy obsahující nejméně jeden pevně vázaný vápenatý ion. Vazebné místo se nachází v doméně B a je tvořeno aminokyselinovými zbytky Asn101, Thr137, Asp146 a His180 (*B. subtilis*). Vápenaté ionty nehrají přímou roli v katalýze, ale jsou důležité při utváření správné konformace aktivního místa enzymu, neboť Asn101

interaguje s katalytickým Asp176 (Fujimoto *et al.*, 1998). Několik málo α -amylas také obsahuje ve své struktuře ion chloridový, jenž je nezbytný pro jejich funkci. Aktivace chloridovými ionty je typická pro živočišnou slinnou a pankreatickou α -amylasu (Brayer *et al.*, 1995; Ramasubbu *et al.*, 1996) a amylasu z *Bacillus licheniformis* (Machius *et al.*, 1995), zatímco ostatní jsou na těchto aniontech nezávislé.



Obr.4 Struktura α -amylasy izolované z *B. subtilis*, kde doména A je zobrazena zeleně, doména B fialově a doména C modře, vápenaté ionty jsou zobrazeny červeně a maltopentaosa žlutě. (Nielsen & Borchert, 2000).

α -Amylasy jsou aktivní v širokém rozmezí teplot, jejich teplotní optimum je závislé na tom, ze kterého zdroje pochází. Nejnižší teplotní optimum bylo popsáno u brouka *Zabrotes subfasciatus* a to 20 °C (Pelegriani *et al.*, 2006), nejvyšší u bakterie *Pyrococcus furiosus* a to 100 °C (Laderman *et al.*, 1993). Co se týče teplotní stability, rostlinné a živočišné amylasy vykazují nižší termostabilitu než-li extracelulární enzymy mikroorganismů. Existuje řada faktorů, které termostabilitu ovlivňují. Jednak to je samotná struktura amylas, dále pak přítomnost vápenatých iontů, substrátu a jiných stabilizátorů. Pro většinu α -amylas se pH optimum nachází mezi 6 a 8, avšak jsou známy i α -amylasy, které jsou více aktivní ve velmi kyselých - pH 3 (Schwermann *et al.*, 1994) nebo alkalických - pH 11-12 (Kim *et al.*, 1995) oblastí.

3. 3. Aktivátory a inhibitory α -amylas

Aktivita α -amylas je ovlivňována nepřeberným množstvím látek, ať už původu anorganického či organického. Jako aktivátory jsou označovány látky, které zvyšují rychlost katalyzované reakce. Naopak inhibitory jsou látky, jež aktivitu enzymu snižují.

Mezi aktivátory α -amylas patří především ionty vápníku. Ze struktury enzymu je lze odstranit dialýzou proti EDTA a elektrodialýzou, dochází však ke ztrátě aktivity. Amylasy postrádající vápenatý ion mohou být částečně reaktivovány přidávkem iontů ze skupiny kovů alkalických zemin jako např. Sr^{2+} , Mg^{2+} a Ba^{2+} (Oikawa, 1959). Pro živočišné amylasy je významný ion chloridový, jež alosterickým efektem zvyšuje jejich aktivitu (Levitzki & Steer, 1974).

V negativním smyslu ovlivňují aktivitu α -amylas anorganické ionty, hlavně ionty těžkých kovů, nízkomolekulární (mono- a oligosacharidy) a vysokomolekulární (peptidy a proteiny) organické látky. Inhibiční vlastnosti nízkomolekulárních sloučenin (akarbosa, isoakarbosa, kys. ibišková a její methylester derivát) je dána jejich cyklickou strukturou, jež je obdobná jako u přirozených substrátů α -amylas. Uvedené oligosacharidové inhibitory se tedy mohou relativně pevně vázat do aktivního místa enzymu (Kim *et al.*, 1999; Hansawasdi *et al.*, 2000).

Proteinové inhibitory α -amylas byly nalezeny u rostlin a některých mikroorganismů. U rostlin jsou proteinové inhibitory přítomny v luštěninách – fazole (Marshall & Lauda, 1975; Ho & Whitaker, 1993), vigna (Melo *et al.*, 1999) ale také v obilovinách – pšenice (Franco *et al.*, 2000), ječmen (Weselake *et al.*, 1983; Abe *et al.*, 1993), žito (Iulek *et al.*, 2000), rýže (Yamagata *et al.*, 1998). Enzymové inhibitory jsou obvykle neúčinné vůči endogenním α - a β -amylasám, zato různě silně inhibují α -amylasy savců, hmyzu a bakterií. Proto se předpokládá, že se v rostlinách tyto proteiny vyvinuly jako určitý způsob obrany proti působení hmyzu a dalších škůdců (Schüler *et al.*, 1998). Inhibitory bílkovinného charakteru jsou vhodnými kandidáty pro transgenozu rostlin, které by následně vykazovaly vyšší rezistenci vůči herbivornímu hmyzu (Jouanin *et al.*, 1998; Morton *et al.*, 2000). Nedávno se do povědomí dostaly amylasové inhibitory jako tzv. blokátory škrobu, jež jsou součástí doplňků určených ke snižování nadváhy. Proteinový extrakt z fazolí (Phaseolamin ®, CarbPhase ®) omezuje anebo zpomaluje enzymové štěpení škrobů v tenkém střevě člověka, snižuje se tedy biologická dostupnost glukosy a dochází k redukci postprandiální hyperglykemie. Škrobové blokátory mohou mít významnou úlohu při diagnostice a léčbě onemocnění *diabetes mellitus* typu 2 a obezity (Lankisch *et al.*, 1998; Yoshikawa *et al.*, 1999).

3. 4. Stanovení aktivity α -amylas

Doposud bylo v literatuře popsáno velké množství metod, jež slouží ke stanovení aktivity α -amylas. Jako substrát je obvykle používán rozpustný či modifikovaný škrob, popř. umělé substráty. Metody bývají založeny na sledování úbytku substrátu (metody

amyloklastické), stanovení množství vznikajících redukujících sacharidů (metody sacharogenní) či degradaci substrátů značených chromogenem (metody chromogenní).

3. 4. 1. Metody amyloklastické

Amyloklastické metody jsou založeny na sledování úbytku substrátu v reakční směsi v důsledku jeho enzymového štěpení.

Pokles koncentrace substrátu lze monitorovat měřením viskozity, turbidimetricky či nefelometricky, avšak nejvíce používanými jsou metody jodometrické. Zředěný roztok jodu tvoří se škrobovými molekulami tmavě modrý komplex. V důsledku hydrolyzy škrobového substrátu dochází ke snížené tvorbě tohoto komplexu a barevná změna určuje míru jeho rozštěpení. Modré zbarvení značí přítomnost řetězců s více jak 30 glukosovými jednotkami, řetězce 8 - 12 glukosových jednotek dávají červené zbarvení a řetězce 4 - 6 glukosových jednotek neposkytují žádné zbarvení (Swanson, 1948). Pracovní roztoky jodu mohou mít koncentrace různé, v rozsahu od $3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Thomas *et al.*, 1980) do $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ (González *et al.*, 2002). Obdobně i vlnová délka, při které se proměňuje zbarvení jod-škrobového roztoku, není vždy stejná a obvykle se pohybuje v rozmezí od 550 nm (González *et al.*, 2002) do 700 nm (Fuwa, 1954).

3. 4. 2. Metody sacharogenní

Sacharogenní metody měří koncentraci redukujících sacharidů (glukosy a maltosy), které vznikají při hydrolyze škrobu v přítomnosti amylasy.

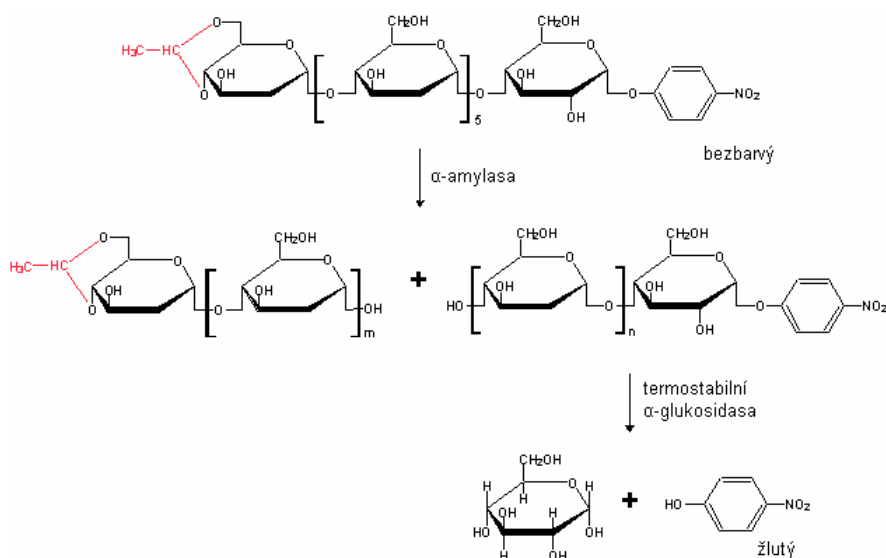
Redukující sacharidy reagují s alkalickými roztoky různých činidel – ferrikyanidem (Fingerhut *et al.*, 1965; Bender & Sukatsch, 1984), pikrátem (Meyers *et al.*, 1933), měďnatými ionty (Somogyi, 1938; Nelson, 1944), 3,5-dinitrosalicylovou kyselinou (Bernfeld, 1955) – za vzniku barevného produktu, jenž je následně proměřen spektrofotometricky. Při použití kys. 3,5-dinitrosalicylové (DNSA) dochází k její redukci na 3-amino-5-salicylovou, která absorbuje při 540 nm. Aldehydová skupina sacharidu je naopak oxidována na skupinu karboxylovou. Hlavním nedostatkem je částečné rozložení glukosy složkami DNSA reagentu a postupná ztráta červenohnědého zbarvení. Tyto nedostatky byly odstraněny modifikací metody (Miller, 1959) a v této podobě se užívá dodnes.

3. 4. 3. Metody chromogenní

Metody chromogenní využívají rozličných substrátů, které jsou značeny chromogenem. Při štěpení takového substrátu vzniká barevný produkt, jehož koncentrace je úměrná amylásové aktivitě.

Mezi chromogenní substráty lze zahrnout amylopektin či amylosu obsahující ve své molekule kovalentně vázaná modrá barviva – Remazol Brilliant Blue R (Ceska *et. al.*, 1969), Cibacron Blue F3 G-A (Dhawale *et. al.*, 1982) . Při použití těchto barvených škrobů je nutná centrifugace či filtrace za účelem odstranění zbytkového substrátu (Rinderknecht *et al.*, 1967).

V současné době se nejvíce používají deriváty oligosacharidů, kde na jednom konci řetězce je vázaný 4-nitrofenol a neredukující konec může být volný či blokován určitou skupinou (4,6-ethyliden, 3-ketobutyliden, silyl, benzyliden). Navázané blokuující skupiny zabraňují degradaci substrátu α -glukosidasou, jež slouží jako pomocný enzym při stanovení aktivity. Jedná se o syntetické substráty odvozené od maltosy - nejčastěji maltotetraosid, maltopentaosid, maltohexaosid, maltoheptaosid. Hydrolytickým působením α -amylasy na chromogenní substrát, 4,6-ethyliden-*p*-nitrofenyl-D-maltoheptaosid (EPS), vznikají kratší oligosacharidy s vázaným *p*-nitrofenolem. Následně jsou tyto oligosacharidy štěpeny α -glukosidasou. Reakcí vznikají volné oligosacharidy, glukosa a 4-nitrofenol absorbující při 405 nm (Obr.5); (Dupuy *et al.*, 1987; Lorentz, 2000).



Obr.5 Štěpení umělého substrátu EPS α -amylasou.

Chromofor může být uvolňován přímo α -amylasou, kdy není zapotřebí žádných pomocných enzymů. Štěpením 2-chloro-*p*-nitrofenyl-maltotriosidu vzniká 2-chloro-*p*-nitrofenyl- α -D-maltosid, maltotriosa, glukosa a volný 2-chloro-*p*-nitrofenol, jehož absorbance se měří při 405 nm (Gella *et al.*, 1997; Lorentz, 1999). Metody založené na syntetickém substrátu jsou velmi jednoduché, přesné a spolehlivé, ale také poměrně drahé.

3. 4. 4. Metody s biosenzorem

Metody využívající ke stanovení aktivity α -amylasy biosenzor velmi často vychází z metod sacharogenních. Hydrolytickým působením amylasy na škrob vzniká maltosa, která je následně stanovena pomocí biosenzoru. K tomuto účelu byl zkonstruován biosenzor založený na Clarkově kyslíkové elektrodě, která byla pokryta membránou s α -glukosidasou a glukosaoxidase (Filipiak *et al.*, 1996). V lidském séru byla aktivita α -amylasy stanovena pomocí oligosachariddehydrogenasové grafitové elektrody, jež obsahuje benzochinon (Kinoshita *et al.*, 1992). Kontinuální stanovení aktivity slinné α -amylasy umožňuje průtokový biosenzor s předkolonou, kde je imobilizovaná α -glukosidasa, a peroxidovou elektrodou s glukosaoxidase (Yamaguchi *et al.*, 2003). Dále byl připraven mikroanalytický senzor obsahující předkolonu s maltosafosforylasou, membrána pracovní elektrody byla pokryta glukosaoxidase a peroxidase (Yamaguchi *et al.*, 2005). Společně s α -glukosidasou a glukosaoxidase byla na enzymovou membránu imobilizována i mutarotasa, což umožnilo zkrácení reakčního času (Zajoncová *et al.*, 2004). Pomocí grafitové elektrody modifikované ferocenem, který slouží jako mediátor přenosu elektronů, lze poměrně rychle a citlivě stanovit aktivitu slinné α -amylasy (Zou *et al.*, 2008).

3. 5. Použití α -amylasy v průmyslu

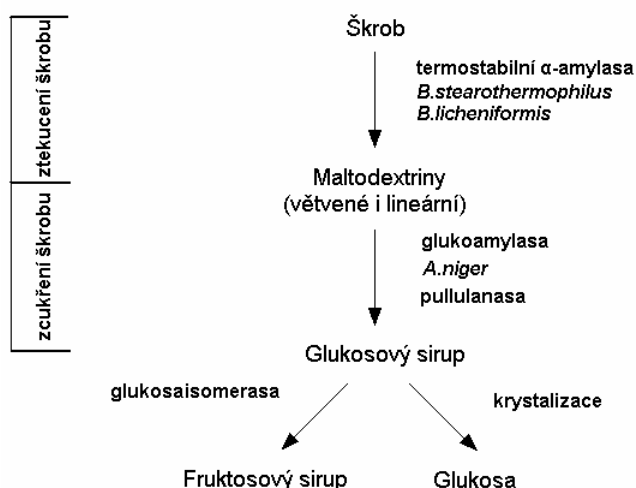
Před více než sto lety připravil Dr. J. Takamine první enzym pro komerční účely. Tímto enzymem byla α -amylasa produkovaná *A. oryzae* a na trhu se objevila pod názvem Taka-Diastasa. Enzymový koncentrát byl určen k léčbě zažívacích potíží spojených s neschopností štěpit škrob (Bennet, 2001). α -Amylasy jsou i dnes hojně používány v řadě průmyslových odvětví jako např. v potravinářství, textilním a papírenském průmyslu, k hydrolyze škrobu či výrobě detergentů. Je důležité podotknout, že lidé pracující s α -amylasami jsou do značné míry ohroženi rizikem vzniku astmatu v důsledku neustálého vdechování tohoto alergenu. Nejvíce případů profesního astmatu bylo zaznamenáno mezi pekaři (Mapp, 2001; Blanco Carmona *et al.*, 1991).

3. 5. 1. Průmyslová výroba glukosy a fruktosy

Průmyslová produkce glukosových sirupů a vysoce jakostních sirupů z fruktosy (high fructose syrup = HFS) je založena na hydrolyze kukuřičného, pšeničného nebo bramborového škrobu. Sladidla na bázi škrobu lze nalézt v mnoha potravinách, zejména pak v těch, jež jsou vyráběny v USA. Sirup s vysokým obsahem fruktózy je hlavní složkou kolových nápojů (Ramachandran *et al.*, 2004). Zpočátku byl škrob štěpen působením vhodné kyseliny na vodnou suspenzi za zvýšené teploty. Nevýhodou této metody je však energetická náročnost a vznik celé

řady vedlejších produktů, které musí být odstraněny. Kyselá hydrolyza však byla postupně nahrazena metodou enzymovou, kde nevzniká tak velké množství vedlejších produktů a může probíhat za mírnějších podmínek (Aiyer, 2005).

Enzymová konverze škrobu zahrnuje dva hlavní kroky, a to ztekucení (likvefakce) a zcukření (sacharifikace); (Obr.6). V prvním kroku, tedy při zkapalňování škrobu, vznikají rozpustnější větvené i nevětvené maltodextriny. Jelikož jsou teploty, kdy dochází k částečné hydrolyze škrobu poměrně vysoké, je nutné k tomuto účelu použít termostabilní α -amylasy (*Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*). V procesu sacharifikace se působením glukoamylasy (*Aspergillus.niger*) štěpí α -dextriny vzniklé v předešlém kroku. Kromě dané exoamylasy, jež hydrolyzuje glykosidické vazby 1,4- α a pomalu vazby 1,6- α , se uplatňuje i pullulanasa štěpící větvení 1,6- α . Produktem je glukosový sirup s obsahem glukosy vyšším než 95%. Posledním krokem při zpracování škrobu je isomerace vysokoobsahového glukosového sirupu na sladší sirup fruktosový. V kontinuálním procesu se ke konverzi glukosy používá imobilizovaná glukosaisomerasa (Crabb & Mitchinson, 1997; Crabb & Shetty, 1999).



Obr.6 Rozličné enzymy využívané při průmyslovém zpracování škrobu (upraveno dle van der Maarel *et al.*, 2002).

3. 5. 2. Pekařský průmysl

α -Amylasy se přirozeně vyskytují v pšeničné mouce, avšak jejich aktivita není příliš vysoká. Proto se do mouky běžně přidávají mikrobiální α -amylasy, které zaručují dostatečné množství dextrinů. Ty jsou následně fermentovány kvasinkami na alkohol a oxid uhličitý, dochází ke kynutí kvásku. Přídavkem exogenní α -amylasy lze tedy docílit rychlejšího a kvalitnějšího kynutí. Díky vznikajícím sacharidům získává chléb i lepší chuť a barvu kůrky (Goesaert *et al.*, 2005; Goesaert *et al.*, 2009). Amylasy užívané v pekařství mají původ mikrobiální (plísně, bakterie), popř. mohou pocházet z ječmene (Cauvain & Young, 2007).

Jak již bylo zmíněno, α -amylasy byly původně přidávány k mouce z důvodu zvýšení rozkladu škrobu na zkvasitelné sacharidy. V literatuře byla dále popsána schopnost amylas prodlužovat čerstvost pečiva a oddalovat okorávání kůrky (Lagrain *et al.*, 2008). Nicméně i nepatrný nadbytek enzymu může způsobit lepkavost těsta (vznik nadměrného množství dextrinů). Tento nedostatek může vyřešit termostabilní (intermediate temperature stable, ITS) α -amylasa, jež je aktivní po gelovatění škrobu a inaktivuje se před dokončením pečení (Hebeda *et al.*, 1991).

3. 5. 3. Textilní a papírenský průmysl

Při výrobě textilií jsou přírodní vlákna do značné míry mechanicky namáhána, a proto jsou pokrývána škrobovou vrstvou (šlichta). Ta materiál zpevňuje a chrání před poškozením. Po dokončení tkaní je nutné šlichtu odstranit, neboť by nedocházelo ke správnému barvení nebo bělení hotového produktu. Následná eliminace škrobu (odšlichtování) může být provedena pomocí horké páry v přítomnosti NaOH, popř. oxidanty. Jelikož chemikálie mohou textilií poškodit, upřednostňuje se použití amylas, jež jsou vůči vláknům šetrnější. α -Amylasy selektivně štěpí škrob na dextriny, které jsou rozpustné ve vodě a mohou být vymyty (Hendriksen *et al.*, 1999).

V papírenském průmyslu se amylasy užívají k úpravě škrobového pojiva. Papír je obdobně jako textilie pokrýván ochranou vrstvou, která zlepšuje řadu jeho fyzikálních vlastností – pevnost, tuhost, gumovatelnost. Viskozita přírodního škrobu je ale příliš vysoká a musí být často regulována právě pomocí α -amylas (Bruinenberg *et al.*, 1996; Arora *et al.*, 2004).

3. 5. 4. Biodetergenty a prací prášky

Nedílnou součástí moderních pracích prášků a detergentů jsou enzymy - proteasy, amylasy a lipasy. α -Amylasy jsou přidávány do pracích prášků již od roku 1975 a v dnešní době je obsažena v téměř 90 % všech tekutých detergentů (Kottwitz *et al.*, 1994).

V detergentech se nacházejí i velmi agresivní bělicí prostředky, které mají oxidativní účinky na většinu aminokyselin enzymů. Stabilitu amylas lze dosáhnout záměnou aminokyselin citlivých vůči oxidaci za jiné – u α -amylasy z *Bacillus licheniformis* byl nahrazen Met197 za Leu. Mutantní α -amylasa je stabilnější jednak během skladování čistícího prostředku, ale také při vlastním mytí (Bisgaard-Frantzen *et al.*, 1995).

Fosfáty, citrát či zeolity slouží jako změkčovadla vody, komplexují dvojmocné kovy Mg^{2+} a Ca^{2+} . V prostředí s nízkou koncentrací Ca^{2+} iontů dochází k destabilizaci α -amylasy a tím ke snížení aktivity. Uvedený problém by mohlo vyřešit nalezení amylas, jež by byly na Ca^{2+} iontech nezávislé (Nonaka *et al.*, 2003).

3. 6. Chemická modifikace α -amylas

α -Amylasy používané v průmyslu jsou často vystaveny extrémním podmínkám jako jsou např. zvýšená teplota a tlak, vysoké či naopak nízké hodnoty pH, oxidační činidla, detergenty a proteasy (Nielsen & Borchert, 2000). V praxi se využívají tři hlavní techniky vedoucí ke stabilizaci α -amylas. Cílená mutagenese umožňuje produkovat proteiny s pozměněnou sekvencí aminokyselin, které mohou vykazovat vyšší stabilitu vůči teplotě (Matthews *et al.*, 1987; Igarashi *et al.*, 1998) nebo pH (Fang & Ford, 1998; Shaw *et al.*, 1999). Na proteinové úrovni lze docílit lepších vlastností enzymu pomocí chemické modifikace a imobilizace (viz. dále, kapitola 3. 7.).

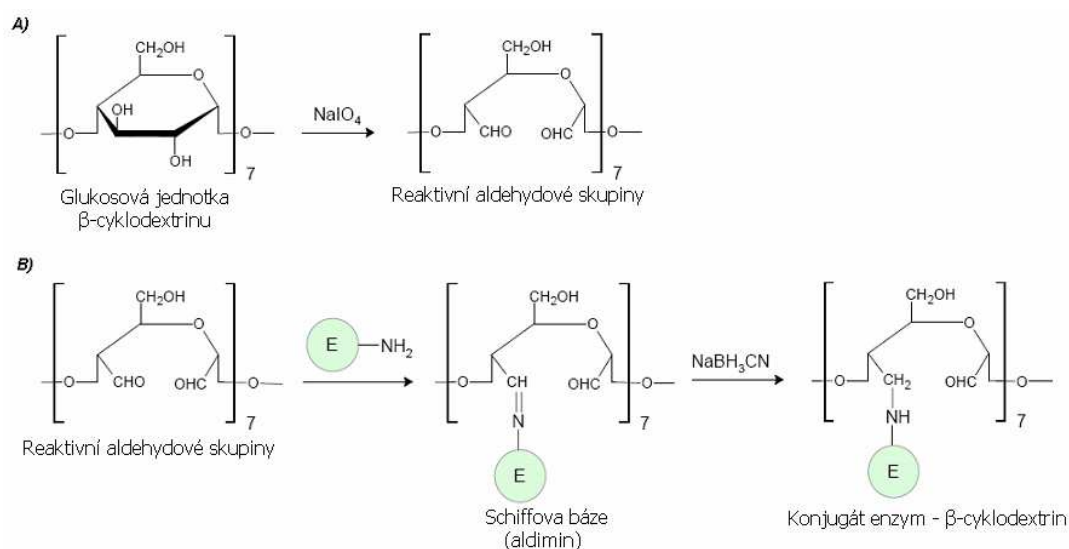
Sloučeniny na bázi sacharidů jsou často používanými modifikačními činidly biokatalyzátorů. Vychází se z předpokladu, že cukerné zbytky přirozeně se vyskytujících glykoproteinů mají vliv na jejich zvýšenou stabilitu vůči proteolýze, teplotě a chemickým denaturačním činidlům (Schmid, 1979). Vnesením sacharidu do molekuly enzymu je umožněna tvorba nových inter- a intramolekulárních vazeb (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995). Při derivatizaci α -amylasy karboxymethylcelulosou přispívají ke stabilizaci také elektrostatické a vodíkové interakce, jež existují mezi polysacharidem a enzymem (Villalonga *et al.*, 1999). Sacharidové řetízky navíc zvyšují rozpustnost daného glykoproteinu ve vodě. Obdobně jako u imobilizovaných enzymů dochází modifikací ke změně kinetických parametrů, v některých případech i ke snížení katalytické aktivity (Srivastava, 1991).

Modifikace reaktivních skupin proteinu může být prováděna nízkomolekulárními monosacharidy (ribosa, glukosa, fruktosa, manosa), dále pak redukujícími disacharidy (maltosa, laktosa), ale i polysacharidy (celulosa, škrob, dextran, dextriny a jejich deriváty). Obecně lze říci, že právě polysacharidy jsou účinnějšími stabilizátory než-li mono- nebo disacharidy. Polyhydroxyly obsažené v jejich struktuře umožňují multikovalentní připojení k proteinové molekule, čímž se zvyšuje rigidita a hydratace enzymu (Venkatesh & Sundaram, 1998).

V prvním kroku modifikace α -amylasy polysacharidem β -cyklodextrinem musí být daná cukerná složka aktivována, nejčastěji pomocí jodistanu sodného, který slouží jako oxidační činidlo. Dochází tak k rozštěpení vazeb mezi uhlíky C2 a C3 a vzniku aldehydových skupin namísto 2-3 diolového uskupení (Obr.7a). Vzniklý polyaldehyd je navázán na N-koncovou aminoskupinu a ϵ -aminoskupinou lysinu, kdy vznikají nestabilní Schiffovy báze. Redukcí Schiffovy báze pomocí kyanoborohydridu sodného lze docílit stabilizace konjugátu enzym – polysacharid (Obr.7b). Reduktivní alkylací α -amylasy (*Bacillus licheniformis*) se snížil počet volných aminoskupin z 8 na 3,5 /mol enzymu, aktivita činila 75% vzhledem k nativnímu enzymu a poločas života se zvýšil z 4.7 minut na 7.0 minut při teplotě 80 °C (Morand & Biellmann, 1991).

Kromě modifikačních činidel na bázi sacharidů byly dále použity *p*-nitrofenylacetát (Urabe *et al.*, 1973), estery odvozené od N-hydroxysukcinimidu a l-hydroxybenzotriazolu

(Hora, 1973), D-glukono- δ -lakton (Janeček *et al.*, 1992), anhydrid kys. citrkonové (Khajeh *et al.*, 2001), dimethylsuberimidát, dimethylpimelimidát, ester N-hydroxysukcinimidu a ethylenglykolu, ester N-hydroxysukcinimidu a kys. suberové (Habibi *et al.*, 2006).



Obr.7 Modifikace α -amylasy β -cyklodextrinem. **a)** Oxidační štěpení β -cyklodextrinu na příslušný polyaldehyd, **b)** Vlastní modifikace enzymu aktivovaným β -cyklodextrinem

3. 7. Imobilizace enzymů

Aplikace imobilizovaných enzymů v potravinářském, farmaceutickém a chemickém průmyslu v posledních letech výrazně vzrostla. Termín imobilizované enzymy byl definován na první Konferenci enzymového inženýrství v roce 1971. Slouží k označení enzymů fyzikálně omezených nebo lokalizovaných v určité definované oblasti s retencí jejich katalytických aktivit, a které mohou být použity opakovaně a kontinuálně (Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000).

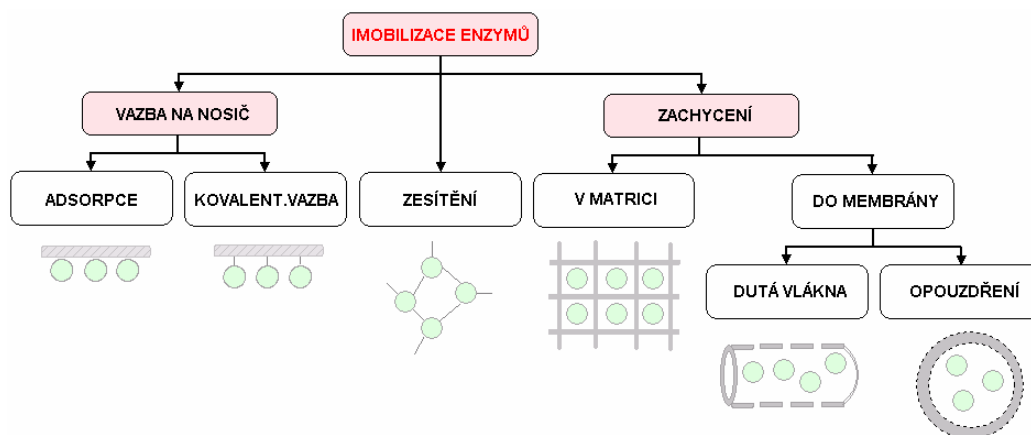
V porovnání s nativními analogy poskytují ukotvené enzymy určité výhody. Celkové finanční náklady procesu jsou nižší, neboť imobilizovaný biokatalyzátor může být použit opakovaně a procesy lze provádět kontinuálně (Liu *et al.*, 2005). Nelze opomenout ani snadnou izolaci a purifikaci produktu, kdy konečný produkt není znečištěn enzymem. Ve většině případů jsou imobilizací příznivě ovlivněny vlastnosti enzymu jako je termostabilita, stabilita v širším spektru hodnot pH a stabilita při skladování (Hong *et al.*, 2007).

Přestože s sebou imobilizace přináší spoustu výhod, je nutné zvážit i některá negativa, jenž jsou s těmito technikami spojena. Při imobilizaci obvykle dochází k částečné ztrátě katalytické aktivity (Bryjak, 2003) a snížení afinity enzymu k substrátu (hodnota K_m je vyšší);

(Lei *et al.*, 2007). V určitých případech mohou být náklady na přípravu ukotveného enzymu dosti vysoké a tudíž samotná imobilizace ztrácí na efektivitě.

3. 7. 1. Techniky imobilizace enzymů

V literatuře byla popsána řada metod, jež jsou hojně využívány k imobilizaci enzymů. Navázání enzymů na nerozpustné nosiče se velmi často provádí přímou adsorpcí či kovalentní vazbou. Při použití bifunkčních, popř. vícefunkčních činidel dochází k zesíťení jednotlivých molekul enzymu. K dalším používaným technikám patří zabudování enzymu do struktury vhodné polymerní matrice nebo jeho uzavření do semipermeabilní polymerní membrány (Obr.8).



Obr.8 Přehled technik používaných k imobilizaci enzymů

(upraveno dle http://loschmidt.chemi.muni.cz/peg/lecture/biocat_lecture10.pdf).

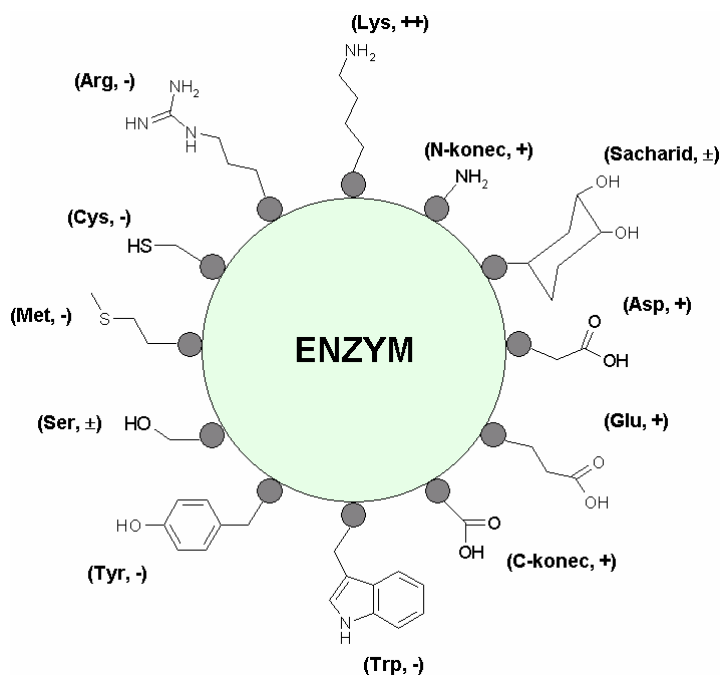
3. 7. 1. 1. Adsorpce na povrch nosiče

Jednu z nejjednodušších a ekonomicky nejvýhodnějších metod představuje přímá sorpce enzymu na povrch nerozpustného nosiče. Molekuly proteinu mohou s nosičem interagovat pomocí iontových, hydrofobních, vodíkových či van der Waalsových interakcí, ale pouze první dvě zmiňované přispívají k silnější vazbě enzym – nosič. Vzhledem k povaze interakcí často dochází k nežádoucímu uvolňování (desorpci) enzymu z nosiče (Akgöl *et al.*, 2001; de Oliveira *et al.*, 2000).

Oproti tomu si však adsorbovaný biokatalyzátor zachovává poměrně vysokou aktivitu, protože nedochází k chemické modifikaci jako u kovalentní imobilizace. K dalším výhodám patří reversibilita, díky níž je umožněna nejen purifikaci proteinů, ale i znovupoužití nosičů (Mateo *et al.*, 2000). V praxi se obvykle postupuje tak, že se enzym přidá k nosiči a po určité době míchání, popř. třepání se nadbytek roztoku obsahující enzym odstraní. Po dobu imobilizace je důležité zachovat určitou hodnotu pH a iontové síly. I nepatrné změny mohou způsobit změnu náboje biomolekuly i nosiče a tím ovlivnit stupeň adsorpce (Kennedy, 1995).

3. 7. 1. 2. Kovalentní imobilizace

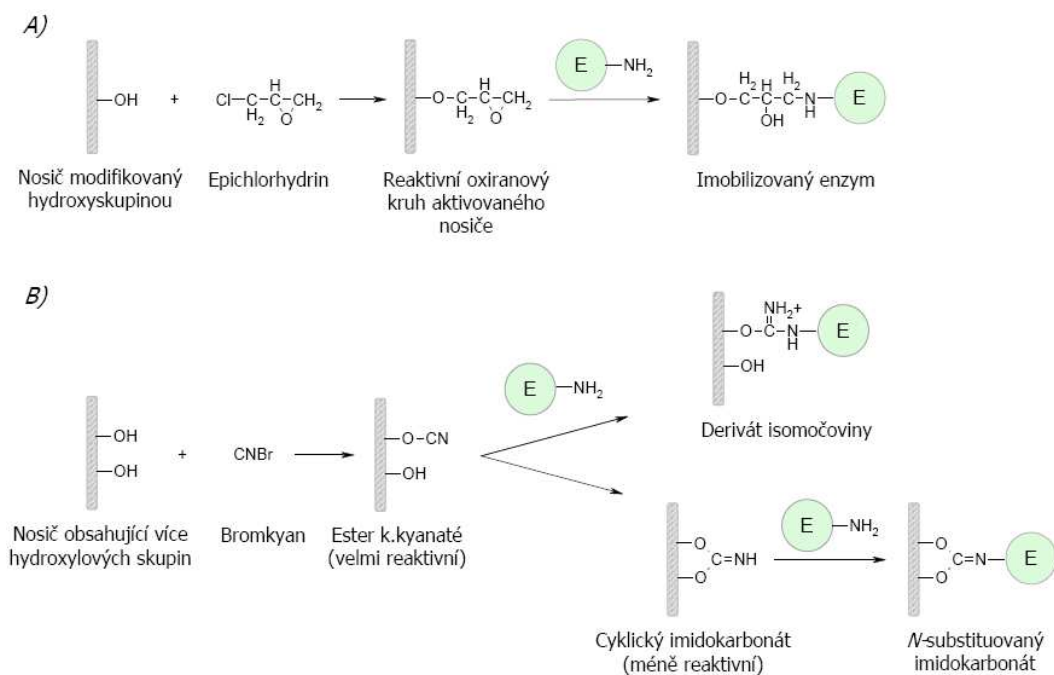
V porovnání s ostatními typy imobilizace poskytuje uvedená metoda nejsilnější vazbu mezi enzymem a nosičem, čímž se snižuje riziko jeho uvolňování. Kovalentní imobilizace je založena na chemické reakci funkčních skupin příslušného nosiče a proteinu. K ukotvení mohou být dále využity sacharidové řetězky některých glykoproteinů (Obr.9).



Obr.9 Reaktivní funkční skupiny proteinu, kde ++ se velmi často používají, + se často používají, ± se příliš nepoužívají a – se nepoužívají k ukotvení enzymu (upraveno dle Cao, 2005).

Před vlastní imobilizací je obvykle nutné funkční skupiny nosiče (popř. biomolekuly) aktivovat pomocí vhodně zvoleného činidla. Nevýhodou kovalentní imobilizace je v určitých případech nižší katalytická aktivita, pravděpodobně způsobená reakcí aminokyselinového zbytku, který se nachází v aktivním místě. Tomuto faktu se může předejít použitím kompetitivních inhibitorů či kofaktorů (Cao, 2005).

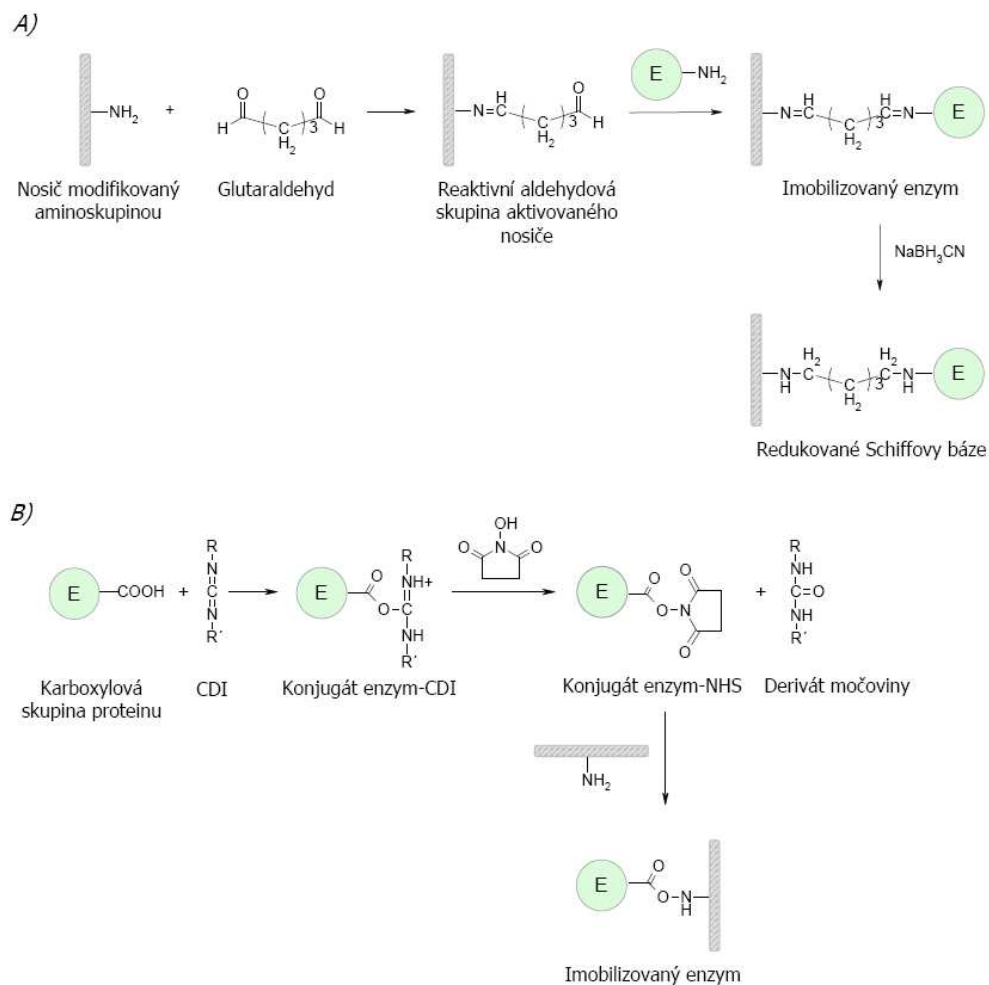
Derivatizaci nosiče nesoucího hydroxyskupinu je možno provést za pomoci epichlorhydrinu (Akkaya *et al.*, 2009), jehož oxiranový kruh je využit při adici biokomponenty (Obr.10a). V případě, že nosič obsahuje více hydroxylových skupin se k aktivaci používá bromkyan (Arica *et al.*, 2000). Reakce s hydroxyly probíhá v alkalickém prostředí, produktem je imidokarbonát nebo isomočovina. Ihned po aktivaci je ale nutno nadbytek reagentu odstranit, neboť při jeho působení na protein by v místě methioninu docházelo ke štěpení (Obr.10b).



Obr.10 Kovalentní imobilizace enzymu na aktivovaný nosič nesoucí hydroxyskupinu.

Aktivace nosiče za použití **a)** epichlorhydrinu a **b)** bromkyanu (upraveno dle Barredo, 2005).

Nosiče modifikované aminoskupinou se mohou aktivovat bifunkčními činidly jako jsou diisokyanáty a dialdehydy. Nejčastěji používaným je poměrně levný a běžně dostupný glutaraldehyd (Betancor *et al.*, 2006), který je navíc dostatečně reaktivní a šetrný k enzymům. Vlastní aktivace spočívá v tvorbě nestabilní Schiffovy báze mezi aminoskupinou nosiče a aldehydovou skupinou glutaraldehydu. Druhá aldehydová skupina zůstává volná a lze ji tedy využít pro stejnou reakci s aminoskupinou proteinu. Zpravidla následuje redukce Schiffovy báze pomocí kyanoborohydridu sodného, kdy vzniklá jednoduchá vazba je stabilnější. (Obr.11a). Pokud je jako činidlo použit některý z karbodiimidů (CDI) v kombinaci s N-hydroxysukcinimidem (NHS); (Hong *et al.*, 2007), dochází nejprve k aktivaci karboxyskupiny proteinu, která posléze reaguje s aminoskupinou daného nosiče (Obr.11b). Uvedený postup probíhá za daleko mírnějších podmínek než-li při použití samotného karbodiimidu a enzym si zachovává poměrně vysokou aktivitu.



Obr.11 Kovalentní imobilizace enzymu na aktivovaný nosič obsahující aminoskupinu. Aktivace nosiče **a**) glutaraldehydem a **b**) pomocí karbodiimidu (upraveno dle Barredo, 2005).

3. 7. 1. 3. Zesíťení

Další technika využívá celou řadu funkčních činidel (glutaraldehyd, bisdiazobenzidin, hexamethylen diisokyanát), která vytváří chemické vazby mezi molekulami proteinu, vzniká nerozpustná síť – retikulum (Eldin *et al.*, 2000; Albayrak & Yang, 2002). Reakce probíhá stejným způsobem jako v případě kovalentní imobilizace, ale nepoužívá se zde ve vodě nerozpustný nosič. Mezimolekulární zesíťení se velmi často používá v kombinaci s jinými metodami, např. přímou sorpcí, kdy pomáhá biomolekulu stabilizovat a zabraňuje jejímu uvolňování z nosiče (López-Gallego *et al.*, 2005). Během přípravy enzymového agregátu obvykle dochází ke změnám v aktivním místě, které zapříčiňují sníženou aktivitu (Cao, 2005).

3. 7. 1. 4. Zachycení do polymerní matrice

Z historického pohledu je třetí nejstarší metodou imobilizace zachycení enzymu v polymerní matrici (entrapment). K tomuto účelu se nejčastěji používají polypeptidy (želatina, kolagen, kasein), polysacharidy (karragenan, alginát, agarosa) a syntetické polymery (polyakrylamid, polyvinylalkohol). V klasickém provedení jsou molekuly enzymu zabudovány do matrice během jejího vytváření (Prabhune & SivaRaman, 1991), ale existují i různé modifikace, kde biokomponenta proniká do pórů již vytvořené matrice (Norris, 1975). Netvoří se vazba enzym – nosič, a proto není tak velký pokles aktivity. Přestože se jedná o postup relativně jednoduchý, levný a poskytující vysoký výtěžek, skýtá nedostatek v podobě snadného uvolňování enzymu. Metodika není použitelná pro makromolekulární substráty a produkty, neboť by nemohly volně difundovat do/z matrice (Cao, 2005).

3. 7. 1. 5. Uzavření mezi semipermeabilní membrány

Umístění enzymu mezi polopropustné membrány umožňuje výměnu substrátu a produktu mezi vnitřním a vnějším prostředím, aniž by docházelo ke ztrátám vysokomolekulárního proteinu. To je zajištěno vhodně zvolenou velikostí pórů (Jen *et al.*, 1995). V oblasti biomedicíny, analýzy a potravinářského průmyslu našly své uplatnění enzymy či proteiny obalené lipidovou dvojrůstvou (Walde & Ichikawa, 2001). Liposomy se zejména používají pro transport léčiv a jejich kontrolované uvolňování v cílové tkáni. V procesu mikroenkapsulace je naopak biokatalyzátor uchováván v kapsuli z polymerního materiálu. Průměr kapsule při opouzdření nebývá větší než několik milimetrů (Iso *et al.*, 1989). Komerčně dostupná dutá vlákna a ultrafiltrační membrány jsou odolné vůči chemickým a mechanickým vlivům, proto jsou vhodné k dlouhodobému používání (Monshipouri *et al.*, 1992). Vzhledem k tomu, že nedochází k žádným chemickým interakcím s polymerem, je metoda vhodná pro imobilizaci citlivějších proteinů. K výhodám patří i možnost imobilizace více enzymů najednou (Chang *et al.*, 1996).

3. 7. 2. Imobilizace α -amylasy

α -Amylasy, jakožto průmyslově využívané enzymy, byly již nesčetněkrát imobilizovány na nejrůznější nosiče (Tab.1). Imobilizované amylasy lze lehce odstranit z reakčního prostředí a znovu je použít, anebo se mohou uplatnit v kontinuální hydrolyze škrobových substrátů (Bayramoğlu *et al.*, 2004). Při ztekucování škrobu jsou α -amylasy vystaveny poměrně vysoké teplotě, a proto je důležité, aby enzymy použité v uvedeném procesu byly termostabilní. Z literatury je známa celá řada případů, kdy imobilizované α -amylasy vykazují nižší sensitivitu vůči teplotě než-li jejich rozpustné analogy (Chang & Juang, 2004, Kahraman *et al.*, 2007). Konformace proteinové molekuly se po imobilizaci stává rigidnější, je

tak zamezeno snadnému rozbalení a inaktivaci uvedeného enzymu. Dalším požadavkem, který je kladen na průmyslové enzymy, je jejich pH stabilita (Bryjak, 2003). Imobilizací amylas na pevné nosiče dochází ke změnám hodnot kinetických parametrů, jako jsou K_m a V_{max} . Hodnoty K_m se velmi často zvyšují, což znamená, že afinita α -amylas k substrátu se snižuje (Tümtürk *et al.*, 2000, Tripathi *et al.*, 2007). Tento fakt může být způsoben difúzním omezením pro substrát, sterickým bráněním nerozpustného nosiče či ztrátou enzymové flexibility, jež je důležitá k vazbě substrátu do aktivního místa.

Tab.1 Přehled různých technik používaných k imobilizaci α -amylas.

Technika imobilizace	Druh nosiče	Zdroj α -amylasy	Literatura
adsorpce	ultrajemné částice SiO ₂	<i>B. subtilis</i>	Kondo & Urabe, 1995
adsorpce	nitrocelulosová membrána s navazáním barvivem Cibacron Blue F3GA	<i>B. licheniformis</i>	Tanyolaç <i>et al.</i> , 1998
adsorpce	aminoalkylsilan-Al ₂ O ₃	<i>B. subtilis</i>	Abdel-Naby <i>et al.</i> , 1999
adsorpce	kopolymerní hydrogel polyvinylpyrrolidonu a kys. itakonové	vepřový pankreas	Tümtürk <i>et al.</i> , 1999a
adsorpce	kopolymerní hydrogel polyakrylamidu a kys. maleinové	vepřový pankreas	Tümtürk <i>et al.</i> , 1999b
adsorpce	práškový ZrO ₂	<i>B. subtilis</i>	Reshmi <i>et al.</i> , 2006
adsorpce	kopolymerní hydrogel polyethylenglykol-dimethakrylátu a vinylimidazolu s chelatovaným Cu ²⁺	<i>A. oryzae</i>	Kara <i>et al.</i> , 2005
adsorpce	práškový Al ₂ O ₃	<i>B. subtilis</i>	Reshmi <i>et al.</i> , 2007
kovalentní imobilizace	mikročástice polyhydroxyethylmethakrylátu	<i>Bacillus</i> sp., typ II-A	Arica <i>et al.</i> , 1995

pokračování **Tab.2**

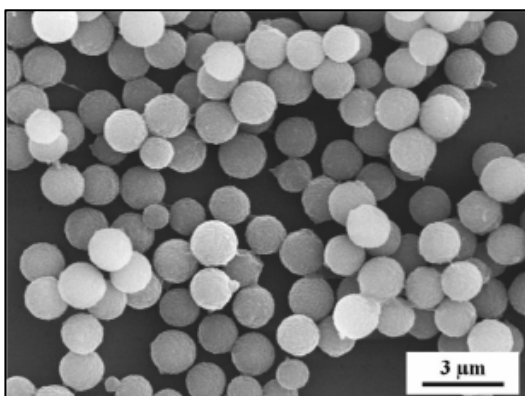
Technika imobilizace	Druh nosiče	Zdroj α -amylasy	Literatura
kovalentní imobilizace	kopolymer polytetrafluorethylenu a hexafluorpropylenu obalený polyvinylalkoholem	<i>B. licheniformis</i>	Yang & Chase, 1998
kovalentní imobilizace	kopolymerní mikročástice polymethylmethakrylátu a kys. akrylové	vepřový pankreas, typ VI-B	Aksoy <i>et al.</i> , 1998
kovalentní imobilizace	kopolymer akrylonitrilu a butadienu	<i>B. subtilis</i>	Mineki <i>et al.</i> , 2000
kovalentní imobilizace	mikročástice polyhydroxyethyl-methakrylátu a kopolymeru polystyrenu a hydroxyethylmethakrylátu	vepřový pankreas, typ VI-B	Tümtürk <i>et al.</i> , 2000
kovalentní imobilizace	kopolymerní gel polybutylakrylátu a pentaerythrittriakrylátu, kopolymerní gel polybutylakrylátu a glykoldimethakrylátu	<i>Bacillus</i> sp., typ II-A	Bryjak, 2003
kovalentní imobilizace	silanizované částice SiO ₂	<i>H. vulgare</i>	Lim <i>et al.</i> , 2003
kovalentní imobilizace	kompozitní částice z přírodního jílu a chitosanu	<i>B. subtilis</i>	Chang & Juang, 2004
kovalentní imobilizace	kopolymerní membrána polyhydroxyethyl-methakrylátu a glycidylmethakrylátu	<i>B. licheniformis</i>	Bayramoğlu <i>et al.</i> , 2004
kovalentní imobilizace	silanizované skleněné částice	vepřový pankreas, typ VI-B	Kahraman <i>et al.</i> , 2007

pokračování **Tab.2**

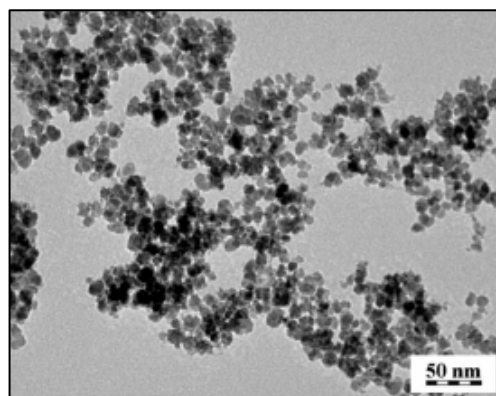
Technika imobilizace	Druh nosiče	Zdroj α -amylasy	Literatura
kovalentní imobilizace	chitosanové mikročástice, Amberlit MB 150	<i>V.radiata</i>	Tripathi <i>et al.</i> , 2007
kovalentní imobilizace	nanočástice Fe ₃ O ₄ obalené celulosou	<i>B. subtilis</i>	Namdeo & Bajpai, 2009
kovalentní imobilizace	hybridní materiál obsahující cyklický karbonát	vepřový pankreas, typ VI-B	Türünç <i>et al.</i> , 2009
kovalentní imobilizace	mikročástice polyvinylaminu a polyvinylformamidu	<i>G.stearothermo-philus</i>	Konieczna-Molenda <i>et al.</i> , 2009
entrapment	Eudragit ®, polyethylenimin	<i>B. licheniformis</i>	Cong <i>et al.</i> , 1995
entrapment	polyakrylamidový gel	<i>A. oryzae</i>	Raviyan <i>et al.</i> , 2003
entrapment	kapsule alginátu vápenatého	<i>B. subtilis</i>	Konsoula & Liakopoulou-Kyriakides, 2006
enkapsulace	CLA – makroemulze olej ve vodě	<i>Bacillus</i> sp., typ XI-B	Lamb & Stuckey, 1999

3. 8. Magnetické nosiče

Magnetické částice jsou široce studovány a používány v mnoha oblastech biotechnologie, medicíny a přírodních věd. K výrobě nosičů se volí nejrůznější materiály, nejčastěji oxidy železa – $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a Fe_3O_4 (Liu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008), dále CrO_2 (Zhong *et al.*, 2001), čisté kovy – Fe, Co, Ni a jejich slitiny (Suh *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2001) nebo ferity - CoFe_2O_4 , MnFe_2O_4 a NiFe_2O_4 (Wang *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 1999). Pro jednotlivé aplikace je zapotřebí částic vhodné velikosti, podle toho se rozdělují na mikro- (1 – 100 μm); (Obr.12a) a nanočástice (0,1 – 100 nm); (Obr.12b). Vlastnosti částic nejsou závislé jen na jejich tvaru a velikosti, ale také na jejich povrchové modifikaci (Lemarchand *et al.*, 2004). Vzniklé magnetické jádro se následně stabilizuje obalením syntetickými či přírodními polymery, popř. jinými látkami. V porovnání s objemovými nosiči mají částice velký povrch a tím lepší vazebnou kapacitu biomolekul jako jsou různé proteiny (enzymy, protilátky), nukleové kyseliny nebo oligonukleotidy. Velmi žádoucí jsou pak jejich magnetické vlastnosti usnadňující manipulaci částic při použití vnějšího magnetického pole (Šafařík & Šafaříková, 2009).



(a)



(b)

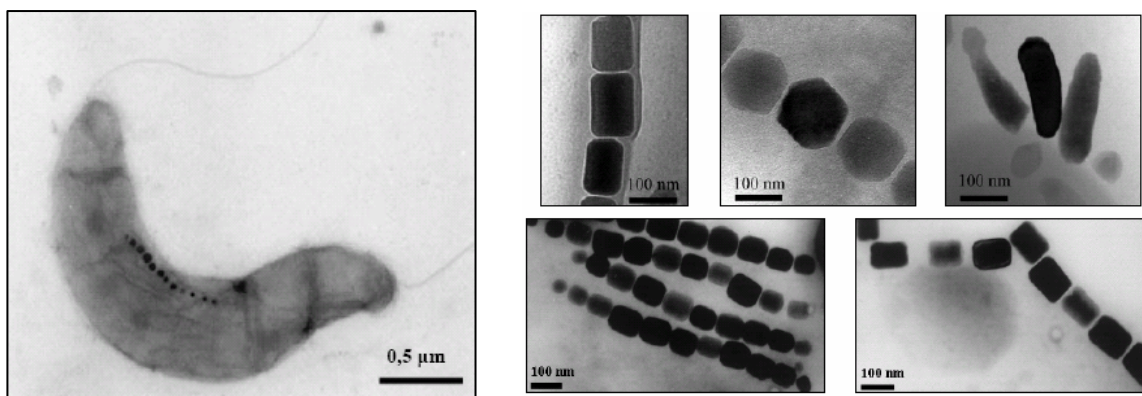
Obr.12 Magnetické nosiče. **a)** SEM snímek mikročástic $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obalených kopolymerem 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu, **b)** TEM snímek nanočástic $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ stabilizovaných kys. citronovou (převzato z Horák *et al.*, 2007).

3. 8. 1. Příprava magnetických částic

V literatuře bylo publikováno nepřehledné množství metod, jež vedou k syntéze magnetických mikro- a nanočástic oxidů železa, zejména maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a magnetitu (Fe_3O_4). Nejběžněji používanou syntetickou metodou je koprecipitace z vodného roztoku obsahujícího železnaté a železité soli. Srážení částic je pak indukováno smícháním roztoku se zásadou. Vlastnosti částic je možné ovlivnit vhodně zvolenými podmínkami (pH, iontová síla, teplota, koncentrace železa, reakční doba) při jejich syntéze (Babes *et al.*, 1999). Další možností

přípravy partikulí je termický rozklad organometalických prekurzorů, který se provádí v organickém rozpouštědle a za přítomnosti surfaktantů, např. kyseliny olejové. V daném procesu se primárně utvoří částice železa, které jsou následně oxidovány na magnetitové (Pei *et al.*, 2007), popř. maghemitové částice (Hyeon *et al.*, 2001). V klasickém provedení sol-gel procesu je vodný, popř. nevodný roztok prekursoru podroben sérii hydrolytických a polymeračních reakcí, jež vedou k tvorbě koloidní suspenze (solu). Sol je převeden na viskózní gel a následně na pevný materiál (Xu *et al.*, 2009). Magnetické nanočástice mohou být připraveny laserem indukovanou pyrolýzou, kdy je směs plyných prekurzorů s ethylenem rychle zahřáta laserem a dopravena prostřednictvím nosného plynu k reakční zóně. Bylo zjištěno, že kontrolovaná oxidace uvnitř reakční zóny dává vzniku maghemitu, pokud však oxidace probíhá mimo zónu tvoří se nanočástice železa (Miguel *et al.*, 2002). Při použití mikroemulzní metody, neboli metody obrácených micel, jsou vodné roztoky solí obklopeny povrchově aktivní látkou a tím odděleny od druhé kapaliny, se kterou jsou nemísitelné. Množství prekursoru dostupného k utváření částic je limitováno velikostí nitra micel (Zhi *et al.*, 2006). Jako další postupy lze uvést elektrochemickou syntézu (Pascal *et al.*, 1999), sonochemickou techniku (Vijayakumar *et al.*, 2000), sprejovou pyrolýzu (Morales *et al.*, 2000) aj.

Magnetické nanočástice železa (50 – 100 nm) je možné získat i z tzv. magnetotaktických bakterií (Blakemore, 1975). Přestože magnetotaktické bakterie představují morfologicky a fyziologicky různorodou skupinu mikroorganismů, vyznačují se několika společnými charakteristikami. Jedná se zejména o vodní, gramnegativní pohyblivé bakterie. Převážná část žije v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku – na přechodu mezi zónami bohatými/ chudými na kyslík a na rozhraní voda/ sediment (Bazyliński, 1995). Mezi nejznámější představitele patří prokaryota rodu *Magnetospirillum* - *M. gryphiswaldense*, *M. magnetotacticum* a *M. magneticum* (Obr.13a). Částičky magnetitu nebo greigitu (Fe_3S_4) jsou akumulovány ve specializovaných organelách, tzv. magnetosomech, které jsou obvykle uspořádány do jednoho či více řetízků (Obr.13b). Uvedené struktury slouží jako střílky kompasu, které pasivně orientují buňky bakterie v magnetickém poli Země a tím jim usnadňují vyhledávání méně okysličeného prostředí – magnetoaerotaxe (Schüler & Frankel, 1999). V porovnání s chemicky syntetizovaným magnetitem mají bakteriální nanočástice stejný tvar a velikost krystalů (Komeili, 2007). Fosfolipidová membrána obalující krystalky navíc usnadňuje připojení látek k povrchu magnetosomů (Ceyhan *et al.* 2006).



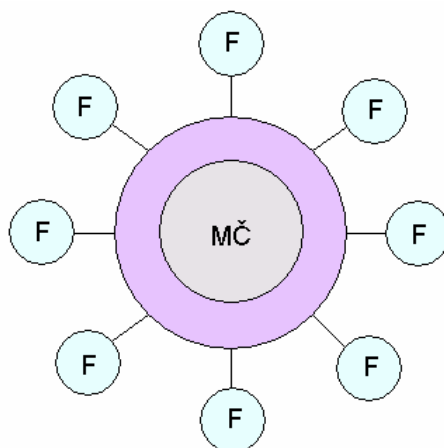
(a)

(b)

Obr.13 Magnetotaktické bakterie. **a)** TEM snímek bakterie *Magnetospirillum gryphiswaldense* (převzato z Schüler & Frankel, 1999), **b)** TEM snímek morfologie krystalů a uspořádání magnetosomů u různých magnetotaktických bakterií (převzato z Benzerara & Menguy, 2009; Schüler & Frankel, 1999).

3. 8. 2. Povrchová modifikace magnetických částic

Magnetické partikule mají tendenci se shlukovat, proto je třeba jejich povrch upravit vhodnou inertní nízko- či vysokomolekulární látkou, jedná se o tzv. funkcionalizaci nosiče. Povrchová modifikace nejen že potlačuje interakce mezi částicemi, ale umožňuje i vnesení funkčních skupin, které dovolují navázání cílových látek (Obr.14).



Obr.14 Magnetická částice s upraveným povrchem, kde MČ je magnetická částice, O je obalový materiál a F je funkční skupina (upraveno dle Pankhurst *et al.*, 2003).

Pokud jsou partikule určeny k *in vivo* aplikacím, je velmi důležité, aby byl obalový materiál tak i samotný nosič biokompatibilní a biodegradabilní (Gupta & Gupta, 2005). V opačném případě by docházelo k imunitní odpovědi a daná látka by nemohla být v organismu

odbourána. Z literatury je známa celá řada látek, které byly k úpravě částic použity. Zjednodušeně lze rozdělit na látky polymerního charakteru, látky organické a anorganické (Tab.2).

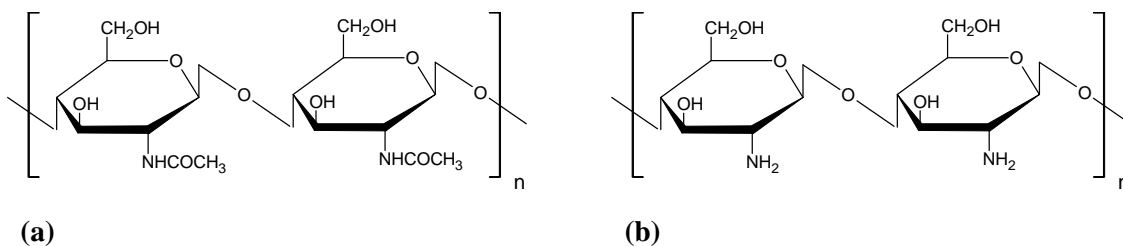
Tab.2 Přehled různých typů materiálů používaných k povrchové modifikaci magnetických částic.

	Obalový materiál	Literatura
Polymery – přírodní	chitosan	Denkbas <i>et al.</i> , 2002
	celulosa	Namdeo & Bajpai, 2009
	dextran	Berry <i>et al.</i> , 2003
	alginát	Teotia & Gupta, 2001
Polymery – syntetické	polyethylenglykol	Zhang <i>et al.</i> , 2002
	polyvinylalkohol	Shan <i>et al.</i> , 2003
	polymethylmethakrylát	Chen <i>et al.</i> , 2008
	polystyren	Fang <i>et al.</i> , 2009
Látky organické	kys. stearová, olejová	Yang <i>et al.</i> , 2010
	3-aminopropyltriethoxysilan	Mikhaylova <i>et al.</i> , 2004
Látky anorganické	Al ₂ O ₃	Li <i>et al.</i> , 2007
	SiO ₂	Santra <i>et al.</i> , 2001
	Au	Kouassi & Irudayaraj, 2006

Poměrně oblíbeným materiálem pro funkcionalizaci magnetických částic je polyamino sacharid odvozený od chitinu – chitosan neboli (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan (Obr.15). V přírodě se vyskytuje pouze v malém množství u některých hub rodu *Aspergillus* a *Mucor* (Hu *et al.*, 2004), ve velkém měřítku se získává alkalickou deacetylací chitinu za vysoké teploty. Ve své struktuře obsahuje chitosan reaktivní amino- a hydroxylové skupiny, které jsou přístupné k chemické modifikaci a mohou být využity k imobilizaci biologicky aktivních molekul (Peter, 1995; Dutta *et al.*, 2002).

Oproti jiným neutrálním nebo záporně nabitým polysacharidům má chitosan povahu kationtu (pK ~ 6.5) a jeho rozpustnost závisí na hodnotě pH. V neutrální oblasti je polyamino sacharid nerozpustný, avšak s posunem pH k nižším hodnotám se rozpustnost zvyšuje – dochází k protonizaci aminoskupin (Rodrigues *et al.*, 2008). Kladně nabitá aminoskupina vykazuje fungicidní a antibakteriální účinky, neboť interaguje s negativně nabitými místy na povrchu buněčných stěn bakterií a plísní (Fernandez-Saizn *et al.*, 2006).

Uvedený polymer a jeho deriváty (karboxymethylchitosan, N-trimethylchitosan chlorid) splňují podmínky biokompatibility a biodegradability, dále mají hydrofilní charakter a jsou mechanicky pevné. Chitosan rovněž chelatuje s ionty těžkých kovů (Vinšová & Vavříková, 2008). Pro své vlastnosti má chitosan velký potenciál k aplikaci v biomedicíně a farmacii např. jako nosič pro kontrolované doručení léčiv (Park *et al.*, 2010). Používá se také jako potravinový doplněk pro snížení hladiny cholesterolu a redukci hmotnosti. Lze jej aplikovat k čištění vod, v kosmetice, ke konzervaci potravin a impregnaci textilií (Vinšová & Vavříková, 2007).



Obr.15 Struktura **a)** chitinu a **b)** chitosanu

3. 8. 3. Aplikace magnetických částic

Použití magnetických mikročástic je nejvíce rozšířeno v magnetických separacích a biotechnologiích, zatímco nanočástice se upřednostňují v medicínské diagnostice (imunostanovení, magnetické rezonační zobrazování) a terapii (cílený transport léků, magnetická hypertermie), molekulární biologii a bioinženýrství. Vzhledem ke své velikosti mohou nanočástice cirkulovat v krevním řečišti mnohem déle než-li větší částice a mohou prostupovat stěnami kapilár, aniž by způsobily jejich ucpání (Mornet *et al.*, 2006). Pro lékařské aplikace je důležité, aby se používané nanočástice neshlukovaly, byly biokompatibilní a biodegradabilní, dále nesmí být toxické a za fyziologických podmínek musí zůstat stabilní (Shubayev *et al.*, 2009). Hlavní předností magnetických částic je jejich vysoká vazebná kapacita biologicky významných molekul (obecně lze říci, že čím je velikost částice menší, tím je větší vazebná kapacita) a snadná ovladatelnost působením magnetického pole, takže mohou být rychle separovány z reakční směsi.

3. 8. 3. 1. Biotechnologické a lékařské aplikace

Pro biotechnologické účely bylo na magnetické, popř. hybridní nosiče (částice inkorporované do nerozpustné matrice) imobilizováno nesčetné množství enzymů – glukoamylasa (Bahar & Celebi, 1998), cytochrom c oxidasa (de Cuyper & Joniau, 1992), β -laktamasa (Gao *et al.*, 2003), chymotrypsin (Izmailov *et al.*, 2000), alkoholdehydrogenasa (Liao & Chen, 2002), galaktosaoxidasa (Bílková *et al.*, 2002a), neuramidinasa (Bílková *et al.*, 2002b), lipasa (Bruno *et al.*, 2005), papain (Korecká *et al.*, 2005), DNasa (Rittich *et al.*, 2002), RNasa

(Horák *et al.*, 2001). Pokud jsou všechny ostatní složky systému diamagnetické, je možné ukotvené biokatalyzátory selektivně odstranit pomocí vhodného magnetického separátoru, permanentního magnetu nebo elektromagnetu.

Magnetické mikro- a nanočástice mohou být využity jako nosiče pro imobilizaci protilátek, které jsou, stejně jako enzymy, proteinové povahy. Takto modifikované částice se využívají ke specifické identifikaci a kvantifikaci bioaktivních látek a xenobiotik, obdobně jako u standardního provedení na mikrotitračních destičkách. Příslušná protilátka je na nosič ukotvena přímo kovalentním spojením (Tudorache *et al.*, 2008), anebo pomocí proteinů schopných vázat protilátky, např. proteinu A nebo proteinu G (Widjojoatmodjo *et al.*, 1993). Po inkubaci magnetické protilátky s analyzovaným vzorkem lze komplex protilátka-antigen lehce separovat magnetem a zjistit množství navázaného antigenu. U jiného typu magnetického imunostanovení slouží částice jako detekovatelná značka, nahrazují tedy enzymy, radionuklidy, chemiluminiscenční či fluorescenční markery (Enpuku *et al.*, 2005).

Poměrně novou transfekční technologii představuje tzv. magnetofekce, která umožňuje vnesení nukleové kyseliny prostřednictvím vnějšího magnetického pole. Na magnetické nanočástice obalené kladně nabitými molekulami (kationtové lipidy a polymery) se váží genové vektory (DNA, siRNA, dsRNA, mRNA, viry), které jsou posléze kultivovány s buňkami. Při aplikaci magnetického pole jsou takto vytvořené komplexy transportovány endocytózou do buněk, aniž by došlo k porušení plasmatické membrány. Technika magnetofekce je využitelná nejen k *in vitro* transfekci, ale má i velký význam pro genovou terapii (Schillinger *et al.*, 2005).

V současné době se soustředí stále větší pozornost na vývoj efektivních systémů cíleného doručení léčiv. U daných systémů se klade důraz na zvýšení dostupnosti léku v místě výskytu nemoci za současné minimalizace škodlivých vedlejších účinků. Zakoncentrování léku ve specifické oblasti dovoluje snížit jeho terapeutické množství a organismus není toliko zatěžován. Všechny tyto požadavky splňují právě magnetické nanočástice oxidů železa (Plank *et al.* 2003; Neuberger *et al.* 2005). Po injekci magnetických nanočástic, na jejichž povrchu je léčivo imobilizováno, do těla se aplikuje vnější magnetické pole směřující ke specifickému místu. K úspěšné léčbě je též důležité řízené uvolňování doručovaných léků. Toho lze dosáhnout modulací magnetického pole, enzymovou aktivitou nebo změnou fyziologických podmínek jako je pH, osmolalita a teplota (Alexiou *et al.*, 2002). Cíleně lze v těle navádět např. protinádorová léčiva (Shinkai, 2002) či látku rozpouštějící sraženinu v srdeční cévě vzniklou při infarktu myokardu (Koneracká *et al.*, 1999).

Oproti zdravým buňkám jsou nádorové buňky citlivější ke zvýšeným teplotám, čehož se využívá v lokální terapii rakoviny, tzv. hypertermii. Pokud je tkáň na krátkou dobu (asi 30 minut) zahřáta na teplotu vyšší než 42 °C, dochází k destrukci pouze postižené buňky (Pankhurst *et al.*, 2003). Toho lze docílit použitím magnetických nanočástic, jež jsou injekčně vpraveny do oblastí maligní tkáně a následně stimulovány střídavým magnetickým polem.

Působením alternujícího magnetického pole jsou částice rozkmitány a v místě nádoru generují teplo (Mornet *et al.*, 2006).

Superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPION) stabilizované vhodným polymerním materiálem se používají jako kontrastní látky při zobrazování metodou magnetické rezonance (MRI, Magnetic Resonance Imaging). Narozdíl od jiných diagnostických technik je uvedená metoda, jež slouží k trojrozměrnému skenování lidského těla, neinvazivní (Saleh *et al.*, 2004).

3. 8. 3. 2. Magnetické separace

Magnetické nosiče mají velký potenciál k aplikaci v magnetické separaci, kdy usnadňují a urychlují některé běžně používané separační postupy. Umožňují manipulaci, separaci a izolaci zvolených organických či anorganických sloučenin, biomolekul (proteiny, peptidy, nukleové kyseliny) a dokonce i buněk a bakterií z heterogenních systémů.

Separace proteinů pomocí magnetických částic je ve většině případů realizována prostřednictvím afinitních interakcí, avšak lze využít také interakce hydrofobní a iontové, popř. vodíkové vazby (Šafařík *et al.*, 2007). Afinitní ligandy, jež byly imobilizovány na povrch magnetických částic, zahrnují barviva – Cibachrom Blue F3GA (Odabasi & Denizli, 2004) nebo Reactive Red 120 (Ennis & Wisdom, 1991); cheláty přechodných kovů - Ni²⁺ (Nishiya *et al.*, 2002), Cu²⁺ (Meyer *et al.*, 2005); monoklonální protilátky (Prioult *et al.*, 2000); streptavidin (Apoga *et al.*, 2001); inhibitory enzymů (Hubbuch & Thomas, 2002) a jiné.

Magnetické nosiče, na jejichž povrch je ukotven krátký úsek oligonukleotidů, jsou vhodné pro rychlou a selektivní izolaci nukleových kyselin, DNA a RNA. Na základě komplementarity bází dochází k párování (hybridizaci) mezi řetězcem oligonukleotidů a cílovou nukleovou kyselinou. Při použití magnetického separačního zařízení je takto navázaná nukleová kyselina lehce odstraněna z analyzovaného vzorku (sérum, plasma, homogenáty živočišných nebo rostlinných tkání, buněčné lyzáty); (Berensmeier, 2006). K izolaci eukaryotních mRNA, které mají na svém 3' konci řetězec složený z opakující se sekvence adeninu, se používají komerčně dostupné magnetické částice Dynabeads® Oligo(dT)25 (Invitrogen Dynal AS) nesoucí oligodeoxythymidin (Húska *et al.*, 2009).

Velmi populární je i buněčné třídění s využitím imunomagnetických částic. Na buněčném povrchu se nachází antigeny, které jsou pro danou buňku specifické. Partikule s imobilizovanými protilátkami proti těmto povrchovým antigenům vytváří s danými buňkami komplex, který je následně magneticky odstraněn. Imunomagnetické separace našly uplatnění při detekci patogenních mikroorganismů v potravinářské technologii (Radu *et al.*, 2001) či environmentální mikrobiologii (McCuin *et al.*, 2001). V lékařství jsou imunomagnetické separace účinným nástrojem pro odstraňování nádorových buněk z kostní dřeně (Treleaven *et al.*, 1984; Chung *et al.*, 2009).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. 1. Magnetické částice

Magnetické nanočástice (Fe_3O_4) obalené chitosanem byly obdrženy z Centra výzkumu nanomateriálů UP v Olomouci.

Magnetické mikročástice (Fe_3O_4) obalené chitosanem byly obdrženy od prof. Ing. Iva Šafaříka DrSc. z Českých Budějovic, Na Sádkách 7, 370 05 Česká republika.

4. 2. Chemikálie

α -amylasa (<i>B. subtilis</i>)	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
α -amylasa, vepřová pankreatická, typ VI-B	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
aceton	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
acetonitril	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
akrylamid	Serva, Německo
roztok BCA	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
bisakrylamid	Serva, Německo
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250)	Serva, Německo
n-butanol	Fluka, Švýcarsko
dodecylsulfát sodný	Fluka, Švýcarsko
β -cyklodextrin	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
EDC.HCl (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)	Fluka, Švýcarsko
karbodiimid hydrochlorid)	
EPS (4,6-ethyliden-p-nitrofenyl- α -D-maltoheptaosid)	BioSystems S.A., Španělsko
glutaraldehyd	Fluka, Švýcarsko
glycin	Fluka, Švýcarsko
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina)	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
hovězí sérový albumin	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
hydrogenuhlíčitan amonný	Lachema, ČR
chlorid barnatý dihydrát	Lachema, ČR
chlorid vápenatý	Lachema, ČR
jodistan sodný	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
kyanoborohydrid sodný	Fluka, Švýcarsko
kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová	Bruker Daltonik GmbH, Německo
kyselina octová	Lachema, ČR
kyselina sinapová	Bruker Daltonik GmbH, Německo

kyselina trifluoroctová	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
methanol	Lachema, ČR
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin	Fluka, Švýcarsko
N-hydroxysukcinimid	Sigma-Aldrich Chemie, Německo
pentahydrát síranu měďnatého	Lachema, ČR
peroxidisíran amonný	Fluka, Švýcarsko
tris(hydroxymethyl)aminomethan	ICN Biomedicals, USA
vzorkový pufr (0,375 mol.l ⁻¹ Tris-HCl, 5 % CBB G-250, 10 % SDS, 5 % β-merkaptoethanol	Bio-Rad, USA

4. 3. Přístroje

analytické váhy	Sartorius, Německo
centrifuga MR1823	Jouan, Francie
digitální předvážky	OHAUS, USA
elektromagnetická míchačka RCT-Basic	IKA, Německo
hmotnostní spektrometr Microflex MALDI-TOF LRF20	Bruker Daltonik GmbH, Německo
komůrka na elektroforézu	Biorad, USA
lyofilizátor Lyovac GT2	Leybold-Heraeus, Německo
MALDI terčik (Anchorchip 600/96)	Bruker Daltonik GmbH, Německo
pH metr digitální	WTW, Německo
pipety automatické PIPETMAN® NEO	Gilson, Francie
programovatelný rotátor Multi Bio RS-24	Biosan, Litva
spektrofotometr Biochrom WPA Lightwave II UV/Vis	Biochrom Ltd, Velká Británie
termoblok	Grand Boekel, USA
termostat	Grant, Velká Británie
ultrafiltrační cela Amicon 8200 s filtrem XM10	Millipore, USA
vortex SA8	Stuart Scientific, Velká Británie

4. 4. Použité metody

4. 4. 1. Imobilizace α -amylasy na magnetické mikro- a nanočástice

4. 4. 1. 1. Karbodiimidová metoda

0,5 mg magnetických mikro-, popř. nanočástic obalených chitosanem byly 3x promyty v pufru (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1). K promytým částicím bylo přidáno 0,5 mg EDC.HCl rozpuštěného ve 25 μl pufru (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1), 0,6 mg NHS rozpuštěného ve 25 μl pufru (50 mM HEPES, pH 7,1) a 0,5 mg vepřové pankreatické, popř. mikrobiální α -amylasy rozpuštěné rovněž ve 25 μl pufru (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1). Tato reakční směs byla míchána 8 hodin za laboratorní teploty a následně probíhala imobilizace 12 hodin při teplotě 4°C bez míchání. Po skončení kovalentní imobilizace byly částice magneticky odseparovány, reakční směs byla odpipetována a částice byly 5x promyty puftrem (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1). Takto promyté částice s navázanou α -amylasou byly rozsuspendovány ve 50 μl pufru (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1, popř. 50 mmol.l^{-1} HEPES + $0,075 \text{ mmol.l}^{-1}$ CaCl_2 , pH 7,1).

4. 4. 1. 2. Glutaraldehydová metoda

Jako první byly 0,5 mg magnetických mikročástic obalených chitosanem 3x promyty v pufru (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1), poté bylo napipetováno 50 μl 5 % glutaraldehydu a částice byly aktivovány 3 hodiny za současného míchání při laboratorní teplotě. Po aktivaci byly magnetické částice separovány, nenavázaný glutaraldehyd byl odstraněn a mikročástice byly 5x promyty puftrem (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1). Následně bylo připipetováno 50 μl mikrobiální α -amylasy (2 mg.ml^{-1}), imobilizace probíhala 8 hodin za laboratorní teploty při míchání a 12 hodin při teplotě 4°C bez míchání. Vzniklé Schiffovy báze byly redukovány přidávkem 1 mg NaBH_3CN rozpuštěného ve 50 μl pufru (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1), kdy reakční směs byla ponechána 1 hodinu v ledové lázni. Po ukončení redukce byly částice magneticky odseparovány, supernatant byl odstraněn a mikročástice byly opět 5x promyty puftrem (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1). Promyté mikročástice s imobilizovanou α -amylasou byly rozsuspendovány v 50 μl pufru (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1, popř. 50 mmol.l^{-1} HEPES + $0,075 \text{ mmol.l}^{-1}$ CaCl_2 , pH 7,1).

4. 4. 2. Chemická modifikace α -amylasy

Chemická modifikace α -amylasy byla provedena pomocí β -cyklodextrinu a vlastní modifikaci předcházela aktivace příslušného cyklodextrinu metodou jodistanovou. K 851 mg β -cyklodextrinu (0,75 mmol) ve 40 ml deionizované vodě bylo přidáno 1235 mg NaIO_4 (5,78 mmol; 7,7 ekvivalentů). Vzniklá reakční směs byla míchána na elektromagnetické míchačce po

dobu 1 hodiny a poté probíhalo štěpení β -cyklodextrinu při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 24 hodin. Následující den byl nadbytek NaIO_4 srážen přidavkem 706 mg $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,89 mmol). Precipitát byl zfiltrován a roztok polyaldehydu byl použit čerstvý, popř. skladován při teplotě -20°C . K 75 mg α -amylasy v 15 ml pufru (50 mmol.l^{-1} HEPES, pH 7,1) bylo přidáno 6,52 ml polyaldehydu a tento roztok byl míchán na elektromagnetické míchače 1 hodinu. Přídavek 8,1 ml NaBH_3CN (160 mM) má za úkol redukovat vzniklé Schiffovy báze. Směs byla opětovně míchána na elektromagnetické míchače, a to 30 minut. Reakce probíhala 24 hodin při laboratorní teplotě, potom byl roztok dialyzován proti deionizované vodě ($4 \times 2 \text{ l}$) při teplotě 4°C , aby byl odstraněn zbytek nezreagovaného činidla. Následovala centrifugace (25 min, 12 000g, 4°C) a supernatant byl zahuštěn ultrafiltrací v cele Amicon v ledové lázni pod tlakem 1 bar. Po zahuštění na objem cca 7 ml byl roztok modifikované α -amylasy lyofilizován. Modifikovaný enzym byl skladován při teplotě -80°C .

4. 4. 3. Stanovení aktivity

Pro spektrofotometrické stanovení aktivity α -amylasy byl jako substrát zvolen EPS (4,6-ethyliden-p-nitrofenyl- α -D-maltoheptaosid) v 50 mmol.l^{-1} HEPES + $0,075 \text{ mmol.l}^{-1}$ CaCl_2 , 90 mmol.l^{-1} NaCl , 13 mmol.l^{-1} MgCl_2 , pH 7,1, který je součástí kitu používaného v klinické biochemii. Umělý substrát je hydrolyzován na kratší oligosacharidy, které jsou následně štěpeny α -glukosidasou (rovněž součástí kitu) za uvolnění 4-nitrofenolu, jehož absorbance se měří při $\lambda = 405 \text{ nm}$. K 600 μl substrátu ($3,6 \text{ mmol.l}^{-1}$), jenž byl inkubován při teplotě 30°C , bylo přidáno 24 μl α -amylasy, popř. 0,5 mg částic s imobilizovaným enzymem. Před každým měřením byly částice usazeny na dno kyvety pomocí vnějšího magnetického pole. Nárůst absorbance byl zaznamenáván v intervalu 1 min po dobu 5 min. Aktivita byla získána ze vztahu:

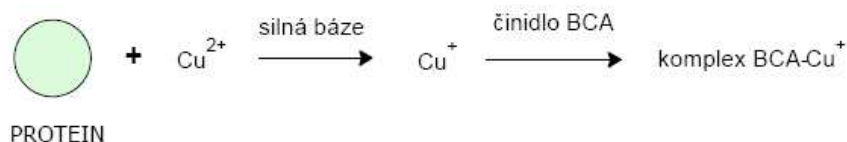
$$\frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V}{\epsilon * l}$$

kde $\Delta n / \Delta t$ – aktivita (kat), ΔA – změna absorbance, Δt – časový interval (s), V – celkový objem v kyvetě (l), ϵ – molární absorbní koeficient ($1/\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l – délka optické dráhy (cm).

4. 4. 4. Stanovení koncentrace proteinů metodou bicinchoninovou

Spektrofotometrické stanovení proteinů bylo provedeno s použitím kyseliny bicinchoninové. U této metody dochází v alkalickém prostředí k redukcí měďnatého ionu na měďný proteinem. Vzniklý měďný ion je následně chelátován kyselinou bicinchoninovou za vzniku červenofialového zbarvení, které se měří při vlnové délce 562 nm (Obr.17). Pracovní

roztok vznikl smísením roztoku A a B v poměru 50:1, kdy roztok A obsahoval 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicholin (dvojsodná sůl), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, vinan sodný, hydroxid sodný, NaHCO_3 a deionizovanou vodu, roztok B se skládal pouze z $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Ke 2 ml pracovního roztoku bylo přidáno 2 a 5 μl vzorku proteinu a poté byla směs inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Pro sestavení kalibrační přímky byl jako standard použito 10 – 50 μg BSA. Po inkubaci byla proměřena absorbance roztoku při vlnové délce 562 nm. Blank obsahoval činidlo a deionizovanou vodu.



Obr.17 Stanovení celkových proteinů kys. bicinchoninovou.

4. 4. 5. Stanovení specifické aktivity

Specifická aktivita volných α -amylas byla stanovena změřením aktivity a obsahu proteinů ve vzorku metodou bicinchoninovou. Specifická aktivita enzymu, vyjádřená v $\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$, je aktivita v daném objemu dělena obsahem proteinu ve vzorku, v případě imobilizovaného enzymu je specifická aktivita vztažena na 1 mg částic.

4. 4. 6. Stanovení vazebné kapacity

Množství navázané α -amylasy na magnetické mikro- či nanočástice bylo vypočítáno pomocí vztahu:

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

kde koncentrace proteinů před imobilizací C_b a po imobilizaci C_a je vyjádřena v $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, objem roztoku V_b a V_a je dán v μl , m_n je hmotnost pevného nosiče v mg.

Obsah proteinů byl stanoven metodou bicinchoninovou. Vazebná kapacita byla vyjádřena v μg proteinu navázaného na 1 mg magnetických částic.

4. 4. 7. Stanovení operační stability

Za účelem stanovení operační stability imobilizovaných α -amylas byla změřena jejich zbytková aktivita v každém cyklu. Měření bylo prováděno stejným způsobem vždy s jedním jediným vzorkem. Mezi jednotlivými cykly byly magnetické částice separovány, substrát byl odpipetován a částice byly 3x promyty pufrům ($50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HEPES, pH 7,1).

4. 4. 8. Stanovení teplotní stability

Vzorky volné a imobilizované vepřové pankreatické, popř. mikrobiální α -amylasy v pufru (50 mmol.l⁻¹ HEPES, pH 7,1, popř. 50 mmol.l⁻¹ HEPES + 0,075 mmol.l⁻¹ CaCl₂, pH 7,1) byly nejprve inkubovány při různých teplotách (25, 37, 45, 55, 65, 75, 85 °C) po dobu 30 min. Po ochlazení v ledové lázni byla změřena zbytková aktivita, která byla vztažena k aktivitě α -amylasy při 4 °C. Dále byla určena hodnota T₅₀, což je teplota, při které klesla aktivita enzymu na polovinu.

4. 4. 9. Stanovení stability při skladování

Stabilita při skladování volné a imobilizované vepřové pankreatické, popř. mikrobiální α -amylasy byla určena na základě změření jejich zbytkové aktivity v určitých časových intervalech po dobu 21 dní. Volné a imobilizované α -amylasy byly skladovány při teplotě 4 °C v prostředí pufru (50 mmol.l⁻¹ HEPES, pH 7,1, popř. 50 mmol.l⁻¹ HEPES + 0,075 mmol.l⁻¹ CaCl₂, pH 7,1).

4. 4. 10. Měření intaktní hmoty proteinu pomocí MALDI-TOF

Na MALDI terčik (Anchorchip 600/96) bylo nanášeno 0,5 μ l roztoku matrice SA1 (10 mg.ml⁻¹ kys. sinapové v acetonu) a kapka byla ponechána vysušit za vzniku tenké vrstvy krystalů matrice. Pro určení intaktní hmoty α -amylasy a jejich konjugátů bylo 5 μ l roztoku enzymu (10 mg.ml⁻¹ v deionizované vodě) smícháno s 15 μ l roztoku matrice SA2 (10 mg.ml⁻¹ kys. sinapové v 0,1 % kys. trifluoroctové / acetonitrilu, 1:1, v/v). Na MALDI terčik, který již obsahuje vrstvu SA1 bylo napipetováno 1 μ l vzorku a kapka ponechána vysušit při laboratorní teplotě. Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru Microflex MALDI-TOF LRF20 v lineárním módu pro pozitivní ionty s dusíkovým laserem ($\lambda = 337$ nm) o pulsní frekvenci 10 Hz. Externí kalibrace byla provedena s molekulárními ionty BSA.

4. 4. 11. SDS-PAGE elektroforéza

Ke vzorkům nativní a modifikované α -amylasy (1 mg ve 100 μ l deionizované vody) bylo připipetováno 100 μ l vzorkového pufru na elektroforézu (0,375 mol.l⁻¹ Tris-HCl, 5 % roztok bromfenolové modři, 10 % SDS, 5 % β -merkaptoethanol) a dále byly vzorky povařeny při 100 °C po dobu 5 minut.

Skla na vertikální elektroforézu byla upevněna v nalévacím stojanu a poté byly připraveny jednotlivé gely dle (Tab.3).

Tab.3 Složení separačního a zaostřovacího gelu.

Spodní (separační) gel 10 %		Horní (zaostřovací) gel 4%	
30 % akrylamid/ 0,8 % N, N'-		30 % akrylamid/ 0,8 % N, N'-	
methylenbisakrylamid (AA/ BIS)	4 ml	methylenbisakrylamid (AA/ BIS)	0,65 ml
0,375 mol.l ⁻¹ Tris-HCl, pH 8.8	2,5 ml	0,375 mol.l ⁻¹ Tris-HCl, pH 8.8	1,25 ml
deionizovaná voda	3,2 ml	deionizovaná voda	2,95 ml
10 % SDS	0,1 ml	10 % SDS	0,1 ml
10 % TEMED	10 µl	10 % TEMED	10 µl
10 % APS	5 µl	10 % APS	10 µl

Nejprve byla do prostoru mezi skla napipetována směs pro separační gel až do vyznačené výšky a byla převrstvena n-butanolem. Po 30 minutách byl n-butanol odstraněn a na již zpolymerovaný spodní gel byla napipetována směs pro zaostřovací gel. Ihned po nalití byl do gelu opatrně vložen hřebínek. Po ztuhnutí horního gelu (30 minut) byl hřebínek odstraněn a skla přenesena do elektroforetické nádoby. Do katodového i anodového prostoru byl nalit elektrodotový pufr (0,025 mol.l⁻¹ Tris-HCl, 0,192 mol.l⁻¹ glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) a stejným pufrem byly vypláchnuty jamky pro vzorky. Do jamek byly nadávkovány vzorky nativní mikrobiální α -amylasy (1,5 µl / 3 µl), její konjugát s BCD (1,5 µl / 3 µl) a standardu (5 µl). Aparatura byla připojena ke zdroji konstantního napětí (120 V). Po skončení elektroforézy bylo uskutečněno barvení gelu přes noc v barvicím roztoku (0,1 % CBB R-250, 45 % methanol, 15 % kys. octová). Následující den byl gel přenesen do odbarvovacího roztoku (40 % methanol, 10 % kys. octová). Ze zjištěných hodnot mobility a ze známých hodnot molekulové hmotnosti standardů byla získána kalibrační přímka, podle které byly stanoveny molekulové hmotnosti detekovaných proteinů.

4. 4. 12. MALDI-TOF peptide mass fingerprinting

Polyakrylamidový gel byl nejprve opláchnut deionizovanou vodou a poté byly proteinové pásy, o nichž se předpokládalo, že náleží nativní a modifikované mikrobiální α -amylase vyříznuty skalpelem. Vyříznutá část byla nakrájena na malé kostky, cca. 1x1 mm. Před vlastním štěpením je nutné obarvený gel odbarvit. Do ependorfky bylo napipetováno 100 µl 0,1 mol.l⁻¹ NH₄HCO₃ a 100 µl acetonitrilu, směs byla zvortexována a zcentrifugována. Po 1 hodině byla směs acetonitril - NH₄HCO₃ odpipetována a ke gelu bylo přidáno 165 µl acetonitrilu. Štěpení gelu bylo provedeno 1,5 µmol.l⁻¹ trypsinem v prostředí 50 mmol.l⁻¹ NH₄HCO₃ a 5 mmol.l⁻¹ CaCl₂ na ledové lázni 30 – 45 minut. Poté byla tato směs odpipetována a bylo přidáno 25 µl stejného pufru, který již neobsahuje trypsin. Vzorky byly ponechány přes noc při 37 °C. Získané digesty byly přímo použity pro MALDI-TOF MS analýzu. Jako matrice byla použita kys. α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) ve formě saturovaného roztoku v 50 % acetonitrilu /

0,1 % trifluoroctové kys. (1:2, v/v). Na MALDI terčik (Anchorchip 600/96) bylo napipetováno 0,6 µl proteinového digestu a 0,6 µl roztoku matrice, spojené kapky byly ponechány vysušit při laboratorní teplotě. Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru Microflex MALDI-TOF LRF20 v reflektroновém módu pro pozitivní ionty s dusíkovým laserem ($\lambda = 337$ nm) o pulsní frekvenci 10 Hz. Hmotnostní spektrometr byl kalibrován externě užitím směsi peptidových standardů (Bruker Daltonik). Získaná spektra pak byla vyhodnocena pomocí softwaru FlexAnalysis 2.4 a Biotools 3.0 (Bruker Daltonik) a porovnána s externí databází proteinových sekvencí NCBI pomocí programu Mascot Server 2.2 (Matrix Science, London, UK). Ke grafickému zpracování spekter posloužily programy ACD/SpecViewer (Advanced Chemistry Development, Toronto, Canada) a OriginPro 7.5 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

7. ZÁVĚR

- V této práci byly imobilizovány α -amylasy (vepřový pankreas, *B. subtilis*) na magnetické mikro- a nanočástice (Fe_3O_3) obalené chitosanem metodou glutaraldehydovou a karbodiimidovou.
- Byly srovnány vlastnosti enzymů, které byly kovalentně imobilizovány na různé magnetické nosiče (specifická aktivita, vazebná kapacita, operační, teplotní stabilita a stabilita při skladování).
- Z výsledků vyplývá, že ukotvené amylasy jsou teplotně stabilnější a vykazují lepší stabilitu při skladování než-li enzymy volné. Biokatalyzátor je také možné použít pro danou aplikaci opakovaně.
- Dále byl sledován vliv vápenatých iontů na teplotní stabilitu a stabilitu při skladování u volných a imobilizovaných α -amylas, kdy bylo zjištěno, že přidavkem těchto iontů lze dosáhnout lepších výsledků.
- Podařilo se také zmodifikovat mikrobiální α -amylasu cyklickým oligosacharidem β -cyklodextrinem. Z měření intaktní hmoty vyplývá, že v molekule α -amylasy došlo k modifikaci 9-ti primárních aminoskupin. Vzniklý konjugát také vykazuje lepší stabilitu vůči tepelné denaturaci.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdel-Naby M. A., Hashem A. M., Esawy M. A., Abdel-Fattah A. F. (1999) Immobilisation of *Bacillus subtilis* α -amylase and characterisation of its enzymic properties. *Microbiol. Res.* **153**, 319 – 325.
- Abe J. I., Sidenius U., Svensson B. (1993) Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/ subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochem. J.* **293**, 151 – 155.
- Aiyer P. V. (2005). Amylases and their applications. *Afr. J. Biotechnol.* **4**, 1525 – 1529.
- Akgöl S., Kaçar Y., S. Özkara, Yavuz H., Denizli A., Arica M. Y. (2001) Immobilization of catalase via adsorption onto L-histidine grafted functional pHEMA based membrane. *J. Mol. Catal. B – Enzym.* **15**, 197 – 206.
- Akkaya B., Şahin F., Demirel G., Tümtürk H. (2009) Functional polymeric supports for immobilization of cholesterol oxidase. *Biochem. Eng. J.* **43**, 333 – 337.
- Aksoy S., Tümtürk H., Hasırcı N. (1998) Stability of α -amylase immobilized on poly(methylmethacrylate-acrylic acid) microspheres. *J. Biotechnol.* **60**, 37 – 46.
- Albayrak N., Yang S. T. (2002) Immobilization of β -galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Biotechnol. Prog.* **18**, 240 – 251.
- Alexiou C., Schmid R., Jurgons R., Bergemann, Ch, Arnold W., Parak F. G. (2002). Targeted tumor therapy with ‘magnetic drug targeting’: Therapeutic efficacy of ferrofluid bound mitoxantrone. *Lecture Notes in Phys.* **594**, 233 – 251.
- Apoga D., Ek B., Tunlid A. (2001) Analysis of proteins in the extracellular matrix of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* using 2-D gel electrophoresis and MS/MS. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**, 145 – 150.
- Arica M. Y., Hasırcı V., Alaeddinoglu N. G. (1995) Covalent immobilisation of α -amylase on to pHEMA microspheres: Preparation and application to fixed bed reactor. *Biomaterials* **16**, 761 – 768.
- Arica M. Y., Yavuz H., Patir S., Denizli A. (2000) Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **11**, 127 – 138.
- Arora D. K., Bridge P. D., Bhatnagar D. (2004) Handbook of fungal biotechnology, pp. 287 – 289, Marcel Dekker, Inc. NY, USA.
- Babes L., Denizot B., Tanguy G., Le Jeune J. J., Jallet P. (1999) Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: A parametric study. *J. Colloid Interface Sci.* **212**, 474 – 482.
- Bahar T., Celebi S. S. (1999) Immobilization of glucoamylase on magnetic poly(styrene) particles. *J. Appl. Polym. Sci.* **72**, 69 – 73.

- Barredo J. L. (2005) Microbial enzymes and biotransformation, pp. 247 – 271, Humana Press Inc., New Jersey, CA.
- Bayramoğlu G., Yilmaz M., Arica M. Y. (2004) Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: Kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. *Food Chem.* **84**, 591 – 599.
- Bazylnski D. A. (1995) Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* **61**, 337 – 343.
- Bender R., Sukatsch D. A. (1984) Continuous-flow determination of an α -amylase inactivator in fermentation samples using a ferricyanide reagent. *Anal. Biochem.* **137**, 307 – 312.
- Bennett J.W. (2001) Adrenalin and cherry trees. *Mod. Drug Discovery* **4**, 47 – 51.
- Benzerara K., Menguy N. (2009) Looking for traces of life in minerals. *Comptes Rendus Palevol* **8**, 617 – 628.
- Berensmeier S. (2006) Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 495 – 504.
- Bernfeld P. (1955) Amylases, α - and β -. *Methods Enzymology* **1**, 149 – 158.
- Berry C. C., Wells S., Charles S., Curtis A. S. G. (2003) Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: Influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials* **24**, 4551 – 4557.
- Betancor L., López-Gallego F., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Mateo C., Fernández-Lafuente R., Guisán J. M. (2006) Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enz. Microb. Technol.* **39**, 877 – 882.
- Bílková Z., Slováková M., Lyčka A., Horák D., Lenfeld J., Turková J., Churáček J. (2002a) Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly(HEMA-co-EDMA) and magnetic poly(HEMA-co-EDMA) microspheres. *J. Chromatogr. B* **770**, 25 – 34.
- Bílková Z., Slováková M., Lyčka A., Horák D., Lenfeld J., Turková J., Churáček J. (2002b) Enzymes immobilized on magnetic carriers: efficient and selective system for protein modification. *J. Chromatogr. B* **770**, 177 – 181.
- Bisgaard-Frantzen H., Borchert T., Svendsen A., Thellersen M. H., Van Der Zee P. (1995) Amylase variants. WO 95/10603.
- Blakemore R. (1975) Magnetotactic bacteria. *Science* **190**, 377 – 379.
- Blanco Carmona J. G., Juste Picón S., Garcés Sotillos M. (1991) Occupational asthma in bakeries caused by sensitivity to alpha-amylase. *Allergy* **46**, 274 – 276.
- Brayer G. D., Luo Y., Withers, S. G. (1995) The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.* **4**, 1730 – 1742.
- Bruinenberg P. M., Hulst A. C., Faber A., Voogd R. H. (1996) A process for surface sizing or coating of paper. EP 0,690,170 A1.

- Bruno L. M., Coelho J. S., Melo E. H. M., Lima, J. L. (2005). Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 189 – 192.
- Bryjak J. (2003) Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilisation on acrylic carriers. *Biochem. Eng. J.* **16**, 347 – 355.
- Cao L. (2005) Carrier-bound immobilized enzymes - Principles, applications and design, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Cauvain S. P., Young L. (2007) Baked products: Science, technology and practice, pp. 95 – 97, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Ceska M., Birath K., Brown B. (1969) A new and rapid method for the clinical determination of α -amylase activities in human serum and urine. optimal conditions. *Clin. Chim. Acta* **26**, 437 – 444.
- Ceyhan B., Alhorn P., Lang C., Schüler D., Niemeyer C. M. (2006) Semisynthetic biogenic magnetosome nanoparticles for the detection of proteins and nucleic acids. *Small*, **2**, 1251 – 1255.
- Cong L., Kaul R., Dissing U., Mattiasson B. (1995) A model study on Eudragit and polyethyleneimine as soluble carriers of α -amylase for repeated hydrolysis of starch. *J. Biotechnol.* **42**, 75 – 84.
- Cord D.S., Vanhoof K., Hu J., Maesmans G., Hendrickx M., Tabbacq P. (1992) Thermostability of soluble and immobilized α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 396 – 402.
- Crabb W. D., Mitchinson C. (1997) Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends Biotechnol.* **15**, 349 – 352.
- Crabb W. D., Shetty J. K. (1999) Commodity scale production of sugars from starches. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 252 – 256.
- de Cuyper M., Joniau M. (1992) Binding characteristics and thermal behaviour of cytochrome-c oxidase, inserted into phospholipid-coated, magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **16**, 201 – 210.
- de Oliveira P. C., Alves G. M., de Castro H. F. (2000) Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochem. Eng. J.* **5**, 63 – 71.
- Denkbas E. B., Kilicay E., Birlikseven C., Ozturk E. (2002) Magnetic chitosan microspheres: Preparation and characterization. *React. Funct. Polym.* **50**, 225 – 232.
- Dhawale M. R., Wilson J. J., Khachatourians G. G., Ingledew, W. M. (1982) Improved method for detection of starch hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 747 – 750.
- Dupuy G., Hilaire G., Aubry C. (1987) Rapid determination of alpha-amylase activity by use of a new chromogenic substrate. *Clin. Chem.* **33**, 524 – 528.

- Dutta P. K., Ravikumar M. N. V., Dutta J. (2002) Chitin and chitosan for versatile applications. *J. Macromol. Sci. C* **42**, 307 – 354.
- Eldin M. S. M., Schroën C. G. P. H., Janssen A. E. M., Mita D. G., Tramper J. (2000) Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **10**, 445 – 451.
- Ennis M. P., Wisdom G. B. (1991) A magnetizable solid phase for enzyme extraction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **30**, 155 – 164.
- Enpuku K., Inoue K., Soejima K. (2005) Properties of magnetic nanoparticles for magnetic immunoassays utilizing a superconducting quantum interference device. *Jpn. J. Appl. Phys.* **44**, 149 – 55.
- Eriksen S. H., Jensen B., Olsen J. (1998) Effect of N-linked glycosylation on secretion, activity and stability of α -amylase from *Aspergillus oryzae*. *Curr. Microbiol.* **37**, 117 – 122.
- Fang T. Y., Ford C. (1998) Protein engineering of *Aspergillus awamori* glucoamylase to increase its pH optimum. *Protein Eng.* **11**, 383 – 388.
- Fang F. F., Kim J. H., Choi H. J. (2009) Synthesis of core-shell structured PS/Fe₃O₄ microbeads and their magnetorheology. *Polymer* **50**, 2290 – 2293.
- Fernandez-Lafuente R., Rosell C. M., Rodriguez V., Guisan J. M. (1995) Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 517 – 523.
- Fernandez-Saizn P., Ocio M. J., Lagaron J.M. (2006) Film-forming process and biocide assessment of high-molecular-weight chitosan as determined by combined ATR-FTIR spectroscopy and antimicrobial assay. *Biopolymers* **83**, 577 – 83.
- Filipiak M., Fludra K., Gościmińska E. (1996) Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 355 – 364.
- Fingerhut B., Ferzola R., Poock A., Marsh W. H. (1965) A rapid saccharogenic method for the determination of serum amylase. *Clin. Chem.* **11**, 862 – 868.
- Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch Jr. C., Silva C. P., Grossi de Sá M. F. (2000) Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1466 – 1473.
- Fujimoto Z., Takase K., Doui N., Momma M., Matsumoto T., Mizuno H. (1998) Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *J. Mol. Biol.* **277**, 393 – 407.
- Fuwa H. (1954) A new method for microdetermination of α -amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J. Biochem.* **41**, 583 – 603.
- Gao X., Yu K. M. K., Tam K. Y., Tsang S. C. (2003) Colloidal stable silica encapsulated nano-magnetic composite as a novel bio-catalyst carrier. *Chem. Commun.* **24**, 2998 – 2999.

- Gella F. J., Gubern G., Vidal R., Canalias F. (1997) Determination of total and pancreatic α -amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotriose as substrate. *Clin. Chim. Acta* **259**, 147 – 160.
- Goesaert H., Brijs K., Veraverbeke W. S., Courtin C. M., Gebruers K., Delcour J. A. (2005) Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 12 – 30.
- Goesaert H., Slade L., Levine H., Delcour J. A. (2009) Amylases and bread firming – an integrated view. *J. Cereal Sci.* **50**, 345 – 352.
- González C. F., Fariña J. I., Figueroa L. I. C. (2002) A critical assessment of a viscometric assay for measuring *Saccharomycopsis fibuligera* α -amylase activity on gelatinised cassava starch. *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 169 – 175.
- Grootegoed J. A., Lauwers A. M., Heinen W. (1973) Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from *Bacillus caldolyticus*. *Arch. Microbiol.* **90**, 223 – 232.
- Gupta A. K., Gupta M. (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications *Biomaterials* **26**, 3995 – 4021.
- Habibi A. E., Khajeh K., Naderi-Manesh H., Ranjbar B., Nemat-Gorgani M. (2006) Thermostabilization of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by chemical cross-linking. *J. Biotechnol.* **123**, 434 – 442.
- Hansawasdi C., Kawabata J., Kasai T. (2000) α -Amylase inhibitors from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Bioscienc. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1041 – 1043.
- Hebeda R. E., Bowles L. K., Teague W. M. (1991) Use of intermediate temperature stability enzymes for retarding staling in baked goods. *Cereal Foods World* **36**, 618 – 624.
- Hendriksen H. V., Pedersen S., Bisgard-Frantzen H. (1999) A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. WO 99/35325.
- Ho M. F., Whitaker J. R. (1993) Purification and some physical properties of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitors from two experimental cultivars. *J. Food Biochem.* **17**, 15 – 33.
- Hong J., Gong P., Xu D., Dong L., Yao S. (2007) Stabilization of α -chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. *J. Biotechnol.* **128**, 597 – 605.
- Hora J. (1973) Stabilization of *Bacillus subtilis* α -amylase by amino group acylation. *Biochim. Biophys. Acta* **310**, 264 – 267.
- Horák D., Rittich B., Šafář J., Španová A., Lenfeld J., Beneš M. J. (2001). Properties of RNase A immobilized on magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres. *Biotechnol. Progr.* **17**, 447 – 452.

- Horák D., Babič M., Macková H., Beneš M. J. (2007) Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *J. Sep. Sci.* **30**, 1751 – 1772.
- Hu K. J., Hu J. L., Ho K. P., Yeung K. W. (2004) Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydr. Polym.* **58**, 45 – 52.
- Hubbich J. J., Thomas O. R. T. (2002) High-gradient magnetic affinity separation of trypsin from porcine pancreatin. *Biotechnol. Bioeng.* **79**, 301 – 313.
- Húska D., Adam V., Trnková L., Kížek R. (2008) Dependence of adenine isolation efficiency on the chain length evidenced using paramagnetic particles and voltammetry measurements. *J. Magn. Magn. Mater.* **321**, 1474 – 1477.
- Hyeon T., Lee S. S., Park J., Chung Y., Bin Na H. (2001) Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12798 – 12801.
- Chang T. M. S., McIntosh F. C., Mason F. G. (1996) Semipermeable microcapsules: preparation and properties. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **44**, 115 – 119.
- Chang M.-Y., Juang R.-S. (2005) Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan–clay composite immobilized enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 75 – 82.
- Chen Y. H., Liu Y. Y., Lin R. H., Yen F. S. (2008) Characterization of magnetic poly(methyl methacrylate) microspheres prepared by the modified suspension polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **108**, 583 – 590.
- Choi C. J., Dong X. L., Kim B. K. (2001) Characterization of Fe and Co nanoparticles synthesized by chemical vapor condensation. *Scr. Mater.* **44**, 2225 – 2229.
- Chung T.-H., Chang J.-Y., Lee W.-C. (2009) Application of magnetic poly(styrene–glycidyl methacrylate) microspheres for immunomagnetic separation of bone marrow cells. *J. Magn. Magn. Mater.* **321**, 1635 – 1638.
- Igarashi K., Hatada Y., Ikawa K., Araki H., Ozawa T., Kobayashi T., Ozaki K., Ito S. (1998) Improved thermo-stability of a Bacillus α -amylase by deletion of an arginine-glycine residue is caused by enhanced calcium binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 372 – 377.
- Iso M., Shirahase T., Hanamura S., Urushiyama S., Omi S. (1989) Immobilization of enzyme by microencapsulation and application of the encapsulated enzyme in the catalysis. *J. Microencap.* **6**, 165 – 176.
- Iulek J., Franco O. L., Silva M., Slivinski C. T., Bloch Jr. C., Rigden D. J., Grossi de Sá M. F. (2000) Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -

- amylase inhibitor from *Secale cereale* (Rye). *Inter. J. Biochem. Cell Physiol.* **32**, 1195 – 1204.
- Izmailov, A. F., Kiselev, M. V., Vakurov, A. V., Gladilin, A. K., Levashov, A. V. (2000) Alpha-chymotrypsin immobilized on ferromagnetic particles coated with titanium oxide: Production and catalytic properties. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **36**, 68 – 73.
- James J. A. , Lee B. H. (1997) Glucoamylases: Microbial sources, industrial applications and molecular biology – a review. *J. Food Biochem.* **21**, 1 – 52.
- Janeček Š., Baláž S., Rosenberg M., Stredanský M. (1992) Chemical stabilization of *Bacillus subtilis* α -amylase by modification with D-glucono- δ -lactone. *Biotechnol. Tech.* **6**, 173 – 176.
- Jen A. C., Wake M.C., Milos A.G. (1995) Review: hydrogels for cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 357 – 364.
- Jouanin L., Bonade-Bottino M., Girard C., Morrot G., Giband M. (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.* **131**, 1 – 11.
- Kahraman M. V., Bayramoğlu G., Kayaman-Apohan N., Güngör A. (2007) α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chem.* **104**, 1385 – 1392.
- Kara A., Osman B., Yavuz H., Beşirli N., Denizli A. (2005) Immobilization of α -amylase on Cu²⁺ chelated poly(ethylene glycol dimethacrylate-n-vinyl imidazole) matrix via adsorption. *React. Funct. Polym.* **62**, 61 – 68.
- Katchalski-Katzir E., Kraemer D. M. (2000) Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J. Mol. Catal. B – Enzym.* **10**, 157 – 176.
- Kennedy J. F. (1995) Handbook of enzyme technology, Principles of Immobilization of Enzymes, pp. 235, Prentice Hall Ellis Harwood, NY, USA.
- Khajeh K., Naderi-Manesh H., Ranjbar B., Moosavi-Movahedi A. A., Nemat-Gorgani M. (2001) Chemical modification of lysine residues in *Bacillus* alpha-amylases: effect on activity and stability. *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 543 – 549.
- Kim T. U., Gu B. G., Jeong J. Y., Byun S. M., Shin Y. C. (1995) Purification and characterization of a maltotetraose forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus sp.* GM8901. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3105 – 3112.
- Kim M.-J., Lee S.-B., Lee H.-B., Lee S.-Y., Baek J.-S., Kim D., Moon T.-W., Robyt J. F., Park K.-H. (1999) Comparative study of the inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and cyclomaltodextrin glucanotransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine-glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* **371**, 277 – 283.
- Kinoshita H., Usui T., Kaneda Y., Ikeda T. (1992) Amylase assay in human serum using an oligosaccharide dehydrogenase-modified graphite paste electrode containing benzoquinone. *Bunseki Kagaku* **41**, 145 – 149.

- Komeili A. (2007) Molecular mechanisms of magnetosome formation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 351 – 366.
- Kondo A., Urabe T. (1995) Relationships between molecular states (conformation and orientation) and activities of α -amylase adsorbed on ultrafine silica particles. *Appl. Microb. Biotechnol.* **43**, 801 – 807.
- Koneracká M., Kopčanský P., Antalík M., Timko M., Ramchand C. N., Lobo D., Mehta R. V. , Upadhyay R. V. (1999) Immobilization of proteins and enzymes to fine magnetic particles. *J. Magn. Magn. Mater.* **201**, 427 – 430.
- Konieczna-Molenda A., Kochanowski A., Walaszek A., Bortel E., Tomasika P. (2009) Immobilization of α -amylase on poly(vinylamine) and poly(vinylformamide) supports and its performance. *Chem. Eng. J.* **146**, 515 – 519.
- Konsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M. (2006) Thermostable α -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 690 – 696.
- Korecká L., Ježová J., Bílková Z., Beneš M., Horák D., Hradcová O., Slovákova M., Viovy J. L.(2005) Magnetic enzyme reactors for isolation and study of heterogeneous glycoproteins. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 349 – 357.
- Kottwitz B., Upadek H., Carrer G. (1994) Application and benefits of enzymes in detergent. *Chim. Oggi* **10**, 21 – 24.
- Kouassi G., K., Joseph I. (2006) Magnetic and gold-coated magnetic nanoparticles as a DNA sensor. *Anal. Chem.* **78**, 3234 – 3241.
- Laderman K. A., Davis B. R., Krutzsch H. C., Lewis M. S., Griko Y. V., Privalov P. L., Anfinsen C.B. (1993) The purification and characterization of an extremely thermostable alpha-amylase from the hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 24394 – 24401.
- Lagrain B., Leman P., Goesart H., Delcour J. (2008) Impact of thermostable amylases during bread making on wheat bread crumb structure and texture. *Food Res. Int.* **41**, 819 – 827.
- Lamb S. B., Stuckey D. C. (1999) Enzyme immobilisation on colloidal liquid aphrons CLAs: the influence of protein properties. *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 541 – 548.
- Lankisch M., Layer P., Rizza R. A., DiMugno E. P (1998) Acute postprandial gastrointestinal and metabolic effects of wheat amylase inhibitor (WAI) in normal, obese, and diabetic humans. *Pancreas* **17**, 176 – 181.
- Lemarchand C., Gref R., Couvreur P. (2004) Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 327 – 341.
- Lei Z., Bi S., Hu B., Yang H. (2007) Combined magnetic and chemical covalent immobilization of pectinase on composites membranes improves stability and activity. *Food Chem.* **105**, 889 – 896.

- Levitzki A., Steer M. (1974) The allosteric activation of mammalian alpha-amylase by chloride. *Eur. J. Biochem.* **41**, 171 – 180.
- Li Y., Liu Y., Tang J., Lin H., Yao N., Shen X., Deng C. , Yang P., Zhang X. (2007) Fe₃O₄@Al₂O₃ magnetic core-shell microspheres for rapid and highly specific capture of phosphopeptides with mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A* **1172**, 57 – 71.
- Li G.-Y., Jiang Y.-R., Huang K.-L., Ding P., Chen J. (2008) Preparation and properties of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *J. Alloys Compd.* **466**, 451 – 456.
- Liao M. H., Chen D. H. (2001) Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability. *Biotechnol. Lett.* **23**, 1723 – 1727.
- Lim L. H., Macdonald D. G., Hill G. A. (2003) Hydrolysis of starch particles using immobilized barley α -amylase. *Biochem. Eng. J.* **13**, 53 – 62.
- Liu X., Guan Y., Shen R., Liu H. (2005) Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **822**, 91 – 97.
- Liu J. W., Zhang Y., Chen D., Yang T., Chen Z. P., Pan S. Y., Gu N. (2009) Facile synthesis of high-magnetization γ -Fe₂O₃/alginate/silica microspheres for isolation of plasma DNA. *Colloids Surf., A* **341**, 33 – 39.
- López-Gallego F., Betancor L., Mateo C., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Guisán J. M., Fernández-Lafuente R. (2005) Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J. Biotechnol.* **119**, 70 – 75.
- Lorentz K., Gütschow B., Renner F. (1999) Evaluation of a direct alpha-amylase assay using 2-chloro-4-nitrophenyl-alpha-D-maltotriose. *Clin. Chem. Lab. Med.* **37**, 1053 – 1062.
- Lorentz K. (2000) Routine alpha-amylase assay using protected 4-nitrophenyl-1, 4-alpha-D-maltoheptaoside and a novel alpha-glucosidase. *Clin. Chem.* **46**, 644 – 649.
- http://loschmidt.chemi.muni.cz/peg/lecture/biocat_lecture10.pdf , staženo dne 16.3.2010
- van der Maarel M. J.E.C., van der Veen B., Uitdehaag J. C.M., Leemhuis H., Dijkhuizen L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.* **94**, 137 – 155.
- Machius M., Wiegand G., Huber R. (1995) Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **246**, 545 – 559.
- Manrich A., Galvão C. M. A., Jesus Ch. D. F., Giordano R. C., Giordano R. L. C. (2008) Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. *Int. J. Biol. Macromol.* **43**, 54 – 61.
- Mapp C. E. (2001) Agents, old and new, causing occupational asthma. *J. Occup. Environ. Med.* **58**, 354 – 360.
- Marshall J. J., Lauda C. M. (1975) Purification and properties of Phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* **250**, 8030 – 8037.

- Mateo C., Abian O., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M. (2000) Reversible enzyme immobilisation via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 98 – 105.
- Matsuzaki H., Yamane K., Yamaguchi K., Nagata Y., Maruo B. (1974) Hybrid α -amylase produced by transformants of *Bacillus subtilis* I. Immunological and chemical properties of α -amylases produced by the parental strain and the transformants. *Biochim. Biophys. Acta* **365**, 235 – 247.
- Matthews B.W., Nicholson H., Becktel W. J. (1987) Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6663 – 6667.
- McCuin R. M., Bukhari Z., Sobrinho J., Clancy J. L. (2001) Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. *J. Microbiol. Methods* **45**, 69 – 76.
- Melo F. R., Sales M. P., Silva L. S., Franco O. L., Bloch C. Jr., Ary M. B. (1999) α -Amylase from cowpea seeds. *Prot. Pept. Lett.* **6**, 387 – 392.
- Meyer A., Hansen D. B., Gomes C. S. G., Hobley T. J., Thomas O. R. T., Franzreb M. (2005). Demonstration of a strategy for product purification by high-gradient magnetic fishing: Recovery of superoxide dismutase from unconditioned whey. *Biotechnol. Progr.* **21**, 244 – 254.
- Meyers V. C., Reid E. (1933) Studies on animal diastases. III. A comparison of several different methods for the quantitative estimation of diastase in blood. *J. Biol. Chem.* **99**, 595.
- Miguel O. B., Morales M. P., Serna C. J., Veintemillas-Verdaguer S. (2002) Magnetic nanoparticles prepared by laser pyrolysis. *IEEE Trans. Magn.* **38**, 2616 – 2618.
- Mikhaylova M., Kim D. K., Berry C. C., Zagorodni A., Toprak M., Curtis A. S. G., Muhammed M. (2004) BSA immobilization on amine-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem. Mater.* **16**, 2344 – 2354.
- Miller G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426 – 428.
- Mineki S., Yajima H., Goto S., Nakazato K., Ishii T. (2000) Properties of bacterial α -amylase immobilised on alternating acrylonitrile-butadiene copolymer by amidination reaction *Mater. Technol.* **18**, 393 – 399.
- Monshipouri M., Neufeld R. J. (1992) Kinetics and activity distribution of urease coencapsulated with hemoglobin within polyamide membranes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **32**, 111 – 126.
- Morales M. P., González-Carreño T., Ocaña M., Alonso-Sañudo M., Serna C. J. (2000) Magnetic iron oxide/mullite nanocomposite stable up to 1400°C. *J. Solid State Chem.* **155**, 458 – 462.

- Morand P., Biellmann J.-F. (1991) Modification of α -amylase from *Bacillus licheniformis* by the polyaldehyde derived from β -cyclodextrine and α -amylase thermostability. *FEBS Lett.* **289**, 148 – 150.
- Mornet S., Vasseur S., Grasset F., Veverka P., Goglio G., Demourgues A., Portier J., Pollert E., Duguet E. (2006) Magnetic particle design for medical applications. *Prog. Solid State Chem.* **34**, 237 – 247.
- Morton R. L., Schroeder H. E., Bateman K. S., Chrispeels M. J., Armstrong E., Higgins T. J. V. (2000) Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *Proc. Natl Acad. Sci.* **97**, 3820 – 3825.
- Namdeo M., Bajpai S. K. (2009) Immobilization of α -amylase onto cellulose-coated magnetite (CCM) nanoparticles and preliminary starch degradation study. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **59**, 134 – 139.
- Nelson N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375 – 380.
- Neuberger T., Schopf B., Hofmann H., Hofmann M., von Rechenberg B. (2005) Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 483 – 96.
- Nielsen, J. E., Borchert, T. V. (2000) Protein engineering of bacterial amylases. *Biochim. Biophys. Acta* **1543**, 253 – 374.
- Nishiya Y., Hibi T., Oda J. L. (2002) A purification method of the diagnostic enzyme *Bacillus* uricase using magnetic beads and non-specific protease. *Protein Expression Purif.* **25**, 426 – 429.
- Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Hagihara H., Ozaki K., Ltso S., Miki K. (2003) Crystal structure of calcium free alpha amylase from *Bacillus* sp. Strain KSM-K38 (amyK38) and its sodium ion binding sites. *J. Biol. Chemi.* **278**, 24828 – 24824.
- Norris R. D. (1975) Stabilisation of aminoacyl-tRNA synthetase by Sephadex and polyacrylamide gels. *Phytochem.* **14**, 1701 – 1706.
- Odabasi M., Denizli A. (2004) Cibacron blue F3GA incorporated magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for lysozyme adsorption. *J. Appl. Polym. Sci.* **93**, 719 – 725.
- Oikawa A. (1959) The role of calcium in Taka amylase A II. The exchange reaction. *Can. J. Biochem.* **46**, 463.
- Pankhurst Q. A., Connolly J., Jones S. K., Dobson J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, 167 – 181.
- Park J. H., Saravanakumar G., Kim K., Kwon I. C. (2010) Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Delivery Rev.* **62**, 28 – 41.

- Pascal C., Pascal J. L., Favier F., Elidrissi Moubtassim M. L., Payen C. (1999) Electrochemical synthesis for the control of γ -Fe₂O₃ nanoparticle size. Morphology, microstructure, and magnetic behavior. *Chem. Mater.* **11**, 141 – 147.
- Pei W., Kumada H., Natusme T., Saito H., Ishio S. (2007) Study on magnetite nanoparticles synthesized by chemical method. *J. Magn. Magn. Mater.* **310**, 2375 – 2377.
- Pelegri P. B., Murad A. M., Grossi-de-Sa M. F., Mello L. V., Romeiro L. A., Noronha E. F., Caldas R. A., Franco O. L. (2006) Structure and enzyme properties of *Zabrotes subfasciatus* alpha-amylase. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **61**, 77 – 86.
- Peter M. (1995) Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem. A* **32**, 629 – 640.
- Plank C., Anton M., Rudolph C., Rosenecker J., Krötz F. (2003). Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. *Exp. Opin. Biol. Therapy*, **3**, 745–58.
- Prabhune A., SivaRaman H. (1991) Immobilization of penicillin acylase in porous beads of polyacrylamide gel. *App. Biochem. Biotechnol.* **30**, 265 – 272.
- Prioult G., Turcotte C., Labarre L., Lacroix Ch., Fliss I. (2000) Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Int. Dairy J.* **10**, 627 – 633.
- Radu S., Ling O. W., Rusul G., Karim M. I. A., Nishibuchi M. (2001). Detection of *Escherichia coli* O157: H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J. Microbiol. Methods* **46**, 131 – 139.
- Ramachandran S., Patel A., Nampoothiri K. M., Chandran S., Szakacs G., Soccol C.R., Pandey, A. (2004) Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **47**, 309 – 317.
- Ramasubbu N., Paloth V., Luo Y., Brayer G. D., Levine M. J. (1996) Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Å resolution: Implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallog. sect. D* **52**, 435 – 446.
- Ratanakhanokchai K., Kaneko J., Kamio Y., Izaki K. (1992) Purification and properties of a maltotetraose and maltotriose producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2490 – 2494.
- Raviyan P., Tang J. M., Rasco B. A. (2003) Thermal stability of α -amylase from *Aspergillus oryzae* entrapped in polyacrylamide gel. *J. Agri. Food Chem.* **51**, 5462 – 5466.
- Reshmi R., Sanjay G., Sugunan S. (2006) Enhanced activity and stability of α -amylase immobilized on alumina. *Catal. Commun.* **7**, 460 – 465.
- Reshmi R., Sanjay G., Sugunan S. (2007) Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. *Catal. Commun.* **7**, 393 – 399.
- Rinderknecht H., Wilding P., Haverback B. J. (1967). A new method for determination of α -amylase. *Experientia* **23**, 805.

- Rittich B., Španová A., Ohlshenny Y., Lenfeld J., Rudolf I., Horák D., Beneš M. (2002) Characterization of deoxyribonuclease I immobilized on magnetic hydrophilic polymer particles. *J. Chromatogr. B* **774**, 25 – 31.
- Rodrigues D. S., Mendes A. A., Adriano W. S., Goncalves L. R. B., Giordano R. L. C. (2008) Multipoint covalent immobilization of microbial lipasa on chitosan and agarose activated by different methods. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **51**, 100 – 109.
- Šafaříková M., Roy I., Gupta M. N., Šafařík I. (2003) Magnetic alginate microparticles for purification of α -amylases. *J. Biotechnol.* **105**, 255 – 260.
- Šafařík I., Šabatková Z., Tokar O., Šafaříková M. (2007) Magnetic cation exchange isolation of lysozyme from native hen egg white. *Food Technol. Biotechnol.* **45** (2007) 355 – 359.
- Šafařík I., Šafaříková M. (2009) Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. *Chem. Pap.* **63**, 497 – 505.
- Saleh A., Schroeter M., Jonkmanns C., Hartung H.-P., Mödder U., Jander S. (2004) *In vivo* MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke. *Brain* **127**, 1670 – 1677.
- Santra S., Tapeç R., Theodoropoulou N., Dobson J., Hebard A., Tan W. (2001) Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: The effect of nonionic surfactants. *Langmuir* **17**, 2900 – 2906.
- Shan G. B., Xing J. M., Luo M. F., Liu H. Z., Chen J. Y. (2003) Immobilization of *Pseudomonas delafieldii* with magnetic polyvinyl alcohol beads and its application in biodesulfurization. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1977 – 1981.
- Shaw A., Bott R., Day A. G. (1999) Protein engineering of α -amylase for low pH performance. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 349 – 352.
- Shi Y., Ding J., Liu X., Wang J. (1999) NiFe₂O₄ ultrafine particles prepared by coprecipitation/mechanical alloying. *J. Magn. Magn. Mater.* **205**, 249 – 254.
- Shinkai M. (2002) Functional magnetic particles for medical application. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 606 – 613.
- Shubayev V. I., Pisanic II T. R., Jin S. (2009) Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Delivery Rev.* **61**, 467 – 477.
- Schillinger U., Brill T., Rudolph C., Huth S., Gersting S., Krötz F., Hirschberger J., Bergemann C., Plank C. (2005) Advances in magnetofection—magnetically guided nucleic acid delivery. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 501 – 508.
- Schmid R. (1979) Stabilized soluble enzymes. *Adv. Biochem. Eng.* **12**, 41 – 118.
- Schüler H. T., Poppy M. G., Kerry B. R., Denholm L. (1998) Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol.* **16**, 168 – 174.
- Schüler D., Frankel R. B. (1999) Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 464 – 473.

- Schwermann B., Pfau K., Liliensiek B., Schleyer M., Fischer T., Bakker E. P. (1994) Purification, properties and structural aspects of a thermoacidophilic α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009. Insight into acidostability of proteins. *Eur. J. Biochem.* **226**, 981 – 991.
- Somogyi M. (1938) Micromethods for the estimation of diastase. *J. Biol. Chem.* **125**, 399 – 414.
- Srivastava R. A. K. (1984) Studies on extracellular and intracellular purified amylases from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme Microb Technol* **6**, 422 – 426.
- Srivastava R. A. K. (1991) Studies on stabilization of amylase by covalent coupling to soluble polysaccharides. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 164 – 170.
- Suh Y. J., Jang H. D., Chang H., Kim W. B., Kim H.C. (2006) Size-controlled synthesis of Fe–Ni alloy nanoparticles by hydrogen reduction of metal chlorides. *Powder Technol.* **161**, 196 – 201.
- Swanson M. A (1948) Studies on the structure of polysaccharides; relation of the iodine color to the structure. *J. Biol. Chem.* **172**, 825 – 837.
- Tanyolaç D., Yürüksoy B. I., Özdural A. R. (1998) Immobilization of a thermostable α -amylase, Termamyl[®], onto nitrocellulose membrane by Cibacron Blue F3GA dye binding. *Biochem. Eng. J.* **2**, 179 – 186.
- Teotia S., Gupta M. N (2001) Purification of alpha-amylases using magnetic alginate beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **90**, 211 – 220.
- Thomas M., Priest F. G., Stark J. R. (1980) Characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus megaterium sensu stricto*. *J. Gen. Microbiol.* **118**, 67 – 72.
- Treleaven J. G., Ugelstad J., Philip T., Gibson F. M., Rembaum A., Caine G. D., Kemshead J. T. (1984) Removal of neuroblastoma cells from bone marrow with monoclonal antibodies conjugated to magnetic microspheres. *The Lancet* **323**, 70 – 73.
- Tripathi P., Kumari A., Rath P., Kayastha A. M. (2007) Immobilization of α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **49**, 69 – 74.
- Tudorache M., Tencaliec A., Bala C. (2008) Magnetic beads-based immunoassay as a sensitive alternative for atrazine analysis. *Talanta* **77**, 839 – 843.
- Tümtürk H. R., Caykara T., Kantoglu O., Guven O. (1999a) Adsorption of α -amylase on to poly(*N*-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels. *Nuclear Instr. Method Phys. Res., Section B: Beam Interact Mater Atom* **151**, 238 – 241.
- Tümtürk H., Caykara T., Sen M., Guven O. (1999b) Adsorption of α -amylase on to poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels. *Radiat. Phys. Chem.* **55**: 713 – 716.
- Tümtürk H., Aksoy S., Nesrin Hasırcı N. (2000) Covalent immobilization of α -amylase onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(styrene -2-hydroxyethyl methacrylate)

- microspheres and the effect of Ca^{2+} ions on the enzyme activity. *Food Chem.* **68**, 259 – 266.
- Türünç O., Kahraman M. V., Akdemir Z. S., Kayaman-Apohan N., Güngör A. (2009) Immobilization of α -amylase onto cyclic carbonate bearing hybrid material. *Food Chem.* **112**, 992 – 997.
- Urabe I., Nanjo H., Okada, H. (1973) Effect of acetylation of *Bacillus subtilis* α -amylase on the kinetics of heat inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* **302**, 73 – 79.
- Venkatesh P., Sundaram P. V. (1998) Modulation of stability properties of bovine trypsin after in vitro structural changes with a variety of chemical modifiers. *Protein Eng.* **11**, 691 – 698.
- Vijayakumar R., Koltypin Y., Felner I., Gedanken A. (2000) Sonochemical synthesis and characterization of pure nanometer-sized Fe_3O_4 particles. *Mater. Sci. Eng., A* **286**, 101 – 105.
- Villalonga R., Gomez L., Ramirez H. L., Villalonga M. L. (1999) Stabilization of α -amylase by chemical modification with carboxymethylcellulose. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**, 635 – 638.
- Vinšová J., Vavříková E. (2007) Farmaceutické aplikace chitosanu. *Chem. Listy* **101**, 56 – 65.
- Vinšová J., Vavříková E. (2008) Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 1311 – 1326.
- Walde P., Ichikawa S. (2001) Enzymes inside lipid vesicles. Preparation reactivity and applications. *Biomol. Eng.* **18**, 143 – 177.
- Wang J., Deng T., Lin Y., Yang C., Zhan W. (2008) Synthesis and characterization of CoFe_2O_4 magnetic particles prepared by co-precipitation method: Effect of mixture procedures of initial solution. *J. Alloys Compd.* **450**, 532 – 539.
- Weselake R. J., MacGregor A. W., Hill R. D. (1983) An endogenous α -amylase inhibitor in barley kernel. *J. Plant Physiol.* **72**, 809 – 812.
- Widjojoatmodjo M. N., Fluit A. C., Torensma R., Verhoef J. (1993) Comparison of immunomagnetic beads coated with protein A, protein G, or goat anti-mouse immunoglobulins Applications in enzyme immunoassays and immunomagnetic separations. *J. Immunol. Methods* **165**, 11 – 19.
- Wong D. W. S. (1995) Food enzyme : Structure and mechanism, pp. 37 – 84, Chapman and Hall. NY, USA.
- Xu X., Wang J., Yang C., Wu H., Yang F. (2009) Sol-gel formation of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanocomposites: Effects of different iron raw material. *J. Alloys Compd.* **468**, 414 – 420.
- Yamagata H., Kunimatsu K., Kamasaka H., Kuramoto T., Iwasaki T. (1998) Rice bifunctional α -amylase/ subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 978 – 985.

- Yamaguchi M., Kanemaru M., Kanemori T., Mizuno Y. (2003) Flow-injection-type biosensor system for salivary amylase activity. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 835 – 840.
- Yamaguchi M., Deguchi M., Wakasugi J. (2005) Flat-chip microanalytical enzyme sensor for salivary amylase activity. *Biomed. Microdevices* **7**, 295 – 300.
- Yang Y. G., Chase H. A. (1998) Immobilisation of α -amylase on poly(vinyl alcohol)-coated perfluoropolymer supports for use in enzyme reactors. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**, 145 – 154.
- Yang K., Peng H., Wen Y., Li N. (2010) Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **256**, 3093-3097
- Yoshikawa H., Kotaru M., Tanaka C., Ikeuchi T., Kawabata M. (1999) Characterization of kintoki bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor: inhibitory activities against human salivary and porcine pancreatic α -amylase and activity changes by proteolytic digestion. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **45**, 797 – 802.
- Zajoncová L., Jílek M., Beranová V., Peč P. (2004) A biosensor for the determination of amylase activity. *Biosens. Bioelectron* **20**, 240 – 245.
- Zhang Y., Kohler N., Zhang M. (2002) Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **23**, 1553 – 1561.
- Zhi J., Wang Y., Lu Y., Ma J., Luo G. (2006) In situ preparation of magnetic chitosan/Fe₃O₄ composite nanoparticles in tiny pools of water-in-oil microemulsion. *React. Funct. Polym.* **66**, 1552 – 1558.
- Zhong Z. C., Cheng R. H., Bosley J., Dowben P. A., Sellmyer D. J. (2001) Fabrication of chromium oxide nanoparticles by laser-induced deposition from solution. *Appl. Surf. Sci.* **181**, 196 – 200.
- Zou C-S., Zhou M., Xie G.-M., Luo P., Xiong X.-L., Xu H.-J., Zheng J. (2008) Preparation of disposable saliva α -amylase biosensor. *Chin. J. Anal. Chem.* **36**, 1217 – 1220.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
APS	persíran amonný
Asn	asparagin
Asp	aspartát
BCA	kyselina bicinchoninová
BIS	bisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DNSA	kyselina dinitrosalicylová
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPS	4,6-ethyliden-p-nitrofenyl- α -d-maltoheptaosid
Glu	glutamát
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HFS	vysokoobsahový fruktosový sirup
His	histidin
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
kDa	kilodalton
Leu	leucin
MALDI	laserová ionizace a desorpce za účasti matrice
Met	methionin
M_r	molekulová hmotnost
MRI	zobrazování magnetickou resonancí
MS	hmotnostní spektrometrie
NHS	n-hydroxysukcinimid
R_f	retenční faktor
SA	kyselina sinapová
SDS	dodecylsulfát sodný
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SPION	superparamagnetické nanočástice oxidu železa
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
Thr	threonin
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)methylamin