

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Imobilizace  $\beta$ -galaktosidasy na magnetické celulosové  
mikročástice**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Lenka Kabrdová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	31.7.2012

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

V Olomouci dne 31.7.2012

.....

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. za odborné rady a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat členům katedry Biochemie. Poděkování patří také mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Lenka Kabrdová
Název práce	Imobilizace $\beta$ -galaktosidasy na magnetické celulosové mikročástice
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá imobilizací <math>\beta</math>-galaktosidasy na magnetické mikročástice modifikované celulosou. Teoretická část pojednává o <math>\beta</math>-galaktosidase, jejím výskytu a vlastnostech (struktura, chemické reakce, substrátová specifita, inhibice, purifikace a metody stanovení aktivity). Dále se zabývá procesem imobilizace a jeho metodami (adsorpce, zachycení, enkapsulace, zesíťování, kovalentní vazba, bioafinita). Poslední kapitola teoretické části pojednává o nosičích, jejich rozdělení, typy a vlastnosti.</p> <p>Praktická část je soustředěna na imobilizaci <math>\beta</math>-galaktosidasy na magnetické mikročástice modifikované celulosou. Imobilizací byly změněny vlastnosti <math>\beta</math>-galaktosidasy. Tyto změny byly srovnány s volnou formou <math>\beta</math>-galaktosidasy. Byla stanovena vazebná kapacita <math>\beta</math>-galaktosidasy na nosiči. Stanovení stability volné i imobilizované formy <math>\beta</math>-galaktosidasy bylo uskutečněno spektrofotometrickou metodou s 2-nitrophenyl <math>\beta</math>-D-galaktopyranosidem. Bylo stanoveno pH optimum, teplotní stabilita, funkční stabilita, skladovací stabilita, Michaelisova konstanta a operační stabilita.</p>
Klíčová slova	$\beta$ -galaktosidasa, imobilizace, mikročástice
Počet stran	79
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Lenka Kabrdová
Title	Immobilization of $\beta$ -galactosidase onto magnetic cellulose microparticles
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2012
Abstract	<p>This work deals with immobilization of <math>\beta</math>-galactosidase on magnetic microparticles modified by cellulose. The theoretical part deals with the <math>\beta</math>-galactosidase, its occurrence and properties (structure, chemical reactions, substrate specificity, inhibition, purification and methods of determination activity). It also deals with the process of immobilization and its methods (adsorption, capture, encapsulation, cross-linking, covalent binding, bioaffinity). The last chapter of the theoretical part is focused on the supports, its distribution, types and properties.</p> <p>The practical part is focused on <math>\beta</math>-galactosidase immobilization on magnetic microparticles modified by cellulose. The properties of <math>\beta</math>-galactosidase were changed by immobilization. These changes were compared with the free form of <math>\beta</math>-galactosidase. The weighted capacity of <math>\beta</math>-galactosidase was determined. Determination of the stability of free and immobilization forms of <math>\beta</math>-galactosidase was carried out by the spectrophotometric method with 2-nitrophenyl <math>\beta</math>-D-galactopyranoside. pH optimum, thermal stability, functional stability, storage stability, the Michaelis constant and operational stability were determined.</p>

Keywords	$\beta$ -galactosidase, immobilization, microparticles
Number of pages	79
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

1	CÍLE PRÁCE .....	- 9 -
2	ÚVOD .....	- 10 -
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	- 11 -
3.1	$\beta$ -GALAKTOSIDASA.....	- 11 -
3.1.1	Výskyt $\beta$ -galaktosidasy .....	- 11 -
3.1.2	Vlastnosti $\beta$ -galaktosidasy .....	- 14 -
3.1.2.1	Struktura.....	- 14 -
3.1.2.2	Chemické reakce katalyzované $\beta$ -galaktosidasou.....	- 17 -
3.1.2.3	Substrátová specifita .....	- 18 -
3.1.2.4	Inhibice $\beta$ -galaktosidasy .....	- 19 -
3.1.2.5	Purifikace .....	- 20 -
3.1.2.6	Metody stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy.....	- 21 -
3.2	IMOBILIZACE.....	- 21 -
3.2.1	Metody imobilizace.....	- 22 -
3.2.1.1	Adsorpce na nerozpustné materiály .....	- 22 -
3.2.1.2	Zachycení v polymerních gelech .....	- 23 -
3.2.1.3	Enkapsulace v membránách.....	- 23 -
3.2.1.4	Chemické zesíťování.....	- 24 -
3.2.1.5	Kovalentní vazba na nerozpustný nosič.....	- 24 -
3.2.1.6	Bioafinita.....	- 25 -
3.2.2	Uplatnění imobilizované $\beta$ -galaktosidasy .....	- 25 -
3.2.2.1	Hydrolýza laktosy v mléku .....	- 26 -
3.2.2.2	Galakto-oligosacharidy .....	- 26 -
3.2.2.3	Hydrolýza syrovátky .....	- 27 -
3.3	NOSIČE .....	- 27 -
3.3.1	Poréznost nosičů .....	- 29 -
3.3.2	Organické nosiče.....	- 29 -
3.3.2.1	Želatina a agarosa.....	- 29 -
3.3.2.2	Celulosa.....	- 30 -
3.3.2.3	Syntetické polymerní nosiče .....	- 30 -
3.3.2.4	Bavlněná tkanina.....	- 31 -
3.3.2.5	Konkavalin .....	- 32 -

3.3.3	Anorganické nosiče.....	- 32 -
3.3.3.1	Nanočástice a mikročástice.....	- 32 -
3.3.3.1.1	Příprava nanočástic a mikročástic.....	- 33 -
3.3.3.1.2	Modifikace nanočástic a mikročástic.....	- 35 -
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 37 -
4.1	MATERIÁLY.....	- 37 -
4.2	PŘÍSTROJE.....	- 37 -
4.3	METODY.....	- 38 -
4.3.1	Složení a vlastnosti používaných mikročástic.....	- 38 -
4.3.2	Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy.....	- 38 -
4.3.3	Imobilizace $\beta$ -galaktosidasy.....	- 39 -
4.3.4	Stanovení vazebné kapacity $\beta$ -galaktosidasy.....	- 40 -
4.3.5	Kontrola aktivity $\beta$ -galaktosidasy.....	- 41 -
4.3.6	Stanovení pH optima $\beta$ -galaktosidasy.....	- 41 -
4.3.7	Stanovení termostability $\beta$ -galaktosidasy.....	- 42 -
4.3.8	Stanovení funkční časové stability.....	- 43 -
4.3.9	Stanovení stability při skladování.....	- 43 -
4.3.10	Stanovení Michaelisovy konstanty $\beta$ -galaktosidasy.....	- 44 -
4.3.11	Stanovení operační stability $\beta$ -galaktosidasy.....	- 44 -
5	LITERATURA.....	- 46 -
6	SEZNAM ZKRATEK.....	- 64 -



# 1 CÍLE PRÁCE

## **Teoretická část**

Vypracování literární rešerše na téma:

Charakterizace  $\beta$ -galaktosidasy

Použití různých typů nosičů pro imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy

Využití imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy v biotechnologických procesech

## **Praktická část**

Imobilizace  $\beta$ -galaktosidasy na magnetické mikročástice modifikované celulosou

Charakterizace enzymu na nosiči za různých fyzikálně-chemických podmínek (pH, teplota, čas)

## 2 ÚVOD

$\beta$ -galaktosidasa E.C. 3.2.1.23. je enzym patřící do enzymové třídy hydrolas. Katalyzuje hydrolýzu 1,4- $\beta$ -D-galaktosidové vazby.  $\beta$ -galaktosidasa je schopná dvou katalytických aktivit. Katalyzuje transglykosylaci a hydrolýzu laktosy na galaktosu a glukosu. Nachází se v rostlinách, živočiších a mikroorganismech. Struktura  $\beta$ -galaktosidasy z různých organismů se liší. Nejlépe prostudovaným modelem je  $\beta$ -galaktosidasa získaná z bakterie *Escherichia coli*.  $\beta$ -galaktosidasy z mikroorganismů mají nejvýhodnější vlastnosti (termoacidofilitu, termostabilitu, termorezistentní vlastnosti), proto jsou nejvíce využívány jako zdroje  $\beta$ -galaktosidasy pro laboratorní i průmyslové aplikace.  $\beta$ -galaktosidasu lze využít k hydrolýze laktosy v mléčných výrobcích v potravinářském průmyslu. Význam spočívá v odstranění laktosy, která je pro velkou část populace nestravitelná, a proto je častou příčinou zažívacích problémů. Dále má  $\beta$ -galaktosidasa využití v hydrolýze syrovátky vznikající jako vedlejší produkt při výrobě sýrů. Surovátka byla dříve vypouštěna jako odpadní produkt do vodního prostředí. Také se  $\beta$ -galaktosidasa využívá ke tvorbě zdraví prospěšných galakto-oligosacharidů.

Pro efektivní využití  $\beta$ -galaktosidasy se používá její imobilizovaná forma. Imobilizace enzymů většinou poskytuje výhody v enzymových vlastnostech, lepší stabilitu, specifitu a selektivitu. Také poskytuje provozní výhody zahrnující znovuužití enzymu, okamžité ukončení reakce a snadnou separaci enzymu od produktu u magnetických nosičů pomocí vnějšího magnetického pole, kontinuální provozní režim a snížené náklady na provoz.

Pro imobilizaci enzymů se používají nosiče. Nosičů bylo popsáno mnoho, ale pro každé použití je třeba vybrat tu nejvhodnější variantu. Nosiče lze rozdělit podle různých kritérií, například tvaru, porézności, povahy látky (organické a anorganické) a zdroje (přírodní a syntetické). V této práci byly využity magnetické mikročástice povrchově upravené celulosou, jejichž výhodou je snadná manipulace pomocí vnějšího magnetického pole a vysoká porézność.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 $\beta$ -GALAKTOSIDASA

Pro  $\beta$ -galaktosidasu se používá více názvů,  $\beta$ -D-galaktosid galaktohydrolasa,  $\beta$ -D-galaktohydrolasa, laktasa nebo galaktosyltransferasa (Zarate a Lopez-Leiva, 1990) (Soydan, 2006).  $\beta$ -galaktosidasu se řadí s kódem 3.2.1.23 do enzymové třídy hydrolas, katalyzující hydrolýzu 1,4- $\beta$ -D-galaktosidové vazby, kterou obsahují laktosa, oligosacharidy a polysacharidy (Park et al., 2010a). Konkrétní příklad je štěpení laktosy na glukosu a galaktosu, které se využívá v potravinářském průmyslu. (Husain et al., 2011). Další vlastností  $\beta$ -galaktosidasu je katalýza transglykosylačních reakcí (Juers et al., 2001).  $\beta$ -galaktosidasa byla poprvé zmíněna v literatuře v roce 1889 profesorem Beijerinckem (Rouwenhorst et al., 1989).  $\beta$ -galaktosidasa má historický význam, protože byla využita k důkazu, že genovou expresi lze regulovat (Jakob et al., 1961).  $\beta$ -galaktosidasa je významným enzymem pro výzkum a aplikace v oblastech potravinářského průmyslu, bioremediace nebo diagnostice a léčbě poruch (Asraf et al., 2007).

#### 3.1.1 Výskyt $\beta$ -galaktosidasu

$\beta$ -galaktosidasu se hojně nacházejí v přírodě. Zdroje  $\beta$ -galaktosidasu jsou rostliny, živočichové a mikroorganismy. Příkladem rostlinných zdrojů jsou mandle, vojtěška, semena sójových bobů a káva. Živočišnou  $\beta$ -galaktosidasu lze získat například ze šneků, králíků nebo telat.  $\beta$ -galaktosidasa byla objevena také ve slinách člověka (Wallenfels a Malhotra, 1960; Heilskov, 1951), nebo lysozomech endotelových buněk pupeční žíly (Kurz et al., 2000). Mikroorganismy se ukazují jako nejlepší zdroj z hlediska termostability, termoacidofility a termorezistentních vlastností mikrobiální  $\beta$ -galaktosidasu (Asraf et al., 2010) a výhody poskytují i díky snadnému ovládnutí, vyšší rychlosti množení a vysoké výtěžnosti produkce (Panesar et al., 2006). Mikrobiální zdroje enzymu lze rozdělit na bakterie, kvasinky a houby.

Bakteriální  $\beta$ -galaktosidasy jsou většinou intracelulární (Soydan, 2006). Dobře studovaným zdrojem  $\beta$ -galaktosidasy je *Escherichia coli*. Enzym z této bakterie není obecně považován za bezpečný pro použití v potravinářském průmyslu, lze ho však použít pro analytické účely (Panesar et al., 2006; Siso, 1996). Zdrojem  $\beta$ -galaktosidasy mohou být psychofilní bakterie vyskytující se v oblastech s průměrnou roční teplotou nižší než 5 °C (polární oblasti, vysoké hory nebo hluboké oceány). Tyto bakterie obsahují enzymy schopné katalyzovat reakce při teplotách okolo 0 °C, což je výhodné pro biotechnologické postupy. Příkladem zdroje na chlad adaptované  $\beta$ -galaktosidasy je gram-negativní bakterie *Pseudoalteromonas*, vyskytující se v Antarktidě (Cieślinski et al., 2005). Jako zdroj mohou sloužit také termofilní bakterie jako je například *Streptococcus thermophilus*.  $\beta$ -galaktosidasa získaná z této bakterie vykazuje vysokou stabilitu v širokém rozsahu teplot 25-40°C při hodnotách pH v rozmezí 6,5 až 7,5 (Rhim et al., 2010). Mezi termofilní bakterie se dále řadí *Thermoanaerobium* (Ulezlo et al., 2001), *Stearothermophilus Geobacillus* (Graig, 2010).

Kvasinky jsou z průmyslového hlediska dalším velmi důležitým zdrojem  $\beta$ -galaktosidasy. Důvodem je bezpečnost pro použití v potravinářském průmyslu a neutrální pH optimum, které je vhodné pro hydrolýzu laktosy v mléce (Panesar et al., 2010). Nejčastěji využívaným kmenem kvasinek pro produkci  $\beta$ -galaktosidasy je *Kluyveromyces lactis*, jehož přirozené stanoviště je mléčné prostředí (Kim et al., 2004). Další kvasinkové zdroje jsou *Kluyveromyces fragilis* (Ladero et al., 2006), *Sporobolomyces singularis* (Ishikawa et al., 2005).

Houby jsou zdrojem s vyšší výtěžností  $\beta$ -galaktosidasy, která je extracelulární a vykazuje celkovou stabilitu (Soydan, 2006). Houby produkují  $\beta$ -galaktosidasy s pH optimumm v kyselé oblasti, a proto jsou vhodné ke zpracování kyselých produktů, jako jsou například syrovátky vznikající jako vedlejší produkt při výrobě sýrů nebo tvarohů (Finocchiaro et al., 1980; Joshi et al., 1989). Typickým zástupcem houbového zdroje  $\beta$ -galaktosidasy je *Aspergillus niger* (Hatzinikolaou et al., 2005a) nebo *Aspergillus oryzae* (Haider et al., 2007). V Tab. 1 je uveden přehled mikrobiálních zdrojů  $\beta$ -galaktosidasy.

Zdrojem  $\beta$ -galaktosidasy mohou být rekombinantní mikroorganismy, které mají určité výhody oproti geneticky nemodifikovaným mikroorganismům.  $\beta$ -galaktosidasa *Aspergillus oryzae*, sekretována buňkami vložkovitého kmene *Saccharomyces cerevisiae*, vykazovala aktivitu srovnatelnou s aktivitou enzymů z hub, ale její výhodou je vyšší čistota, která minimalizuje proces purifikace. Využití tohoto enzymu je

v hydrolýze syrovátky, kdy je sekretován enzym a současně produkován ethanol (Domingues et al., 2002).

**Tab. 1 Přehled mikrobiálních zdrojů  $\beta$ -galaktosidasy získané z hub, kvasinek a bakterií (Panesar et al., 2006)**

Zdroj	Mikroorganismy
Houby	<i>Aspergillus foetidus</i> , <i>A. fonsecaeus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. carbonarius</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Curvularia inaequalis</i> <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Penicillium conescens</i> , <i>P. chrysogenum</i> <i>Rhizobium meliloti</i> <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> <i>Scopulariopsis sp.</i> <i>Streptomyces violaceus</i> <i>Trichoderma reesei</i>
Kvasinky	<i>Bullera singularis</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Saccharomyces anamensis</i> , <i>S. fragilis</i> <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> , <i>K. fragilis</i> , <i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i>
Bakterie	<i>Arthrobacter sp.</i> <i>Bacillus acidocaldarius</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. stearothermophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. infantis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. thermosulfurogens</i> <i>Corynebacterium murisepticum</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>E. cloaceae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. thermophilus</i> <i>Leuconostoc citrovorum</i> <i>Pediococcus acidilacti</i> , <i>P. pento</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> <i>Thermus rubus</i> , <i>T. aquaticus</i> , <i>T. thermophilus</i> <i>Vibrio cholera</i>

### 3.1.2 Vlastnosti $\beta$ -galaktosidasy

Enzymy izolované z mikrobiálních zdrojů, kvasinek, hub a bakterií, mají odlišné vlastnosti, proto se využívají v různých aplikacích.  $\beta$ -galaktosidasy získané z hub mají pH optimum v rozsahu 3-5 a teplotní optimum od 55 do 60 °C s omezeným využitím velmi kyselých produktů a farmaceutických preparátů. Kvasinkové  $\beta$ -galaktosidasy mají neutrální pH optimum a vykazují vyšší aktivity než enzymy z hub. Jejich omezení vyplývá z teplotního optima 30-37 °C, tudíž i nízké teplotní stability. Teplota, při níž se inaktivují, se pohybuje okolo 48 °C (Ustok et al., 2010).  $\beta$ -galaktosidasy získané z hub jsou vhodnější pro kyselou hydrolýzu syrovátky než kvasinkové enzymy díky termostabilitě, ale jsou více citlivé na inhibici produktem galaktosou (Roy a Gupta, 2003; Hatzinikolaou et al., 2005b).

#### 3.1.2.1 Struktura

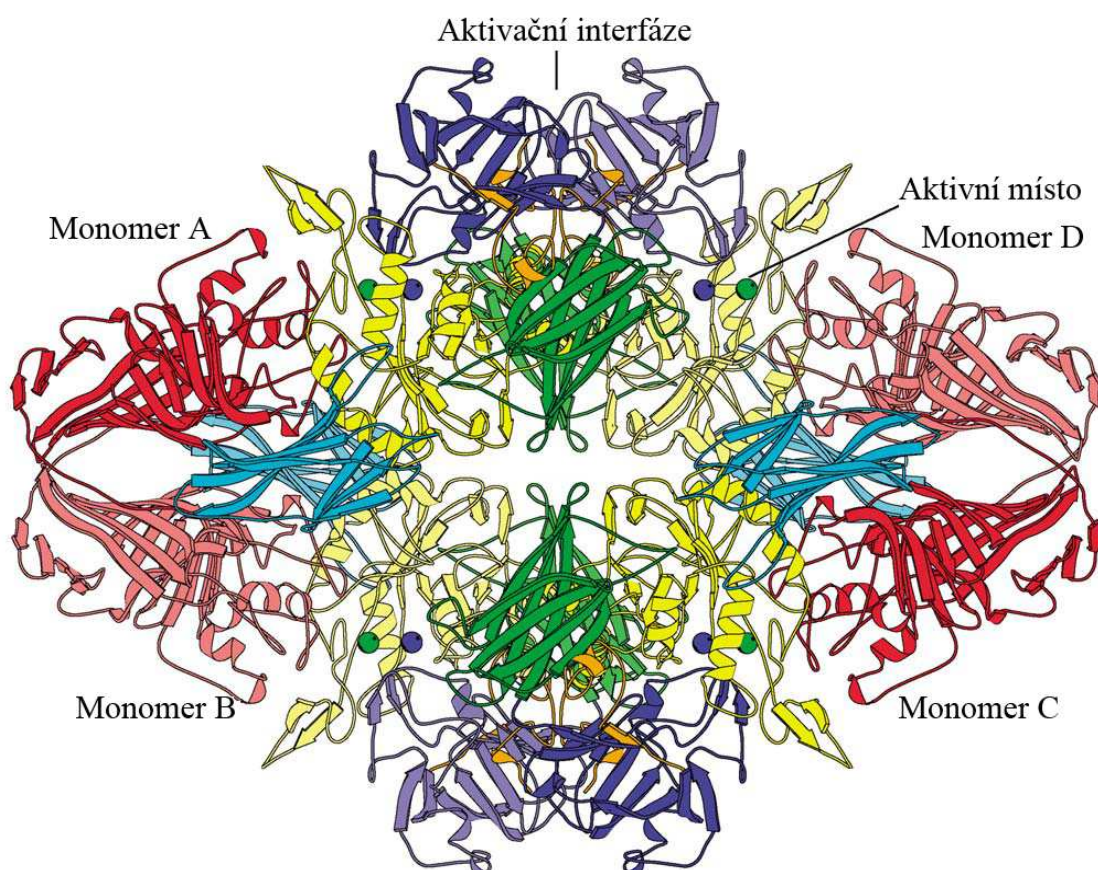
$\beta$ -galaktosidasy z různých organismů se strukturně liší. Bakteriální  $\beta$ -galaktosidasy jsou převážně tetramery nebo monomery a jsou mnohem větší, než rostlinné enzymy, u kterých převažuje struktura dimeru (Marchesi et al., 1969; Simos et al., 1989). Nejlépe prostudovanou strukturou je  $\beta$ -galaktosidasa získaná z bakterie *Escherichia coli*.  $\beta$ -galaktosidasa je homotetramer s molekulovou hmotností 464 kDa, ve kterém jsou čtyři polypeptidové řetězce (A, B, C, D) uskupeny okolo tří vzájemně kolmých dvojnásobných os symetrie (Juers et al., 2000). Každý řetězec je složený z 1023 aminokyselin a vytváří pět po sobě následujících číselně označovaných domén s rozšířeným segmentem na terminální aminokyselině. Tyto domény jsou poměrně rozšířeny a přispívají k aktivačnímu rozhraní, které odpovídá  $\alpha$ -komplementaci peptidu (Jacobson et al., 1994). V doméně 3 se nachází TIM barel (Juers et al., 2000). TIM barel je protein, který je složen z osmi paralelních  $\beta$  listů ve vnitřní části proteinu obklopených osmi  $\alpha$  hélixy (Hocker et al., 2001). TIM barel obsahuje aktivní místo skládající se z C-terminálního konce  $\beta$  listů a reziduí pocházejících z  $\beta$ / $\alpha$  smyček, které spojují  $\beta$  listy s  $\alpha$  hélixy. Zbylá struktura barelu je důležitá pro konformační stabilitu (Urfer a Kirschner., 1992). Do aktivního místa také zasahují smyčky ze sousedních monomerů přes aktivační rozhraní. Dochází ke vzájemnému darování a přijímání smyček mezi monomery A a D, B a C, čímž se vytvoří čtyři aktivní místa, která působí nezávisle na sobě. Samotný monomer aktivní není, protože aktivní místo je vždy

tvořeno ze dvou monomerů (Matthews, 2005). Přítomnost nízkomolekulárních alkoholů (methanol, ethanol, i-propyl alkohol, n-propyl alkohol) v koncentracích do 5 % zvyšuje aktivitu  $\beta$ -galaktosidasy (<http://www.usbio.net/item/G1041-05>) stejně jako přítomnost hořečnatých nebo manganatých iontů (Rhimi et al., 2010). Hořečnaté ionty se vážou do aktivního místa v krystalové i nativní formě enzymu (Jacobson et al., 1994; Juers et al., 2000). Hořečnatý iont v aktivním místě je vázán Glu-416, His-418, Glu-461 a třemi molekulami vody. V aktivním místě se také váže sodný iont, který je důležitý pro funkci enzymu, protože vytváří interakce s hydroxylovou skupinou substrátu.  $\beta$ -galaktosidasa ztratila rychle aktivitu v deionizované vodě (Cavaille a Combes, 1995).

$\beta$ -galaktosidasa je glykosidasa s dvoukrokovým mechanismem. Glu-461 je acidobazický katalyzátor, Glu-537 působí jako nukleofil (Jancewicz et al., 2012). Katalytická aktivita spočívá ve vytvoření kovalentního spojení galaktosylového meziprojektu s Glu-537, zahrnující navázání substrátu mělkými a hlubokými způsoby (Matthews, 2005). Mělký způsob znamená navázání výchozího substrátu na Trp-999 v blízkosti povrchu aktivního místa (Jancewicz et al., 2012). Naproti tomu meziprojekt, analogy přechodového stavu a produkt galaktosa pronikají hlouběji do aktivního místa. Během reakce dochází k důležitým konformačním změnám. Vazba meziprojektu a analoga přechodového stavu je spojená s konformační změnou 794-804 smyčky z domény 5, která se přiblíží k aktivnímu místu (Matthews 2005). Smyčka enzymu je otevřená, když není navázaný ligand a nebo když je navázaný substrát či substrátový analog. Uzavřená smyčka je v případě přechodného stavu (Jancewicz et al., 2012). Již dříve bylo zjištěno, že smyčka hraje klíčovou roli v aktivitě  $\beta$ -galaktosidasy (Langridge, 1968; Jancewicz et al., 2012). Struktura  $\beta$ -galaktosidasy *E. coli* je znázorněna na Obr. 1.

$\beta$ -galaktosidasy se na základě funkční podoby rozdělují do čtyř glykosyl hydrolasových rodin 1, 2, 35 a 42 (Cantarel et al., 2009). Enzymy eukaryotických organismů patří do rodiny 35. Výjimkou jsou  $\beta$ -galaktosidasy z *Kluyveromyces lactis* a *K. marxianus*, které se řadí do rodiny 2 společně s *Escherichia coli* a *Athrobacter sp.* (Pereira-Rodríguez et al., 2012). Struktura  $\beta$ -galaktosidasy *Kluyveromyces lactis* je homologická s typem *Escherichia coli* ze 48 %. Podjednotka  $\beta$ -galaktosidasy z *K. lactis* se stejně jako u *E. coli* skládá do pěti domén, ale domény 2 a 3 jsou odlišné a charakteristické pro  $\beta$ -galaktosidasu z *K. lactis*. Dva dlouhé inserty v doméně 2 (264-274) a doméně 3 (420-443) pravděpodobně souvisí s oligomeraací a specifitou  $\beta$ -galaktosidasy z *K. lactis*. V každém dimeru na rozhraní se nachází dvě aktivní místa

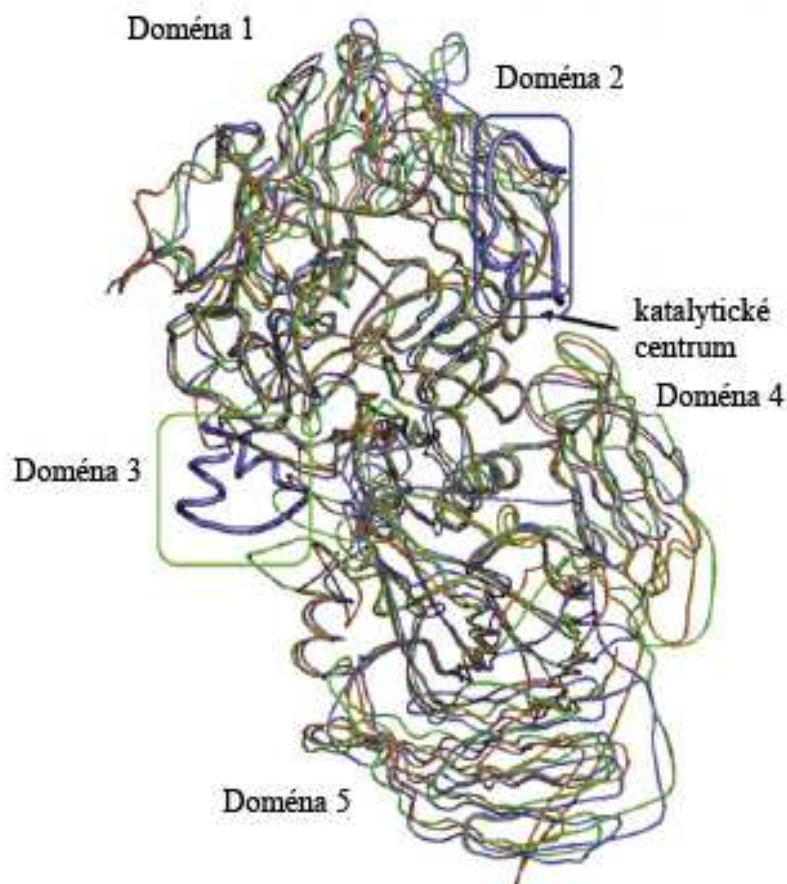
tvořící kapsu pomocí úzkého kanálu. Do tohoto kanálu vyčnívá specifický insert 420-433, který se váže s aglykonem ukotvené laktosy, způsobující vysokou afinitu k substrátu, čímž by se dala vysvětlit vysoká hydrolytická aktivita *K. lactis*  $\beta$ -galaktosidasy (Pereira-Rodríguez et al., 2012). Na Obr. 2 je znázorněna rozdílná struktura  $\beta$ -galaktosidasy z *K. lactis* a *E. coli*.



**Obr. 1** Struktura  $\beta$ -galaktosidasy z *E. coli*

Barvami jsou označeny jednotlivé části struktury. Komplementační peptid – oranžová, doména 1 – modrá, doména 2 – zelená, doména 3 – žlutá, doména 4 – fialová, doména 5 – červená. Pomocí světlejšího a tmavšího odstínu dané barvy je rozlišena stejná doména v různých podjednotkách. V aktivních místech jsou zobrazeny kationty sodné – zelená kulička, hořečnaté – modrá kulička (upraveno podle Juers et al., 2000).



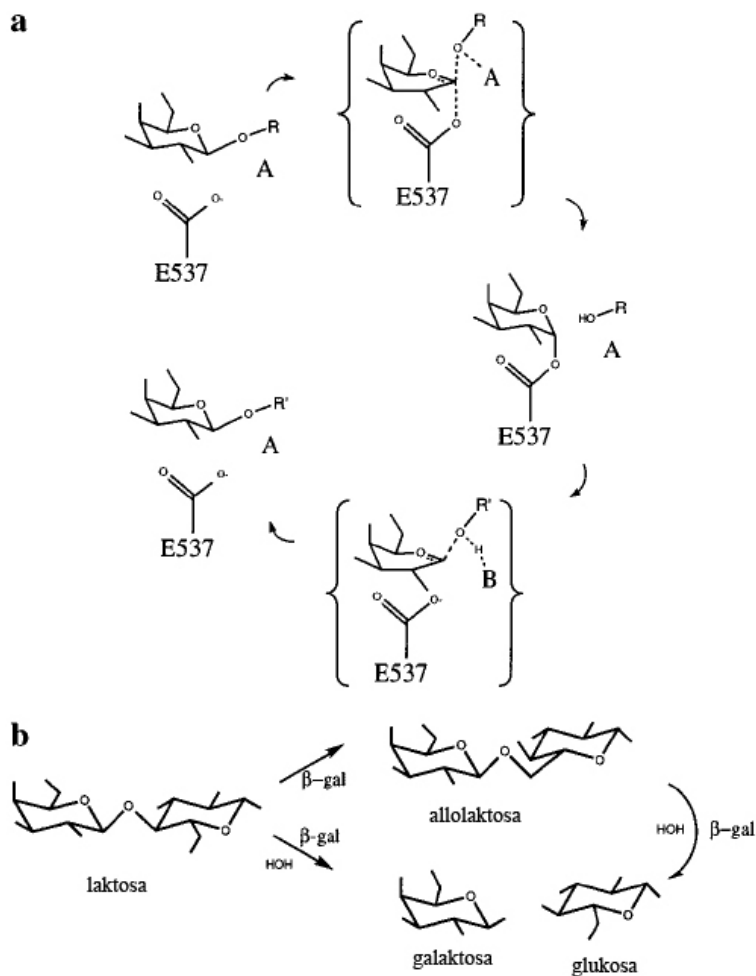


**Obr. 2 Rozdílná struktura  $\beta$ -galaktosidasy z *K. lactis* a *E. coli***

Struktury  $\beta$ -galaktosidasy *K. lactis* (znázorněno modře) a *E. coli* (znázorněno oranžově) jsou zakresleny v zákrytu. Specifické inserty  $\beta$ -galaktosidasy *K. lactis* v doměně 2 a 3 jsou vyznačeny (upraveno podle Pereira-Rodríguez et al., 2012).

### 3.1.2.2 Chemické reakce katalyzované $\beta$ -galaktosidasou

$\beta$ -galaktosidasa má dvě katalytické aktivity. Katalyzuje hydrolýzu laktosy na galaktosu a glukosu a dále katalyzuje transglykosylaci. Transglykosylací se převádí laktosa na disacharid allolaktosu, což je přirozený induktor pro *lac* operon (Juers et al., 2001; Matthews, 2005). Transglykosylace je rozdělena na dvě části, galaktosylaci a degalaktosylaci, kde akceptorem je voda, nebo transgalaktosylaci, kde akceptorem je například glukosa nebo methanol (Jancewicz et al., 2012). Na Obr. 3 je schéma reakcí katalyzovaných  $\beta$ -galaktosidasou.



**Obr. 3 Schéma reakcí katalyzovaných  $\beta$ -galaktosidasou**

$\beta$ -galaktosidasa katalyzuje hydrolýzu laktosy na galaktosu a glukosu a). Nebo katalyzuje přeměnu laktosy na allolaktosu b). V první části substrát  $\beta$ -D-galaktopyranosid s aglykonem OR vytvoří kovalentní  $\alpha$ -D-galaktosyl intermediát s nukleofilem Glu-537 za kyselá katalýzy Glu 461. Kyselá katalýza je označena jako A. Ve druhé části dojde k rozpadu intermediátu za bazické katalýzy Glu-461, která vytrhne proton z molekuly akceptoru R'-OH. Bazická katalýza je označena jako B (upraveno podle Juers et al., 2001).

### 3.1.2.3 Substrátová specifita

Původně byla laktosa vnímána jako jediný substrát pro  $\beta$ -galaktosidasu, ale později se zjistilo, že za enzymovou specifitu je více zodpovědná hydrolyzovatelná vazba než substrát (Dwevedi a Kayastha, 2010).  $\beta$ -galaktosidasa je vysoce specifická pro sacharid v galaktosylovém místě, ale velmi promiskuitní ke zbývajícím částem, proto dobře hydrolyzuje  $\beta$ -D-galaktopyranosidy s různými aglykony (Juers et al., 2000;

Matthews, 2005). Jako výhodné substráty se používají X-gal (5-bromo-4-chlor-3- $\beta$ -indoyl-D-galaktopyranosid) a ONPG (o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid), které mají chromogenní vlastnosti (Juers et al., 2000). ONPG byl použit jako substrát například ke srovnání aktivit  $\beta$ -galaktosidasy mezi 171 kmeny aerobních aktinomycet (Flores et al., 1990). 4-trifluoromethylumbelliferyl-beta-D-galaktopyranosid byl užít jako fluorgenní substrát  $\beta$ -galaktosidasy *E. coli* pro screening monoklonálních protilátek imunosorbentní metodou ELISA (Yegorov et al., 1988). Chang et al. (2004) ve své práci použil X-gal pro kvalitativní stanovení  $\beta$ -galaktosidasy v různých tkáních nahých myši a chlorofenol červený-beta-D-galaktopyranosid pro kvantitativní stanovení enzymové aktivity v tkáňových extraktech (Chang et al., 2004). Rostlinné  $\beta$ -galaktosidasy lze podle substrátové specifity rozdělit do dvou tříd. Na první třídu exo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galaktanas, specificky působících na pektinový  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galaktan, a druhou třídu preferující nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktosid (Kotake et al., 2005).

#### 3.1.2.4 Inhibice $\beta$ -galaktosidasy

Při nízkých koncentracích laktosy a galaktosy působí galaktosa jako inhibitor aktivity  $\beta$ -galaktosidasy (Kim et al., 2004). Podle Yanga a Okose (1989) dochází k inhibici produktem za předpokladu, že glukosa opouští aktivní místo jako první, čímž uvolní kovalentní galaktosyl-enzymový komplex pro další hydrolýzu (Yang a Okos., 1989, Kim et al., 2004). Galaktosa soutěží se substrátem o jeho vazebné místo pro hydrolytické reakce pouze v nízkých koncentracích laktosy. To znamená, že se galaktosa váže na volný enzym za vytvoření galaktosyl-enzymového komplexu pro další transgalaktosylační reakce, kde glukosa nebo laktosa působí jako akceptor, ale neváže se na galaktosyl-enzymový komplex. Při vysokých koncentracích laktosy (nad 100 mM) a galaktosy (nad 50 mM) k inhibici nedochází. Přídavek glukosy v koncentraci nižší než 50 mM vede ke zvýšení reakční rychlosti. Enzymová hydrolýza laktosy probíhá při nízké koncentraci laktosy, zatímco transglykosylace se zvyšuje s rostoucí koncentrací laktosy (Iwasaki et al., 1996; Kim et al., 2004). Inhibici  $\beta$ -galaktosidasy galaktosou lze snížit užitím mikroorganismu upraveného chemickým inženýrstvím (Xu et al, 2010). Galaktosa může působit také nekompetitivní inhibici volné  $\beta$ -galaktosidasy (Shukla a Chaplin, 1993), ale měřením aktivity imobilizované formy enzymu se tato inhibice neprojevila. Důvodem je změna struktury enzymu po imobilizaci, která zapříčinila znemožnění navázání galaktosy nekompetitivním způsobem (Portaccio et al., 1998). Další inhibitory  $\beta$ -galaktosidasy jsou aminocukry

a aminoalkoholy, které inhibují 10-30 krát více než cukry a alkoholy bez aminoskupiny. V případě 1-aminogalaktopyranosy dokonce až 300 krát více než galaktopyranosa (Huber a Gaunt, 1982). Jako inhibitory  $\beta$ -galaktosidasy působí také chlorochinin, bafilomycin A nebo nigericin, které způsobily inhibici intracelulární lysosomální  $\beta$ -galaktosidasy až z 90% (Kurz et al., 2000). Thiolové činidlo, 1-nitro-2-phenylethen, bylo prokázáno jako ireverzibilní inhibitor  $\beta$ -galaktosidasy, zatímco u enzymu inhibovaného 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-2-nitroethenem lze obnovit jeho aktivitu z 89 % ozařováním v přítomnosti merkaptoethanolu (Golan et al., 1996).

### 3.1.2.5 Purifikace

Purifikace  $\beta$ -galaktosidasy se provádí pomocí precipitace, chromatografie nebo metody reverzních micel. Chromatografie se uplatňuje ve více typech, iontově-výměnná, afinitní, chromatofokusace a gelová filtrace. Ještě před samotným srážením, chromatografií nebo purifikací pomocí reverzních micel se většinou provádí úprava vzorku. Mezi příklady úprav patří lýze buňky zamrazováním a rozmrazováním (Wella a Greenwell, 1997), filtrování, přidání do suspenze pro inaktivaci nežádoucích bílkovin, odstředování (Nagy et al., 2001).

Srážení neboli precipitace může probíhat se síranem amonným.  $\beta$ -galaktosidasa z *Penicillium chrysogenum* byla precipitována ze surového buněčného extraktu se síranem amonným v nasyceném roztoku. Tímto krokem došlo ke snížení obsahu bílkovin o 95 % a k desetinásobnému zvýšení specifické aktivity. Výsledky dokazují důležitost precipitačního kroku (Nagy et al., 2001).

Iontově výměnnou chromatografií lze uskutečnit na anexu DEAE-celulose. Afinitní chromatografie byla provedena na derivátech skla s kontrolovanou porézností (Baum G, 1975), přes interakci kov-iont (Pessela et al., 2003b) nebo přes chelát-epoxy sepakuličky (Pessela et al., 2003a). Pro gelovou filtraci se může použít Sephadex (Asp a Dahlgvist, 1968). Pro zlepšení čistoty enzymu často jednotlivé purifikační kroky na sebe navazují (Nguyen et al., 2005).

Další způsob purifikace je obrácený micelární roztok, tvořený mikroemulzí vody v oleji. Kapky vody o velikosti několika nanometrů jsou obaleny monovrstvou povrchově aktivních látek. Pokud mají surfaktanty iontový charakter, tak mikrokapky vody mohou selektivně vázat bílkoviny z vodné fáze, zatímco surfaktanty s nábojem si přitahují opačně nabitě zbytky bílkovin (Mazı et al., 2012).

### 3.1.2.6 Metody stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy

Aktivitu  $\beta$ -galaktosidasy lze stanovit spektrofotometricky, kapalinovou chromatografií, nebo chemiluminiscenčně.

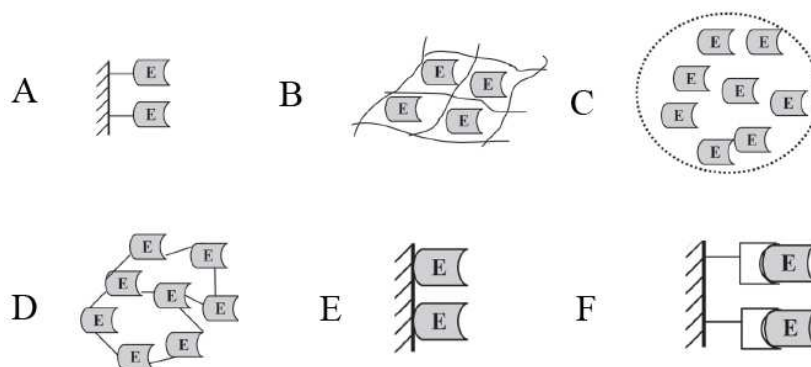
Spektrofotometricky se stanovuje aktivita  $\beta$ -galaktosidasy reakcí se substráty, které mohou být přírodní (laktosa) a umělé (ONPG, laktulosa, X-gal) (Juers et al., 2000; Amine et al., 2000). Stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy se dnes provádí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jako substráty slouží například epsilon-N-1-(1-deoxylaktulosyl)-L-lysin (Schreuder a Welling, 1983), laktosa (Horner et al., 2011). Při chemiluminiscenční metodě se využívá komerční přípravek Lumi-Gal 530, který obsahuje stabilní substrát fenylgalaktosa-substituovaný dioxethan. Katalýzou enzymu dojde k uvolnění galaktosové části substrátu. Vzniklý nestabilní dioxethan vykazuje chemiluminiscenci, která se měří pomocí luminometru. Tato metoda je jednoduchá, levná a mnohem citlivější (20x) než spektrofotometrická metoda (Beale et al., 1992).

## 3.2 IMOBILIZACE

Podle definice se imobilizované enzymy nebo buňky charakterizují jako enzymy nebo buňky, které jsou fyzicky omezeny nebo lokalizovány v určité vymezené oblasti prostoru, mající zachovanou katalytickou aktivitu a mohou být používány opakovaně a kontinuálně (Chibata, 1978) Imobilizace ve většině případů zlepšuje vlastnosti enzymů, stabilitu, specifitu, selektivitu a snižuje inhibici (Pessela et al., 2007). Provozní výhody imobilizovaného enzymu naproti volné formě enzymu jsou opětovné použití, zvýšená stabilita, rychlé ukončení reakce, kontinuální provozní režim, snadná separace enzymu od produktu a snížené náklady na provoz (Böyükbayram et al., 2006). Imobilizovat se mohou samotné enzymy nebo celé buňky, které produkují extracelulární nebo intracelulární enzymy. V případě produkce intracelulárního enzymu je třeba provést opatření pro zvýšení permeability. Imobilizace celých buněk je ekonomicky přijatelnější, není třeba purifikace a enzymy vykazují vyšší stabilitu, protože se nachází ve svém přirozeném prostředí. Avšak přítomnost dalších enzymů v buňce může zkreslovat výsledky měření (Ohmiya et al., 1997; Numanoğlu a Sungur, 2004).

### 3.2.1 Metody imobilizace

Pro imobilizaci enzymů existuje několik metod - adsorpce na nerozpustné materiály, zachycení v polymerních gelech, enkapsulace v membránách, chemické zesíťování pomocí bifunkčních nebo polyfunkčních činidel, kovalentní vazba na nerozpustný nosič (Elnashar a Yassin, 2009) nebo imobilizace na základě bioafinity (Sassolas et al., 2012). Metody lze rozdělit na reverzibilní, obsahující vazbu enzym-nosič, kdy lze enzym oddělit od nosiče za mírných podmínek. Reverzibilní metody, adsorpce a bioafinita, jsou ekonomicky výhodné, protože nosič lze použít znovu s novým enzymem. U irreverzibilních metod, kovalentní vazba, zachycení, enkapsulace, zesíťování, nelze oddělit enzym od nosiče, aniž by se enzym nebo nosič nedegradoval (Brena a Batista-Viera, 2006). Metody lze také rozdělit podle typu vazby na chemické za tvorby kovalentní vazby mezi enzymem a nosičem, a fyzikální, kdy je spojení enzymu a nosiče zprostředkováno vazebnými interakcemi (Ozmen et al., 2009). Každá metoda má své výhody a nevýhody, proto se vždy vybírá metoda imobilizace na základě daných kritérií. Například vlastností použitého enzymu (molekulární hmotnost, délka proteinového řetězce, pozice aktivního místa), matrix, reakčních podmínkách nebo reaktorech (Kosseva et al., 2009). Na Obr. 4 jsou znázorněny metody imobilizace.



**Obr. 4 Metody imobilizace**

A kovalentní vazba, B zachycení, C enkapsulace, D zesíťování, E adsorpce, F bioafinita (upraveno podle Brena a Batista-Viera, 2006).

#### 3.2.1.1 Adsorpce na nerozpustné materiály

Adsorpce je nejjednodušší metoda fyzikální imobilizace. Enzym ve formě roztoku je v kontaktu s pevným nosičem, na který se váže pomocí slabých vazebných interakcí, van der Waalsových sil, elektrostatických nebo hydrofóbních interakcí.

Promytí puřrem se potom odstraní nenavázaný enzym. Při této metodě nosič není nijak povrchově upravován a u enzymu nedochází ke snížení aktivity. Nevýhodami adsorpční metody jsou uvolňování enzymu z nosiče vlivem změn teploty, pH a iontové síly. Další nevýhodou je nespecifická adsorpce, kdy se na nosič mohou vázat bílkoviny a jiné molekuly, omezující navázání enzymu (Sassolas et al., 2012).

### **3.2.1.2 Zachycení v polymerních gelech**

Metoda zachycení v gelu je jednou z nejjednoduších metod imobilizace enzymů. Přírodní polymery jsou netoxické a metody při zpevňování jsou velmi mírné (Panesar et al., 2006). Mezi přírodní polymery patří alginát. Částice se získávají kapáním suspenze polymer-enzym do média obsahujícího kladně nabitě ionty (například vápenaté) (Freitas et al., 2011; Tanriseven a Dogan, 2002). Nevýhodou této metody je vysoká pórovitost gelu, která zapřičiňuje vyplavování zachyceného enzymu z matrix. Omezení spočívá také ve stabilitě gelu. Řešením zastavení uvolňování enzymu může být zesíťování enzymu a želatiny glutaraldehydem, který vytváří nerozpustnou strukturu a zároveň stabilizuje gel (Haider a Hussain, 2007). Pro imobilizaci  $\beta$ -galaktosidasy v gelu byl využit polyvinylalkohol (PVA) (Grossová et al., 2009).

### **3.2.1.3 Enkapsulace v membránách**

Enkapsulace neboli zapouzdření je definována jako technika balení pevných, kapalných a plyných látek do malých kapslí, které řízeně uvolňují svůj obsah po dlouhou dobu (Champagne a Fustier, 2007). Při enkapsulaci dochází k vytvoření polymerní matrix, která chrání aktivní a citlivé látky, jako například enzymy, proti tepelným a oxidačním vlivům. Nevýhodou enkapsulace je uvolňování enzymu. Řešení problému spočívá v připravení matrice s velikostí pórů tak velkou, aby substrát a produkt mohly volně procházet, ale zároveň tak malou, aby nedošlo k uvolnění enzymu. Nebo lze enzym imobilizovat na pevný nosič ještě před enkapsulací. (Betancor et al., 2008). Enkapsulace nachází uplatnění ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu díky možnosti řízeného uvolňování a zvýšené ochrany enzymu. Poslední studie se zabývají využitím hydrogelů pro enkapsulaci, tvořených ve vodě nerozpustnou bobtnající trojrozměrnou sítí hydrofilních polymerů, která obsahuje duté kapsy pro vložení a stabilizaci enzymu. Řízeného uvolňování je dosaženo využitím hmotného odporu enkapsulantů a je často upravováno chemickými postupy (Sowasod et al., 2012).

#### **3.2.1.4 Chemické zesíťování**

Metoda chemického zesíťování spočívá v zesíťování biokatalyzátorů pomocí bifunkčních nebo multifunkčních činidel. Činidla prostřednictvím svých reaktivních funkčních skupin vytváří kovalentní vazby (Grosová et al., 2008). Jako zesíťovací činidla lze použít octan chromitý nebo síran chromitý (Emregül et al., 1996), glutaraldehyd (Ansari a Husain, 2012), ethylenglykoldimethakrylát (Okutucu et al. 2010). Tato metoda se používá často ve spojení s dalšími imobilizačními metodami. Koncentrace zesíťovacího činidla musí být v optimální hodnotě, jinak by došlo k nadměrnému zesíťování a následnému poklesu aktivity enzymu (Emregül et al., 1996). Konkrétním příkladem může být zesíťování želatiny a enzymu glutaraldehydem za vytvoření nerozpustné struktury. Reakce jsou uskutečněny prostřednictvím lysinových zbytků za vytvoření aldiminové vazby (Tanriseven a Dogan, 2002). Nevýhodou této metody je možnost snížení aktivity enzymu narušením aktivní enzymové konformace a změn v aktivním místě během zesíťování (Sassolas et al., 2012).

#### **3.2.1.5 Kovalentní vazba na nerozpustný nosič**

Enzymy jsou vázány na nosiče přes jejich funkční skupiny, které nejsou nezbytné pro katalytickou aktivitu. Postup metody je rozdělen do tří kroků. Nejdříve se aktivuje povrch nosiče (Sassolas et al., 2012), který obsahuje funkční skupiny, hydroxylové, amino, amido, karboxy skupiny (Kosseva et al., 2009), pomocí multifunkčních činidel, glutaraldehyd nebo karbodiimid (Sassolas et al., 2012). Potom se nechá navázat enzym na aktivovaný nosič a nakonec se odstraní přebytečné a nenavázané molekuly enzymu. Jako nosič se může použít anorganický materiál, porézní sklo, přírodní materiál, celulóza, nebo syntetický polymer, nylon (Sassolas et al., 2012). V kovalentních metodách je změněno prostředí enzymu činidly, které vážou jak enzym, tak nosič, čímž se může zvýšit stabilita enzymu v kompozitu. Zmíněná činidla lze rozdělit na malé molekuly (aminokyseliny nebo aminy) a makromolekuly (hovězí albumin, želatina, polyethylenglykol) (Cao, 2005). Kovalentní nebo multibodové kovalentní spojení mezi enzymem a nosičem může být uskutečněno pomocí glutaraldehydu. Glutaraldehyd navázaný na  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinu enzymu se naváže na glutaraldehyd spojený s primární aminoskupinou nosiče (Betancor et al., 2006; López-Gallego et al., 2005). Jako výhody metody imobilizace kovalentní vazbou lze považovat snadný přístup substrátu k enzymu umožněný vazbou enzymu na povrchu



nosiče a neuvolňování enzymu od nosiče. Negativní stránkou je vysoká cena a nízký výnos v důsledku reakce s toxickými činidly (Grosová et al., 2008) a také nemožnost obnovitelnosti nosiče pro použití s dalším enzymem (Sheldon, 2007).

### 3.2.1.6 Bioafinita

Metoda afinitní imobilizace je založená na orientovaném navázání enzymu na specifickém místě. Dochází k vytvoření bioafinitní vazby aktivovaného nosiče (lektin, avidin, kovové cheláty, cukry) se specifickou skupinou proteinové sekvence (cukerný zbytek, biotin, histidin, cystein), která může být přítomna nebo vytvořena genetickým inženýrstvím v takové sekvenci proteinu, aby neovlivnila aktivitu enzymu nebo neblokovala aktivní místo (Andreescu a Marty, 2006). Metody založené na bioafinitě pro enzymovou imobilizaci vynikají jednoduchostí procesu bioadsorpce umožňující specifickou imobilizaci enzymů i z částečně čištěných preparátů a hrubých homogenátů, nebo buněčných lyzátů (Kulshrestha a Husain, 2006; Saleemuddin, 1999).

Bylo popsáno několik metod imobilizace enzymů na základě bioafinity, biotin-(strept)avidin (Esseghaier et al., 2008), kovový iont-chelátor (Andreescu et al., 2003), lektin-glykoenzym (Bucur et al., 2005; Saleemuddin, 1999), enzym-inhibitor (Okutucu et al., 2010), polyklonální/monoklonální protilátka-specifický enzym (Saleemuddin, 1999). Interakce enzym-inhibitor probíhá například mezi  $\alpha$ -galaktosidasou a polymerními částicemi obsahující galaktosu (Okutucu et al., 2010), interakce lektin-glykoenzym mezi konkavalin A-celulosou a enzymem s oligosacharidovou částí, která se neúčastní katalytické aktivity (Kulshrestha a Husain, 2006).

### 3.2.2 Uplatnění imobilizované $\beta$ -galaktosidasy

$\beta$ -galaktosidasa je významný enzym používaný hlavně v potravinářském průmyslu k hydrolýze laktosy v mléku, syntéze oligosacharidů a zpracování syrovátky.  $\beta$ -galaktosidasa z *Aspergillus oryzae* je často využívána v průmyslových aplikacích díky chemické odolnosti a snížené pravděpodobnosti růstu mikroorganismů při nízkém pH a vysokých teplotách (Bayramoglu et al., 2007).  $\beta$ -galaktosidasy lze také využít k syntéze sortimentu aditiv pro farmaceutický a kosmetický průmysl (van Rantwijk et al., 1999).

### 3.2.2.1 Hydrolýza laktosy v mléku

Laktosa je disacharid obsažený v mléce. Vzhledem k jeho nízké relativní sladkosti a rozpustnosti se stává špatně stravitelný pro podstatnou část světové populace. Odhaduje se, že nesnášenlivostí laktosy trpí 70 % světové dospělé populace. Nejvyšší počet osob s intolerancí laktosy se nachází ve východní Asii, což činí asi 90 % populace (Husain, 2010).  $\beta$ -galaktosidasa se nachází v řasinkovém lemu membrány sliznice tenkého střeva dospělých. Při nedostatečnosti  $\beta$ -galaktosidasy nebo její nestálosti, způsobující pokles aktivity, se projevuje laktosová intolerance (Juajun et al., 2011). Ve vysokých koncentracích má laktosa projímavé účinky (Rogalski et al., 1994). Hygroskopické vlastnosti laktosy a tendence absorbovat chutě a zápach způsobují znehodnocení chlazených potravin jako je například krystalizace mléčných výrobků, vývoj písčitých nebo krupičnatých struktur a usazenin (Carrara a Rubiolo., 1994). Proto se intenzivně začalo pracovat na odstranění laktosy z mléka, kde jeden z hlavních parametrů je ekonomická náročnost procesu.

Hydrolýza laktosy může být katalyzována pomocí kyselin, kationtových pryskyřic nebo enzymů (Hatzinikolaou et al., 2005b). Velmi zajímavou metodou je enzymové štěpení laktosy, protože enzymy nemění nutriční a technologické vlastnosti potravin (Al-Muftah a Abu-Reesh, 2005; Hatzinikolaou et al., 2005b). Enzym může být volný nebo imobilizovaný. Metoda imobilizace je výhodnější z ekonomického hlediska, protože imobilizované enzymy, jakožto drahé katalyzátory, většinou vykazují vyšší stabilitu než volné enzymy a je možné jejich znovuužití (Mateo et al., 2007). Další výhodou imobilizovaných enzymů naproti volným enzymům je možnost kontinuálního užití a jejich snadná separace z reakční směsi (Haider a Husain, 2007).

### 3.2.2.2 Galakto-oligosacharidy

$\beta$ -galaktosidasa má katalytickou vlastnost transglykosylace za tvorby laktosových derivátů, zejména galakto-oligosacharidů. Jako substrát může sloužit jak laktosa, tak syrovátka vzniklá jako vedlejší produkt při výrobě sýrů (Dragone et al., 2011). Ve vodném prostředí kompetuje transglykosylace s hydrolýzou, proto vzniká směs oligosacharidů, laktosy, glukosy a galaktosy (Maischberger et al., 2008). Galakto-oligosacharidy mají nízkou kariogenicitu, sladkost, nízkou kalorickou hodnotu a působí jako prebiotika podporující růst prospěšných bakterií laktobacilů a bifidobakterií (Sako et al., 1999). Galakto-oligosacharidy nacházejí uplatnění ve funkčních potravinách, cukrovinkách, chlebu, nápojích nebo nízkokalorických sladidlech ve fermentovaných

mléčných výrobcích (Gosling et al., 2010). Galakto-oligosacharidy se přirozeně vyskytují v mateřském mléku, kravském mléku, ovoci, zelenině a medu (Sako et al., 1999). Lidské mateřské mléko obsahuje kromě laktosy a lipidů poměrně velké množství oligosacharidů (Bode, 2006), které mají rozdílné struktury a je známo více než 100 druhů (Kobata, 2010). Tyto oligosacharidy, strukturou podobné epiteliálnímu povrchu buněk hostitele v tlustém střevě, působí jako vábičky, aby inhibovaly vazbu patogenů a toxinů na střevní buňky hostitele (Morrow et al., 2004).

### **3.2.2.3 Hydrolýza syrovátky**

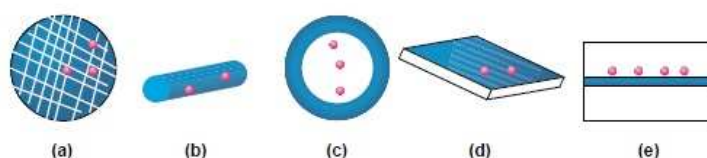
Celosvětově se během jednoho roku vyprodukuje  $160 \times 10^6$  tun mléčné syrovátky (Guimarães et al., 2010), která vzniká průmyslovým zpracováním mléka při výrobě sýrů jako vedlejší produkt (Dragone et al., 2011). Několik desetiletí se syrovátka vypouštěla jako odpad do vodního prostředí. Znečištění vody se může snížit biokonverzí syrovátky za tvorby produktů uplatňujících se jako krmivo pro zvířata, lidská výživa a jiné cukrovinky nebo produkty pro farmaceutické a zemědělské podniky (Haider a Husain, 2007). Syrovátka obsahuje spoustu mléčných živin. Nejvíce laktosy, rozpustných bílkovin, lipidů, minerálních solí a v menším množství mléčné a citronové kyseliny, skupinu vitamínu B a nebílkovinné dusíkaté sloučeniny močoviny a kyseliny močové (Siso, 1996).

Hydrolýzou syrovátky vzniká ethanol. Výroba ethanolu se provádí fermentací pouze koncentrované syrovátky, protože výsledný obsah ethanolu je nízký a finančně nejnáročnější je destilační proces separace ethanolu ze zředěného kvašeného vývaru (González Siso, 1996). Zahuštění syrovátky se provádí ultrafiltrací nebo sušením pomocí spreje nebo bubnu. Ultrafiltrace je nákladný proces, proto se upřednostňuje sušení. Výhody sušené formy syrovátky spočívají kromě menší finanční náročnosti také v kompaktním objemu, dlouhodobé stabilitě a vysokému obsahu laktosy a dalších živin, který zajišťuje vysokou produkci ethanolu fermentací (Ozmihci a Kargi, 2009; Ozmihci a Kargi, 2007).

## **3.3 NOSIČE**

Za nosič lze považovat pevný nerozpustný materiál, na který je připevněn ligand. Nosič by měl obsahovat funkční skupiny schopné vázat aktivní molekuly

(Elnashar, 2010). Neexistuje jediný nosič, který by vynikal nad všemi ostatními. Každý nosič má nějaké výhody a zároveň nevýhody. Aby byla imobilizace co nejúčinnější, musí se zvolit vhodný nosič podle daných parametrů. Ideální nosič by byl fyzikálně odolný vůči tlaku, biokompatibilní, hydrofilní, rezistentní vůči mikroorganismům, levný, dostupný a inertní vůči derivatizaci enzymů. Podle tvaru nosičů lze vydělit dvě skupiny, pravidelné a nepravidelné. Tvary nosičů mohou být korálky, vlákna, duté koule neboli kapsule, tenké vrstvy a fólie nebo membrány (Bickerstaff, 1995). Na Obr. 5 jsou znázorněny tvary nosičů. Nosiče lze rozdělit na porézní a neporézní typ, organické a anorganické nebo přírodní a syntetické látky (Buchholz et al., 1987; Brena a Batista-Viera, 2006). V Tab. 2 jsou uvedeny příklady nosičů užívaných pro imobilizaci.



**Obr. 5 Tvary nosičů**

Korálek (a), vlákno (b), kapsule (c), fólie (d), membrána (e) Růžově je naznačený imobilizovaný enzym (Cao et al., 2003).

**Tab. 2 Příklady nosičů užívaných pro imobilizaci (Brena a Batista-Viera, 2006)**

Typy nosičů
Organické
Přírodní polymery
• Polysacharidy: celulóza, dextransy, agar, agarosa, chitin, alginát
• Bílkoviny: kolagen, albumin
• Uhlík
Syntetické polymery
• Polystyren
• Jiné polymery: polyakrylát, polymethakrylát, polyakrylamid, polyamidy, vinyl, allyl-polymery
Anorganické
Přírodní minerály: bentonit, oxid křemičitý
Zpracovávané materiály: sklo (neporézní nebo s kontrolovanou pórovitostí), kovy, oxidy kovů s kontrolovanou pórovitostí

### 3.3.1 Poréznost nosičů

Poréznost a velikost částic je velmi důležitým parametrem, protože ovlivňuje velikost povrchu, na který se může navázat enzym, a tudíž i množství enzymu katalyzujícího požadovanou reakci. Průtokové vlastnosti a plocha určující kapacitu enzymů jsou kontrolovány množstvím a velikostí pórů. Naopak neporézní nosiče vynikají tím, že nevykazují difuzní omezení substrátu k enzymu nebo produktu od enzymu. Avšak jejich malý povrch neváže takové množství enzymu, jako porézní nosiče (Brena a Batista-Viera, 2006).

Nanoporézní nosič s funkčními karboxylovými skupinami, například oxid křemičitý s navázanými amino a karboxylovými funkčními skupinami, je zajímavým a slibným materiálem pro imobilizaci enzymů, protože na něj imobilizovaná organoporézní hydrolasa vykazovala dvakrát větší aktivitu než volná forma tohoto enzymu (Lei et al., 2002). Vysoká hustota proteinů ve funkcionalizovaných nanoporézních nosičích, která je dosažena jejich spontánním zachycením do pórů za mírných podmínek prostřednictvím elektrostatických sil, velmi ovlivňuje specifickou aktivitu enzymu přes zvýšení účinnosti enzymové imobilizace o více než 100%. Účinnost enzymové imobilizace je charakterizována jako poměr specifických aktivit imobilizovaného a volného enzymu v roztoku (Lei et al., 2008).

### 3.3.2 Organické nosiče

Organické nosiče, navzdory velkému množství funkčních skupin, jsou méně výhodné než anorganické z důvodu mechanických nedostatků a nízké odolnosti k mikroorganismům a organickým rozpouštědlům (Chong a Zhao, 2004).

#### 3.3.2.1 Želatina a agarosa

Želatina je protein, který lze získat hydrolýzou kolagenu. Ve studené vodě bobtná za vzniku elastických gelů, kdy pojme až 700 % vody (vztaženo k hmotnosti želatiny). K jejímu ztvrdnutí dojde reakcí s aldehydy nebo solemi kovů. Na svém povrchu obsahuje karboxylové, amino a hydroxylové skupiny, které mohou vázat enzym. S karboxymethylcelulosou, levným, ve vodě rozpustným derivátem celulosy, byl vytvořen karboxymethylcelulosa-želatinový nosič. Na tento nosič byla navázána

invertasa a zesíťována octanem chromitým. Aktivita invertasy na karboxymethylcelulosa-želatinovém nosiči byla poměrně vysoká ve srovnání s aktivitou invertasy imobilizované jenom na želatinovém nosiči, která činila 38 %. (Emregül et al., 1996). Významnou vlastností thiosiřičitanové nebo thiosíranové agarosy jako nosiče je možnost jeho znovuužití. Po intenzivním užívání se inaktivovaný enzym odstraní pomocí redukčních činidel a nosič může být znovu vázán s novým aktivním enzymem (Ovsejevi et al., 1998).

### 3.3.2.2 Celulosa

Celulosa modifikovaná DEAE byla prvním průmyslově využitým nosičem pro imobilizaci aminoacylasy z *Aspergillus oryzae*. Takzvaný Tanabeho proces v 60. letech 20. století byl proveden za účelem produkce L-aminokyselin (Sheldon, 2007).

Na celulosové korálky byl pomocí epichlorhydrinu imobilizován laktozym, což je komerční forma  $\beta$ -galaktosidasy z *Kluyveromyces fragilis*. Účinnost imobilizace byla 80 % (Roy a Gupta, 2003). Snížení účinnosti imobilizace je pravděpodobně způsobeno přeplněním nosiče, což má za následek konformační změnu molekuly enzymu (Reddy a Shankar, 1989). Také došlo ke zvýšení pH optima z 6,5 na 7 v důsledku modifikace amino skupin enzymů epichlorhydrinem, celulosa jako neutrální materiál neměla na tuto změnu vliv. Teplotní stabilita se u imobilizované formy zvýšila (Roy a Gupta, 2003).

### 3.3.2.3 Syntetické polymerní nosiče

Syntetické polymerní nosiče pro enzymovou imobilizaci se využívají z důvodu jejich výhodných vlastností jako je inertnost vůči mikroorganismům, vysoká chemická odolnost, možnost využití komplexního pufovacího systému. Nízká cena membránových materiálů je hlavní důvod jejich využití jako nosičů pro imobilizaci (Rauf et al., 2006). Acetát celulosa (Mocellini et al., 2011) a polymethylmetakrylát (Salis et al., 2009), polyakrylamid (North a Chapel, 1987) jsou výborné nosiče pro imobilizaci enzymů.

Hybridní acetát celulosa-polymethylmethakrylát se také ukázal jako vhodný nosič, který zlepšuje stabilitu imobilizovaného enzymu v širokém rozsahu pH a teplot. Enzym navázaný na tuto membránu má dobrou provozní stabilitu v důsledku vytvoření vazeb, které zabraňují uvolňování enzymu z membrány. Membrána poskytuje vynikající mikroprostředí, díky němuž si imobilizovaný enzym zachovává 94% stabilitu po 1 měsíci skladování. Jedinou nevýhodou acetát celulosa-polymethylmethakrylátu je

vyšší hodnota  $K_m$  pravděpodobně způsobená omezenou difuzí substrátu a produktu a méně porézní strukturou membrány (Rauf et al., 2006). Jako další nosiče mohou sloužit poly-(L-lysin)-modifikovaná polykarbonátová membrána (Suye et al., 1998), hedvábná fibroinová membrána (Liu et al., 1995), poly(vinyl)alkohol hydrogel (Grosová et al., 2009), polysiloxan-polyvinyl alkohol magnetická kompozita (Neri et al., 2008).

#### **3.3.2.4 Bavlněná tkanina**

Bavlněná tkanina je levný, vláknitý a mechanicky pevný materiál s velkým povrchem, který je dosažen jeho vysokou pórovitostí (Albayrak a Yang, 2001). Albayrak a Yang ve své studii popsali reaktor obsahující bavlněnou tkaninu ve tvaru volné spirály, který vykazoval nízký pokles tlaku, dostačující rychlost toku a nízké omezení způsobené difuzí. Přírodní bavlna není vhodná na enzymovou imobilizaci pro její neaktivitu, proto byla použita bavlněná tkanina aktivovaná tosyl chloridem. Bavlněná tkanina se ukázala jako vhodný a levný nosič pro enzymovou imobilizaci, který nevykazoval výrazné omezení difuzí, a nezměnil vlastnosti enzymu pro tvorbu oligosacharidů. Imobilizací enzymu na bavlněnou tkaninu se zlepšila jeho termostabilita a operační stabilita, čehož lze využít v kontinuálních reaktorech pro tvorbu galakto-oligosacharidů (Albayrak a Yang, 2001).

### 3.3.2.5 Konkavalin

Bioafinitní nosiče se využívají pro imobilizaci enzymů, protože téměř nemění strukturu aktivního místa enzymů a tím pádem není omezená difuze, která by snižovala afinitu enzymu k substrátu (Neri et al., 2008). Konkavalin A-Celit 545 je levný bioafinitní nosič pro imobilizaci enzymů. Pro nízkou polaritu a velkou adhezni plochu je celit, přírodní anorganická látka, vhodný pro imobilizaci. Ansari a Husain zkoumali vlastnosti  $\beta$ -galaktosidasy z *Aspergillus oryzae* imobilizované na konkavalin A-Celit 545 pomocí adsorpce a zesíťování a srovnali s volnou formou enzymu. Aktivita imobilizovaného enzymu naproti volné formě enzymu byla vysoká vůči fyzikálním a chemickým vlivům. V budoucnosti by mohly být enzymové reaktory, obsahující levný bioafinitní nosič Konkavalin A-Celit 545, využívány k hydrolyze laktosy v mléčných výrobcích v dávkovacích i kontinuálních reaktorech (Ansari a Husain, 2012). Další bioafinitní nosič je konkavalin A-celulosa (Kulshrestha a Husain, 2006). Konkavalin A byl také použit k vytvoření komplexu s  $\beta$ -galaktosidasou. Aktivita po 7 znovuužitích byla jen o 8 % menší než v případě konkavalinu A zesíťovaného s  $\beta$ -galaktosidasou. Ukázalo se, že tento nerozpustný komplex je velmi porézní a aktivní místo enzymu je snadno přístupné pro substrát (Haider a Husain, 2007).

### 3.3.3 Anorganické nosiče

Mezi výhody anorganického materiálu patří tepelná a mechanická stabilita, netoxičita, rezistivita k mikroorganismům a odolnost vůči organickým rozpouštědlům (Tischer a Wedekind, 1999).

#### 3.3.3.1 Nanočástice a mikročástice

Běžné magnetické nanočástice a mikročástice obsahují Fe, Co, Ni, Mn, Cr nebo Gd a to ve formě kovů, slitin (Fe, FeCo, FePt) nebo oxidů kovů ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), přičemž kovy a slitiny vykazují nejvyšší magnetizaci. Jejich nedostatkem, kromě oxidů kovů, které jsou stabilní, je snadná oxidace, a proto musí být používány pouze pokryty hustou vrstvou stabilních materiálů vůči oxidaci (Hofmann-Antenbrink et al., 2010). Povrchové materiály mohou být například oxid křemičitý (Kim et al., 2005), polyvinylalkohol (Neri et al., 2008), zlato (Long et al., 2010), uhlík (Olurode et al., 2012), vápenatá sůl poly( $\gamma$ -glutamové kyseliny) (Kumar et al., 2010). Magnetické



částice jsou často průmyslově využívány díky svým speciálním vlastnostem, jako reakce s vnějším magnetickým polem, která umožňuje snadné oddělení enzymu z reakční směsi, produkce tepla ve střídavém magnetickém poli, menší odpor přenosu hmoty, menší znečištění a velký povrch pro navázání enzymu. (Laurent et al., 2008; Halling a Dunnill, 1980). Multibodové připojení enzymu k povrchu nanočástic zvyšuje stabilitu enzymu, protože snižuje rozvíjení proteinu (Jia et al., 2003). Pro použití magnetických nanočástic je vyžadováno, aby byly stabilní, měly jednotnou strukturu a byly dobře rozptýleny v roztoku. Magnetické nanočástice jsou anizotropní, navzájem se dipolárně přitahují a mají tendenci se shlukovat, čímž ztrácí charakteristické vlastnosti pro jednu částici. Proto se magnetické nanočástice povrchově modifikují pomocí povrchově aktivních látek neboli surfaktantů, které zabrání jejich shlukování. Ale nevýhodou je, že povrchově upravené nanočástice mají značně sníženou reaktivitu v důsledku zmenšení jejich rozměrů a při přímém styku s biologickým prostředím mohou podlehnout biodegradaci zapříčiněnou malou velikostí. Řešením toho problému může být potažení magnetických nanočástic inertním materiálem, například oxidem křemičitým, který zabrání jejich agregaci a zlepší chemickou stabilitu. Potažený materiál může obsahovat funkční skupiny, na které lze navázat specifické ligandy. Toho lze využít například v diagnostice, kdy specifickými ligandy budou protilátky (Lu et al., 2002). Manipulace s jedinou nanočásticí je obtížná z důvodu nízké magnetické citlivosti, proto se z magnetických nanočástic cíleně vytváří větší agregáty s kontrolovanou strukturou (Paquet et al., 2010).

Nanočástice oxidu zinečnatého mohou sloužit jako nosič pro imobilizaci enzymů. Pomocí adsorbce byla imobilizovaná  $\beta$ -galaktosidasa z *Aspergillus oryzae* na nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO-NČ) a na nativní oxid zinečnatý (ZnO). Účinnost imobilizace byla v případě ZnO-NČ 85 %, zatímco u ZnO jen 60 %. Jak volný, tak obě formy vázaného enzymu vykazovaly stejné pH optimum a stejnou optimální teplotu. Se zvyšujícími se hodnotami pH nebo teploty měla nejvyšší aktivitu ZnO-NČ forma enzymu. Po 7 opakovaných použití vykazoval enzym vázaný na ZnO 61 % a vázaný na ZnO-NČ 75 % své aktivity. Díky těmto vlastnostem jsou nanočástice oxidu zinečnatého vhodným nosičem pro imobilizaci enzymů (Husain et al., 2011).

### **3.3.3.1.1 Příprava nanočástic a mikročástic**

Existuje několik metod přípravy nanočástic a mikročástic, například hydrotermální metoda, koprecipitace železitých a železnatých iontů v alkalických

roztocích, příprava pomocí ultrazvuku, termální rozklad organokovových prekurzorů nebo solvotermální technika.

Levná a jednoduchá metoda pro syntézu magnetických mikročastic je hydrotermální metoda, kdy vznikají homologické částice s nastavitelnou velikostí a morfologií. Hydrotermální metoda se provádí pomocí reakcí ethandiolu ( $C_2H_6O_2$ ), kyanoželezitanu draselného ( $K_3Fe(CN)_6$ ), hydroxidu sodného (NaOH) a dihydrátu hydrazinu ( $N_2H_4 \cdot H_2O$ ). Morfologické změny (oktaedr nebo krychle) lze účelně provést regulací poměru koncentrace NaOH a  $C_2H_6O_2$ . Obě formy částic vykazovaly feromagnetické chování (Chen et al., 2012).

Koprecipitace železitých a železnatých iontů v alkalických roztocích je další metodou přípravy magnetických částic. Přesné množství železnatých a železitých iontů rozpuštěných v minimálním množství vody se smíchá s hydroxidem sodným a například vodivým polymerem za zvýšené teploty. Následným ochlazením a promytím se získá polymer s magnetickými vlastnostmi (Karaoglu et al., 2011).

Příprava magnetických částic pomocí ultrazvuku neboli sonochemicky je levná, snadná a nezatěžující životní prostředí, účinná a rychlá metoda přípravy. Probíhá ve třech krocích. Nejprve se srážením vytvoří nanočástice magnetitu, dále se tyto částice obalí (3-aminopropyl)triethoxysilanem, který jim poskytne svou aminoskupinu, a nakonec se ultrazvukem v roztoku (3-aminopropyl)triethoxysilanem pokrytých částic a diaminu stříbrného redukuje stříbro za absence redukčních činidel (Zhang et al., 2010b).

Další metodou je termální rozklad organokovových prekurzorů. Termálním rozkladem acetylacetonu železitého v přítomnosti kyseliny olejové byly připraveny nanokrystaly magnetitu. Reakční rychlost, která je ovlivněna rychlostí ohřevu, určuje tvar a funkci nanokrystalů (Zhang et al., 2011).

Solvotermální metodou byly syntetizovány organické polymery upravené hybridním anorganickým nanomateriálem, hydrofilní formaldehydové pryskyřice upravené nanokrystaly magnetitu. Reakce probíhá v jednom kroku při  $160^\circ C$  bez ochrany inertním plynem. Směs vody a glykolu byla použita jako rozpouštědlo. Zdrojovými materiály byly skalice zelená, fenol a hexamethylentetramin. Výsledné nanokrystaly vykazují slabé magnetické vlastnosti a vysokou saturační magnetizaci. Tato metoda je levná, ekologická a ekonomická (Ma et al., 2011).

Mikročástice se také připravují polymeračními reakcemi. Mezi tyto metody patří suspenzní polymerace, emulzní polymerace, disperzní polymerace, interfázová nebo

volná radikálová polymerizace, polyesterová elongační polymerizace, mikroenkapsulace a agregační procesy. Emulzním agregačním procesem ze síranových polyesterových nanočástic byly připraveny kopolyestery mikročástic. Kopolyestery byly rozptýleny v horké vodě za vzniku emulzí. Z této emulze procesem emulzní agregace za přítomnosti octanu zinečnatého a chloridu hořečnatého byly získány mikročástice jednotné velikosti a tvaru (Subramani et al., 2009).

### **3.3.3.1.2 Modifikace nanočástic a mikročástic**

Magnetické mikročástice nemají tak velkou kapacitu pro enzym, jako porézní nosiče. Proto se poslední studie zabývají vytvořením hybridních nosičů, ve kterých bude kombinován mezoporézní materiál se začleněnými magnetickými částicemi. Magnetit mezoporézní oxid křemičitý vykazoval zlepšenou imobilizaci enzymu (Kim et al., 2005). Další zkoumanou metodou je jednoenzymová nanočásticová technologie. Enzym upravený touto metodou vykazuje dobrou stabilitu za drsných podmínek, protože každá molekula enzymu je obklopena tenkou vrstvou (několik nanometrů) organické nebo anorganické látky (Kim a Grate, 2003).

Magnetické korálky mohou být modifikované chitosanem. Protože chitosan je přírodní organický polymer, je obtížné do něj homogenně zanést anorganické magnetické korálky, aby se vytvořila vysoce účinná organicko-anorganická sloučenina. Příprava těchto sloučenin v práci Hu byla provedena 2 způsoby: metodou reverzní fázní suspenze se zesíťováním a precipitační metodou. Magnetické částice modifikované chitosanem právě díky chitosanu vykazovaly výborné vlastnosti jako chelatační účinky, nízkou cenu, netoxicitu, adsorpční vlastnosti a zároveň byly snadno magneticky separovatelné (Yang et al., 2009).

Magnetické částice lze modifikovat celulosou. V práci Namdea byly připraveny magnetické nanočástice pokryté celulosou. Příprava se skládala ze tří kroků. Nejdříve byla rozpuštěna celuloza v hydroxidu sodném a močovině. Následně se vmíchal magnetit do roztoku celulosy a nakonec byly získány magnetické částice modifikované celulosou vysrážením této suspenze v síranu amonném (Namdeo a Bajpai, 2009).

Povrchním elektrostatickým seskupováním pozitivně nabitých nanočástic magnetitu na povrchu negativně nabitých poly(N,N'-methylenbisakrylamid-ko-methakrylát) mikročástic s následným odstraněním polymerního jádra pomocí kalcinace za vysokých teplot lze připravit duté porézní magnetické mikročástice. Tloušťka stěny mikročástic je kontrolována pomocí poměru magnetitu a polymeru. Velikost dutiny lze

regulovat velikostí polymerních mikročástic. Výhodou těchto dutých magnetických mikročástic je porézní struktura s velkým specifickým povrchem, možnost ovládní magnetickým polem díky tenké vrstvě seskupeného magnetitu, volný prostor s permeabilní stěnou, do kterého může být uložena a kontrolovaně uvolňována cílová molekula, a nízká hustota. Povrchovou modifikací lze vlastnosti ovlivnit (Liu et al., 2012).

Sol-gel technikou se produkují korálky, které částečně pronikají sítí polyvinylalkoholu a polysiloxanu. Tyto korálky se převedou na prášek a následně se nechají srážet spolu s železnatými a železitými ionty, čímž získají magnetický charakter. Pomocí glutaraldehydu se aktivují a zároveň připojí s molekulami enzymu. Enzym imobilizovaný na tento levný magnetický nosič vykazoval stejné optimum pH (6,5) i teploty (50°C). Navíc po 20 cyklech použití při 25°C nebo po 24 hodinách při 35°C vykazoval 50 % své původní aktivity, zatímco volný enzym aktivitu zcela ztratil (Neri et al., 2008). Pomocí sol-gel techniky lze také modifikovat nanočástice oxidů železa jejím potažením oxidem křemičitým. Tloušťku potahu oxidem křemičitým lze ovládat od 2-100 nm pomocí změn koncentrace sol-gel roztoku. Do potahu oxidu křemičitého lze přidat fluorescenční barviva, která mají uplatnění při fluorescenční mikroskopii (Lu et al., 2002).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 MATERIÁLY

2-nitrophenyl $\beta$ -D-galaktopyranosid	Sigma (Švýcarsko)
$\beta$ -galactosidasa z <i>Kluyveromyces lactis</i>	Sigma-Aldrich (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný	Merck (Německo)
Hexahydrát chloridu hořečnatého	Lachema (ČR)
Hydrogenfosforečnan draselný	Merck (Německo)
Hydroxid sodný	Lach-Ner (ČR)
Jodistan sodný	Sigma Aldrich (USA)
Kyselina boritá	Chemapol (ČR)
Kyselina octová ( $\geq 99,7\%$ )	Sigma Aldrich (USA)
Kyselina trihydrogenfosforečná (85%)	Chemapol (ČR)
Magnetické mikročástice modifikované celulosou	Iontosorb (ČR)

### 4.2 PŘÍSTROJE

Analytické váhy	Sartorius (Německo)
Automatický rotátor Multi Bio RS-24	Biosan (Litva)
Digitální předvážky	Kern (Německo)
Elektromagnetická míchačka	IKA (Německo)
pH metr inoLab Level 1	WTW (Německo)
Pipety 1 $\mu$ -5ml	Eppendorf (Německo)
Spektrofotometr Biochrom (WPA)	Biochrom Ltd. (VB)
Termocycler TProfessional Gradient 96	Biometra (Německo)
Vortex MS-1	IKA (Německo)

## 4.3 METODY

### 4.3.1 Složení a vlastnosti používaných mikročastic

Makroporézní celulosové perličky, komerčně zvané Perloza, jsou tvořeny vysoce porézní celulosou s heterogenní částečně mikrokrytalickou matrix, tvořící strukturu polymeru stabilizovaného pouze vodíkovými můstky, ale ne kovalentním zesíťováním. Existují 4 typy celulosových kuliček rozdělené podle poréznosti na MT 50, MT 100, MT 200 a MT 500. Korálky jsou vyráběny v různých velikostech. V této studii byly použity celulosové korálky typu MT 100 s rozsahem rozměrů 50-80  $\mu\text{m}$ .

Výhodné vlastnosti mikroporézních celulosových perliček jsou dobrá mechanická a chemická stabilita, biokompatibilita s nejpoužívanějšími rozpouštědly a pufrů, snadná separace, vysoká poréznost a hydrofilita matrix (<http://www.iontosorb.cz/bead.htm>).

### 4.3.2 Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy

Stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy bylo provedeno spektrofotometricky. Jako substrát byl použit ONPG, který byl katalyticky zhydrolyzován na barevný produkt 2-nitrofenol. Žluté zbarvení roztoku produktem bylo změřeno pomocí spektrofotometru při 405 nm. Postup měření aktivity volné  $\beta$ -galaktosidasy spočívá v napipetování 1690  $\mu\text{l}$  pufru (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>) a 10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -galaktosidasy (100x ředěné) do skleněné kyvety. Přidáním 300  $\mu\text{l}$  substrátu (10 mmol.l<sup>-1</sup>) se nastartuje katalytická reakce. Měří se změny absorbance v intervalech 60 sekund po dobu 4 minut. V případě imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy se nejdříve do kyvety přenesou magnetické mikročastice s imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou (10 mg), potom se do kyvety napipetuje 1700  $\mu\text{l}$  pufru. Reakce se nastartuje přidáním 300  $\mu\text{l}$  substrátu (10 mmol.l<sup>-1</sup>). Absorbance se měřila po 60 sekundách, kdy 30 sekund byl roztok míchán a 30 sekund byl usazován pomocí magnetu. Vždy se měřila absorbance roztoku s imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou tak, že magnetické částice byly usazeny na dně kyvety.

Aktivita se vypočítá podle vztahu  $\frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta A \cdot V}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot l}$

$\frac{\Delta n}{\Delta t}$  .....aktivita (katal; *kat*)

$\Delta A$  .....změna absorbance

$\Delta t$  ..... čas (sekunda; *s*)

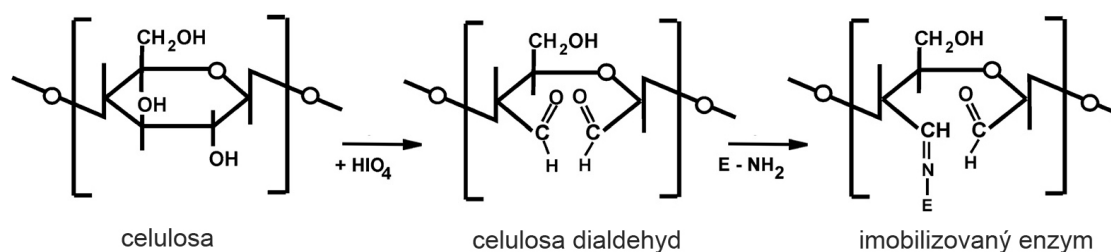
$V$  .....objem roztoku v kyvetě (litr; *l*)

$\varepsilon$ ..... molární absorpční koeficient ( $\text{litr} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{centimetr}^{-1}$ ;  $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$l$ .....tloušťka kyvety (centimetr; *cm*)

### 4.3.3 Imobilizace $\beta$ -galaktosidasy

Do eppendorfky bylo naváženo 10 mg magnetických mikročásteček modifikovaných celulosou a přidáno 300  $\mu\text{l}$  jodistanu sodného ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Následně se eppendorfky nechaly třepat po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě, aby došlo k aktivaci hydroxylových skupin celulosy jodistanem sodným. Po uplynulé době byly mikročástečky promyty pufrům (K-P<sub>i</sub>,  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH=7; MgCl<sub>2</sub>  $4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) pro odstranění nadbytečného jodistanu sodného. Poté se do eppendorfky napipetovalo 5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -galaktosidasy (neředěný komerční preparát 100%) a 295  $\mu\text{l}$  pufru (K-P<sub>i</sub>,  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH=7; MgCl<sub>2</sub>  $4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a následně se nechalo třepat pomocí automatického rotátoru přes noc při 5°C. Během třepání by mělo dojít k navázání enzymu na mikročástečky přes aktivované hydroxylové skupiny celulosy. Druhý den byl odstraněn roztok enzymu a mikročástečky byly promyty pufrům (K-P<sub>i</sub>,  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH=7; MgCl<sub>2</sub>  $4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), aby se odstranil nenavázaný enzym. Na Obr. 6 je znázorněna aktivace hydroxylových skupin celulosy a následné kovalentní navázání enzymu.



**Obr. 6 Aktivace hydroxylových skupin celulosy a následná vazba enzymu**

Působením jodistanu sodného dochází k rozštěpení sacharidového kruhu. Hydroxylové skupiny celulosy jsou oxidovány na aldehydové skupiny. Tyto aldehydové

skupiny vytvářejí kovalentní vazbu s aminoskupinami enzymu (upraveno dle Namdeo a Bajpai, 2009).

#### 4.3.4 Stanovení vazebné kapacity $\beta$ -galaktosidasy

Vazebná kapacita  $\beta$ -galaktosidasy na magnetické mikročástice modifikované celulosou byla stanovena metodou Bradfordové. Princip této metody spočívá v navázání barviva Coomassie Brilliant Blue G250 na molekuly proteinu v kyselém pH. Trifenylmethanová skupina se váže na nepolární části proteinu. Na vedlejší řetězce aminoskupin, které nesou kladný náboj (př. arginin), se váže anion sulfoskupiny. Vazbou barviva na molekulu proteinu dojde k modrému zbarvení, které se měří spektrofotometricky při 595 nm. Zbarvení je přímo úměrné množství proteinu (BSA,  $\beta$ -galaktosidasy).

Nejdříve byl připraven standardní roztok proteinu (BSA,  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) smícháním 10 mg BSA a 400 ml destilované vody. S využitím tohoto standardního roztoku bylo připraveno 10 zkumavek kalibračních standardů o objemu 1 ml se vzrůstající koncentrací BSA v rozsahu 2,5 -  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Jako blank byla použita zkumavka s 1 ml destilované vody. Do každé zkumavky byly přidány 2 ml činidla Bradfordové a rychle promíchány.

Byly připraveny vzorky o zkoumané koncentraci  $\beta$ -galaktosidasy. Zkoumaný vzorek byl dvojího typu. První typ zkoumaného vzorku byl získán smícháním 5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -galaktosidasy (neředěný komerční preparát 100%) a 295  $\mu\text{l}$  pufru (K- $\text{P}_i$ ,  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH=7;  $\text{MgCl}_2$   $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Druhý typ zkoumaného vzorku byl supernatant, který byl získán imobilizací  $\beta$ -galaktosidasy popsanou v kapitole 4.3.3. Oba typy vzorků byly 10 krát naředěny. Byly připraveny 3 zkumavky o objemu 1 ml se zkoumaným ředěným vzorkem prvního typu a 3 zkumavky o objemu 1 ml se zkoumaným ředěným vzorkem druhého typu. Do každé zkumavky byly přidány 2 ml činidla Bradfordové a rychle promíchány.

Po 5 minutách byla měřena absorbance jednotlivých vzorků. Vynesáním kalibračního grafu závislosti absorbance kalibračních standardů na koncentraci BSA byla získána rovnice regrese, z které byla vypočítána celková koncentrace



$\beta$ -galaktosidasy ve zkoumaných vzorcích. Dosazením do vztahu:

$$\text{vazebná kapacita} = \frac{(c_v \cdot V_v - c_s \cdot V_s)}{m}$$

$c_v$  ..... koncentrace zkoumaného vzorku 1. typu (volná  $\beta$ -galaktosidasa) ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )

$c_s$  ..... koncentrace zkoumaného vzorku 2. typu (supernatant) ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )

$V_v$  ..... objem roztoku zkoumaného vzorku 1. typu ( $\mu\text{l}$ )

$V_s$  ..... objem roztoku zkoumaného vzorku 2. typu ( $\mu\text{l}$ )

$m$  ..... hmotnost mikročastic (mg)

byla vypočítána vazebná kapacita  $\beta$ -galaktosidasy na 1 mg magnetických mikročastic modifikovaných celulosou. Množství  $\beta$ -galaktosidasy ve vzorku 1. typu na 1 mg nosiče bylo určeno jako 100 %. K této hodnotě byl vztažen a určen imobilizační výtěžek v procentech.

#### 4.3.5 Kontrola aktivity $\beta$ -galaktosidasy

Před každým měřením změny absorbance imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy byly částice s navázanou  $\beta$ -galaktosidasou promyty 8 krát pufrům (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>) za účelem odstranění nenavázené  $\beta$ -galaktosidasy. Dostatečné promytí mikročastic s imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou bylo kontrolováno spektrofotometricky. Do kyvety bylo napipetováno 1700  $\mu\text{l}$  pufru (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>), který byl odebrán z eppendorfky s imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou na mikročasticích. Částice byly drženy na dně eppendorfky pomocí magnetu. Reakce byla nastartována přidáním 300  $\mu\text{l}$  substrátu ONPG (10 mmol.l<sup>-1</sup>). Byla měřena změna absorbance  $\beta$ -galaktosidasy při 405 nm v intervalu 60 sekund po dobu 4 minut. Při dostatečném promytí mikročastic byla tato aktivita nulová, což značilo nepřítomnost volné  $\beta$ -galaktosidasy v pufru nad částicemi. Tudíž následné měření aktivity  $\beta$ -galaktosidasy s částicemi zahrnovalo pouze aktivitu imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy.

#### 4.3.6 Stanovení pH optima $\beta$ -galaktosidasy

V této metodě se stanovuje pH hodnota, při které  $\beta$ -galaktosidasa vykazuje nejvyšší aktivitu. Byly měřeny absorbance a stanoveny aktivity  $\beta$ -galaktosidasy

v rozsahu hodnot pH 4-10. Byly připraveny Britton-Robinsonovi pufrы ( $\text{MgCl}_2$  4  $\text{mmol.l}^{-1}$ ) o určených hodnotách pH (4; 5; 6; 7; 8; 9; 10). Před měřením byla volná i imobilizovaná  $\beta$ -galaktosidasa 45 minut inkubována v pufru o daném pH. Pro měření absorbance volné  $\beta$ -galaktosidasy bylo do kyvety napipetováno 1690  $\mu\text{l}$  pufru o dané hodnotě pH (Britton-Robinson;  $\text{MgCl}_2$  4  $\text{mmol.l}^{-1}$ ) a 10  $\mu\text{l}$  enzymu (100x ředěný). Nakonec bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  substrátu ONPG (10  $\text{mmol.l}^{-1}$ ) a byla měřena změna absorbance v intervalu 60 sekund po dobu 4 minut. V případě imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy byly do kyvety přeneseny mikročástice s navázaným enzymem a bylo napipetováno 1700  $\mu\text{l}$  pufru o dané hodnotě pH (Britton-Robinson;  $\text{MgCl}_2$  4  $\text{mmol.l}^{-1}$ ). Po přidání 300  $\mu\text{l}$  substrátu (10  $\text{mmol.l}^{-1}$ ) byla měřena změna absorbance v intervalu 60 sekund po dobu 4 minut. Stanovení pH optima bylo také prováděno ve fosfátovém pufru (K- $\text{P}_i$ , 0,1  $\text{mol.l}^{-1}$ ;  $\text{MgCl}_2$  4  $\text{mmol.l}^{-1}$ ), ale nakonec pro jeho malý rozsah pufrací kapacity (pH 6-8) bylo prováděno v Britton-Robinsonových pufrách.

#### 4.3.7 Stanovení termostability $\beta$ -galaktosidasy

Stanovení termostability  $\beta$ -galaktosidasy spočívalo v měření absorbance a stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy v rozsahu teplot 25-58,3°C. Eppendorfkы s volnou  $\beta$ -galaktosidasou (50  $\mu\text{l}$  100 krát ředěného enzymu v pufru (K- $\text{P}_i$ , 0,1  $\text{mol.l}^{-1}$ , pH=7;  $\text{MgCl}_2$  4  $\text{mmol.l}^{-1}$ )) a imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou (10 mg částic v 50  $\mu\text{l}$  pufru (K- $\text{P}_i$ , 0,1  $\text{mol.l}^{-1}$ , pH=7;  $\text{MgCl}_2$  4  $\text{mmol.l}^{-1}$ )) byly inkubovány při daných teplotách °C (25; 30,1; 33,7; 38,6; 41,2; 43,9; 46,3; 49,6; 53,4; 55,7; 58,3) po dobu 30 minut. Potom byly uloženy v ledu. Pro změřeni absorbance volné  $\beta$ -galaktosidasy bylo do kyvety napipetováno 1690  $\mu\text{l}$  pufru (K- $\text{P}_i$ , 0,1  $\text{mol.l}^{-1}$ , pH=7;  $\text{MgCl}_2$  4  $\text{mmol.l}^{-1}$ ), 10  $\mu\text{l}$  inkubované  $\beta$ -galaktosidasy (100x ředěná) při dané teplotě. Nakonec bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  substrátu ONPG (10  $\text{mmol.l}^{-1}$ ) a byla měřena změna absorbance v intervalu 60 sekund po dobu 4 minut. Aktivita imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy byla stanovena tak, že do kyvety byly přeneseny mikročástice s navázanou  $\beta$ -galaktosidasou inkubovanou při dané teplotě a bylo napipetováno 1700  $\mu\text{l}$  pufru (K- $\text{P}_i$ , 0,1  $\text{mol.l}^{-1}$ , pH=7;  $\text{MgCl}_2$  4  $\text{mmol.l}^{-1}$ ). Přidáním 300  $\mu\text{l}$  substrátu ONPG (10  $\text{mmol.l}^{-1}$ ) byla započata katalytická reakce a byla měřena změna absorbance v intervalu 60 sekund po dobu 4 minut.

### 4.3.8 Stanovení funkční časové stability

Funkční časovou stabilitou se rozumí stabilita enzymu v čase. Stanovuje se aktivita  $\beta$ -galaktosidasy skladované při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Byly určeny časové body v hodinách, kdy byly měřeny absorbance (0; 1; 2; 5; 15; 19; 24). Do kyvety, pro měření absorbance volné  $\beta$ -galaktosidasy, bylo napipetováno 1690  $\mu\text{l}$  pufru (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>) a 10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -galaktosidasy (100x ředěný komerční preparát). Nakonec bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  substrátu ONPG (10 mmol.l<sup>-1</sup>) a byla měřena absorbance, která byla zaznamenána jako hodnota absorbance v čase 0 hodin. Druhá hodnota v čase 1 hodina byla získána tak, že eppendorfka s enzymem (100x ředěný komerční preparát) byla před měřením ponechána po dobu jedné hodiny v laboratorní teplotě a absorbance byla měřena výše popsáním postupem. Hodnota v čase 2 hodiny byla měřena se vzorkem ponechaným 2 hodiny při laboratorní teplotě. Další hodnoty byly získány analogicky. Celkem bylo naměřeno 7 hodnot. Pro stanovení imobilizované formy  $\beta$ -galaktosidasy bylo do kyvety vloženo 10 mg magnetických mikročástic a napipetováno 1700  $\mu\text{l}$  pufru (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>). Dále bylo připipetováno 300  $\mu\text{l}$  substrátu ONPG (10 mmol.l<sup>-1</sup>) a byla měřena absorbance v čase 0 hodin. Pro stanovení hodnoty v čase 1 hodina byla eppendorfka s imobilizovaným enzymem a pufrem (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>) před měřením ponechána v laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny. Po té byla měřena absorbance způsobem popsáním pro imobilizovanou formu. Další hodnoty byly opět získány analogicky. Celkem bylo naměřeno 7 hodnot.

### 4.3.9 Stanovení stability při skladování

Byly stanoveny aktivity volné a imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy při skladování po dobu čtyř týdnů v intervalech 1 týden. Eppendorfky s volnou i imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou byly uskladněny v lednici při 5°C. Pro stanovení stability volné  $\beta$ -galaktosidasy bylo do kyvety napipetováno 1690  $\mu\text{l}$  pufru (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>) a 10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -galaktosidasy (100x ředěný komerční preparát). Po přidání 300  $\mu\text{l}$  substrátu ONPG (10 mmol.l<sup>-1</sup>) byla měřena změna absorbance v intervalu 60 sekund po dobu 4 minut, která byla zaznamenána jako hodnota změny absorbance v čase 0 týdnů. Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy byla dále měřena po 1, 2, 3 a 4 týdnech.

Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy v čase 0 týdnů byla označena jako 100 %. Stabilita imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy byla stanovena analogicky jako stabilita volné formy enzymu s rozdílem, že do kyvety byly přeneseny mikročástice s navázanou  $\beta$ -galaktosidasou (10 mg) a množství pufru (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>) napipetovaného do kyvety bylo 1700  $\mu$ l.

#### 4.3.10 Stanovení Michaelisovy konstanty $\beta$ -galaktosidasy

Byla stanovena Michaelisova konstanta pro volnou a imobilizovanou formu  $\beta$ -galaktosidasy. Byly měřeny absorbance a stanoveny aktivity  $\beta$ -galaktosidasy při daných hodnotách koncentrace substrátu ONPG (2, 4, 6, 8, 10 mmol.l<sup>-1</sup>). Pro měření absorbance volné formy  $\beta$ -galaktosidasy bylo do kyvety napipetováno 1690  $\mu$ l pufru (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>) a 10  $\mu$ l  $\beta$ -galaktosidasy (100 krát ředěný komerční preparát). Nakonec bylo přidáno 300  $\mu$ l ONPG (o dané koncentraci mmol.l<sup>-1</sup>) a byla měřena změna absorbance v intervalu 60 sekund po dobu 4 minut. V případě imobilizované  $\beta$ -galaktosidasy bylo do kyvety vloženo 10 mg magnetických mikročástic a napipetováno 1700  $\mu$ l pufru (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>). Dále bylo připipetováno 300  $\mu$ l ONPG (o dané koncentraci mmol.l<sup>-1</sup>) a byla měřena změna absorbance v intervalu 60 sekund po dobu 4 minut. Byl sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci substrátu ONPG v Lineweaver a Burkově vynesení. Dosazením do rovnice regrese za předpokladu, že y=0, bylo vypočítáno x. A ze vztahu

$$x = \frac{-1}{Km} \text{ byla vypočítána Michaelisova konstanta.}$$

#### 4.3.11 Stanovení operační stability $\beta$ -galaktosidasy

Stanovení operační stability se provádí pouze s imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou. Cílem je stanovit aktivitu enzymu vzhledem k jeho opětovnému použití. Do kyvety bylo vloženo 10 mg magnetických mikročástic modifikovaných celulosou s imobilizovanou  $\beta$ -galaktosidasou a napipetováno 1700  $\mu$ l pufru (K-P<sub>i</sub>, 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>). Reakce byla nastartována připipetováním 300  $\mu$ l ONPG (10 mmol.l<sup>-1</sup>) do kyvety a v 60 sekundových intervalech byla měřena změna absorbance po dobu 4 minut. Potom byly částice 5 krát promyty pufrům (K-P<sub>i</sub>, 0,1

mol.l<sup>-1</sup>, pH=7; MgCl<sub>2</sub> 4 mmol.l<sup>-1</sup>) a celý cyklus byl opakován. Celkem bylo naměřeno 10 cyklů.

## 5 LITERATURA

- Albayrak N., Yang S. T. (2001) Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnol. Bioeng.* **77**, 8-19.
- Al-Muftah A. E., Abu-Reesh I. M. (2005) Effects of internal mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* **23**, 139-153.
- Amine A., Moscone D., Bernardo R. A., Marconi E., Palleschi G. (2000) A new enzymatic spectrophotometric assay for the determination of lactulose in milk. *Anal. Chim. Acta* **406**, 217-224.
- Andreescu, S., Fournier, D., Marty, J. L. (2003) Development of highly sensitive sensor based on bio-engineered acetylcholinesterase immobilized by affinity method. *Anal. Lett.* **39**, 1865–1885.
- Andreescu S., Marty J. L. (2006) Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomol. Eng.* **23**, 1-15.
- Ansari S. A., Husain Q. (2012) Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. *Food Bioprod. Process.* **90**, 351-359.
- Asraf S. S., Gunasekaran P. (2010) Current trends of  $\beta$ -galactosidase research and application. V *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, (Méndez-Vilas, ed), pp. 880-890, Formatex, Badajoz, Španělsko.
- Ates S. a Mehmetoglu U. (1997) A new method for immobilization of beta-galactosidase and its utilization in a plug-flow reactor. *Process Biochem.* **32**, 433-436.
- Batsalova K., Kunchev K., Popova Y, Kozhukharova A., Kirova N. (1987) Hydrolysis of lactose by  $\beta$ -galactosidase immobilized in polyvinylalcohol. *Appl. Microbiol. Biot.* **26**, 227–230.
- Baum G. (1975) Affinity chromatography of beta-galactosidase on controlled-pore glass derivatives. *J. Chromatogr.* **29**, 105-111.

- Bayramoglu G., Tunali Y., Arica M. Y. (2007) Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto magnetic poly (GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catal. Commun.* **8**, 1094-1101.
- Beale E. G., Deeb E. A., Handley R. S., Akhavan Tafti H., Schaap A. P. (1992) A rapid and simple chemiluminescent assay for *Escherichia coli* beta-galactosidase. *Biotechniques.* **12**, 320-323.
- Berger J. L., Lee B. H., Lacroix C. (1995) Immobilization of beta-galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1 for oligosaccharides synthesis. *Biotechnol. Tech.* **9**, 601-606.
- Betancor L., López-Gallego F., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Mateo C., Dellamora-Ortiz G., Fernández-Lafuente R., Guisán J. M. (2006) Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 877–882.
- Betancor L., Luckarift H. R., Seo J. H., Brand O., Spain J. C. (2008) Three-Dimensional Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase on a Silicon Surface. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 261-267.
- Bickerstaff G. F. (1995) Impact of Genetic Technology on Enzyme Technology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **15**, 13-30.
- Bode L. (2006) Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J. Nutr.* **136**, 2127-2130.
- Büyükbayram A. E., Kiralp S., Toppare L., Yağci Y. (2006) Preparation of biosensors by immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and their use in determination of phenolic compounds in red wine. *Bioelectrochemistry* **69**, 164–171.
- Brena B. M., Batista-Viera F. (2006) Immobilization of Enzymes. V *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, (Guisán J. M., ed.), pp. 1-30, Humana Press Inc, Totowa, New Jersey.
- Bucur B., Danet A. F., Marty J. L. (2005) Cholinesterase immobilisation on the surface of screen-printed electrodes based on concanavalin A affinity. *Anal. Chim. Acta* **530**, 1-6.

- Buchholz, K. and Klein, J. (1987) Characterization of Immobilized Biocatalysts. In *Methods in Enzymology* volume 135, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, London, pp. 3–30.
- Bulmus, V., Ayhan, H., Piskin, E. (1997) Modified PMMA monosize microbeads for glucose oxidase immobilization. *chem. eng. J.* **65**, 71–76.
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. (2009) The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, D233-D238.
- Cao L., Langeny L., Sheldon R. A. (2003) Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 387-394.
- Cao L. (2005) Immobilised enzymes: Science or Art? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 217-226.
- Carrara C. R., Rubiolo A. C. (1994). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on chitosan. *Biotechnol. Prog.* **10**, 220-224.
- Cavaille D., Combes D. (1995) Characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **22**, 55-64.
- Cieśliński H., Kur J., Białkowska A., Baran I., Makowski K., Turkiewicz M. (2005) Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-adapted beta-galactosidase from antarctic bacterium *Pseudoalteromonas sp. 22b*. *Protein Expr. Purif.* **39**, 27–34.
- Cortes G., Trujillo-Roldan M. A., Ramirez O. T., Galindo E. (2005) Production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. *Process. Biochem.* **40**, 773-778.
- Dekker R. F. (1989) Immobilization of a lactase onto a magnetic support by covalent attachment to polyethyleneimine-glutaraldehyde-activated magnetite. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **22**, 289-310.
- Dominguez E., Nilsson M., Hahn-Hagerdal B. (1988) Carbodiimide coupling of  $\beta$ -galactosidase from *A. oryzae* to alginate. *Enzyme Mikrob. Technol.* **10**, 606-610.
- Dominigues L., Teixeira J. A., Penttilä M., Lima N. (2002) Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain secreting high levels of *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **58**, 645-650.



- Dragone G., Mussatto S. I., Almeida e Silva J. B., Teixeira J. A. (2011) Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass Bioenerg.* **35**, 1977-1982.
- Dragone G., Mussatto S. I., Oliveira J. M., Teixeira J. A. (2009) Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem.* **112**, 929-935.
- Dwevedi A., Kayastha A. M. (2010) Plant  $\beta$ -galactosidases: physiological significance and recent advances in technological applications. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **19**, 9-20.
- Elnashar M. M., Yassin M. A. (2009) Lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **159**, 426-437.
- Emregül E., Sungur S., Akbulut U. (1996) Effect of chromium salts on invertase immobilization onto carboxymethylcellulose-gelatine carrier system. *Biomaterials* **17**, 1423-1427.
- Esseghaier C., Bergaoui Y., Tlili A., Abdelghani A. (2008) Impedance spectroscopy on immobilized streptavidin horseradish peroxidase layer for biosensing. *Sens. Actuator B-Chem.* **134**, 112–116.
- Fatima A., Husain Q. (2007) Polyclonal antibodies mediated immobilization of peroxidase from ammonium sulphate fractionated bitter gourd (*Momordica charantia*) proteins. *Biomol. Eng.* **24**, 223-230.
- Finocchiaro, T., Olson, N. F., Richardson, T. (1980). Use of immobilized lactase in milk systems. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **15**, 71–88.
- Flores M., Ford E. G., Janda J. M. (1990) Value of the o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside test to differentiate among the aerobic actinomycetes. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2142-2144.
- Ganzle M., Haase G., Jelen P. (2008) Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *Int. Dairy J.* **18**, 685-694.
- Göktuğ T., Sezgintürk M. K., Dinçkaya E. (2005) Glucose oxidase- $\beta$ -galactosidase hybrid biosensor based on glassy carbon electrode modified with mercury for lactose determination. *Anal. Chim. Acta* **551**, 51–56.

- González Siso M. I. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour. Technol.* **57**, 1-11.
- Golan R., Zehavi U., Naim M., Patchornik A., Smirnoff P. (1996) Inhibition of *Escherichia coli* beta-galactosidase by 2-nitro-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl) ethyl, a photoreversible thiol label. *Biochim. Biophys. Acta.* **16**, 238-242.
- Gosling A., Stevens G., Barber A., Kentish S. (2010) Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chem.* **121**, 307-318.
- Graig D. B. (2010) Heterogeneous properties of individual molecules of beta-galactosidase from the thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus*. *Protein J.* **29**, 55-61.
- Grosová Z., Rosenberg M., Gdovin M., Sláviková L., Rebroš M. (2009) Production of D-galactose using  $\beta$ -galactose and *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in poly(vinylalcohol) hydrogel. *Food Chem.* **116**, 96-100.
- Grosová Z., Rosenberg M., Rebroš M. (2008) Perspectives and Applications of Immobilised  $\beta$ -Galactosidase in Food Industry – a Review. *Czech J. Food Sci.* **26**, 1–14.
- Guo Y. S., Wang J., Song X. J. (2004) Characterization of cellulose acetate micropore membrane immobilized acylase I. *J. Zhejiang Univ. SCI.* **5**, 1608–1612.
- Guimarães P. M. R., Teixeira J. A., Domingues L. (2010) Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol. Adv.* **28**, 375-384.
- Gürdaş S., Güleç H. A., Mutlu M. (2012) Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -Galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism. *Food Bioprocess Technol.* **5**, 904-911.
- Haider T., Husain Q. (2007) Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *Int. J. Biol. Macromol.* **41**, 72–80.
- Haider T., Husain Q. (2009a) Hydrolysis of milk/whey lactose by  $\beta$ -galactosidase: a comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. *Chem. Eng. Process.: Process Intensification.* **48**, 576-580.

- Haider T., Husain Q. (2009b) Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immunoaffinity support. *Biochem. Eng. J.* **43**, 307-314.
- Halling P. J., Dunnill P. (1980) Magnetic supports for immobilized enzymes and bioaffinity adsorbents. *Enzyme Microb. Technol.* **2**, 2-10
- Hatzinikolaou D. G., Katsifas E., Mamma D., Karagouni A. D., Christakopoulos P., Kekos D. (2005) Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.* **24**, 161–172.
- Heilskov N. S. (1951) Animal lactase 1. Determination of lactase activity, *Acta Physiologica Scandinavica*, **22**, 267-276.
- Hocker B., Beismann-Driemeyer S., Hettwer S., Lustig A., Sterner R. (2001) Dissection of a (betaalpha) 8-barrel enzyme into two folded halves. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 32-36.
- Hofmann-Antenbrink M., Hofmann H., Montet X. (2010) Superparamagnetic nanoparticles-a tool for early diagnostics. *Swiss Med Wkly.* **140**, 13081-13089.
- Horner T. W., Dunn M. L., Eggett D. L., Ogden L. V. (2011)  $\beta$ -Galactosidase activity of commercial lactase samples in raw and pasteurized milk at refrigerated temperatures. *J. Dairy Sci.* **94**, 3242-3249.
- Hossain S. M. Z., Brennan J. D. (2011)  $\beta$ -Galactosidase-based colorimetric paper sensor for determination of heavy metals. *Anal. Chem.* **83**, 8772-8778.
- <http://www.iontosorb.cz/bead.htm> (3.5.2012).
- <http://www.usbio.net/item/G1041-05> (4.5.2012).
- Hu X., Robin S., O'Connell S., Walsh G., Wall J. G. (2010) Engineering of fungal  $\beta$ -galactosidase to remove product inhibition by galactose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **87**, 1773-1782.
- Huang X. L., Walsh M. K., Swaisgood H. E. (1996) Simultaneous isolation and immobilization of streptavidin-beta galactosidase-Some kinetic characteristics of the immobilized enzyme and regeneration of bioreactors. *Enzyme Microb. Tech.* **19**, 378-383.
- Huber R. E., Gaunt M. T. (1982) The inhibition of beta-galactosidase (*Escherichia coli*) by amino sugars and amino alcohols. *Can. J. Biochem.* **60**, 608-612.

- Huber R. E., Hakda S., Cheng C., Cupples C. G., Edwards R. A. (2003) Trp-999 of beta-galactosidase (*Escherichia coli*) is a key residue for binding, catalysis and synthesis of allolactose, the natural Lac operon inducer. *Biochemistry* **42**, 1796-1803.
- Huber R. E., Hurlburt K. L. (1986) Reversion reactions of  $\beta$ -galactosidase (*Escherichia coli*). *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 411-418.
- Husain Q. (2010) Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**, 41-62.
- Husain Q., Shakeel A. A., Fahad A., Ameer A. (2011) Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *Int. J. Biol. Macromol.* **49**, 37-43.
- Champagne C. P., Fustier P. (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 184-190.
- Chang S. F., Chang H.Y., Tong Y.C., Chen S.H., Hsiao F.C., Lu S.C., Liaw J. (2004) Nonionic polymeric micelles for oral gene delivery in vivo. *Hum. Gene Ther.* **15**, 481-493.
- Chibata I. (1978) Immobilised enzymes - research and development, pp. 108-147, John Wiley and Sons Inc, New York, USA.
- Chen R., Cheng J., Wei Y. (2012) Preparation and magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> microparticles with adjustable size and morphology. *J. Alloys Compd.* **520**, 266-271.
- Chong A. S. M., Zhao X. S. (2004) Design of large-pore mesoporous materials for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst. *Catal. Today* **93-95**, 293-299.
- Ianniello R. M., Lindsay T. J., Yacynych A. M. (1982). Differential pulse voltammetric study of direct electron transfer in glucose oxidase (EC 1.1.3.4) chemically modified graphite electrodes. *Anal. Chem.*, **54**, 1098-1101.
- Ishikawa E., Sakai T., Ikemura H., Matsumoto K., Abe H. (2005) Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis*  $\beta$ -galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 331-339.

- Iwasaki K., Nakajima M., Nakao S. (1996) Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using  $\beta$ -galactosidase. *Process. Biochem.* **31**, 69-76.
- Jacob F., Monod J. (1961) Genetické regulační mechanismy v syntéze bílkovin. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356.
- Jacobson R. H., Zhang X. J., DuBose R. F., Matthews B.W. (1994) Three-dimensional structure of  $\beta$ -galactosidase from *E. coli*. *Nature* **369**, 761–766.
- Jancewicz L. J., Wheatley R. W., Sutendra G., Lee M., Fraser M. E., Huber R. E. (2012) Ser-796 of  $\beta$ -galactosidase (*Escherichia coli*) plays a key role in maintaining a balance between the opened and closed conformations of the catalytically important active site loop. *Arch. Biochem. Biophys.* **517**, 111-122.
- Jia H., Zhu G., Wang P. (2003) Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 406-414
- Joshi, M. S., Gowda, L. R., Katwa, L. C., Bhat, S. G. (1989). Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 439–443.
- Juajun O., Nguyen, T. H., Maischberger T., Iqbal S., Haltrich D., Yamabhai M. (2011) Cloning, purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 645-654.
- Juers D. H., Hakda S., Matthews B. W., Huber R. E. (2003) Structural basis for the altered activity of Gly794 variants of *Escherichia coli* beta-galactosidase. *Biochemistry* **42**, 13505-13511.
- Juers D. H., Heightman T. D., Vasella A., McCarter J. D., Mackenzie L., Withers S. G., Matthews B. W. (2001) A Structural View of the Action of *Escherichia coli* (*lacZ*)  $\beta$ -Galactosidase. *Biochemistry* **40**, 14781-14794.
- Juers D. H., Jackson R.H., Wigley D., Zhang X. J., Huber R.E., Tronrud D.E., Matthews B.W. (2000) High resolution refinement of  $\beta$ -galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for  $\alpha$ -complementation. *Protein Sci.* **9**, 1685–1699.
- Jurado E., Camacho F., Luzon G., Vicaria J. M. (2002) A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Mikrob. Technol.* **131**, 300-309.

- Karaoğlu E., Baykal A., Deligöz H., Şenel H., Toprak M. S. (2011) Synthesis and characteristics of poly(3-pyrrol-1-ylpropanoic acid) (PPyAA)–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite. *J. Alloys Compd.* **509**, 8460-8468.
- Kéry V., Kučár, Matulová M., Haplová J. (1991) Immobilisation of  $\beta$ -D-galactosidase from *Escherichia coli* on cellulose beads and its use for the synthesis of disaccharide derivatives. *Carbohydrate Research.* **209**, 83-87.
- Khare S. K., Gupta M. N. (1988) Immobilization of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase and its derivatives by polyacrylamide gel. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 829-833.
- Kim C. S., Ji E. S., Oh D. K. (2004) A new kinetic model of recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 738-743.
- Kim S., Dale B. E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg.* **26**, 361-375
- Kobata A. (2010) Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* **86**, 731-747.
- Kosseva M. R., Panesar P. S., Kaur G., Kennedy J. F. (2009) Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *Int. J. Biol. Macromol.* **45**, 437-447.
- Kotake T., Dina S., Konishi T., Kaneko S., Igarashi K., Samejima M., Watanabe Y., Kimura K., Tsumuraya Y. (2005) Molecular cloning of a  $\beta$ -galactosidase from radish that specifically hydrolyzes  $\beta$ -(1→3)- and  $\beta$ -(1→6)-galactosyl residues of arabinogalactan protein. *J. Plant Physiol.* **138**, 1563-1576.
- Kulshrestha Y., Husain Q. (2006) Bioaffinity-based an inexpensive and high yield procedure for the immobilization of turnip (*Brassica rapa*) peroxidase. *Biomol. Eng.* **23**, 291-297.
- Kumar R., Inbaraj B. S., Chen B. H. (2010) Surface modification of superparamagnetic iron nanoparticles with calcium salt of poly( $\gamma$ -glutamic acid) as coating material. *Mater. Res. Bull.* **45**, 1603-1607.
- Kurz D. J., Decary S., Hong Y., Erusalimsky J. D. (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* **113**, 3613-3622.

- Ladero M., Santos A., García-Ochoa F. (2006) Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Mikrob. Technol.* **38**, 1–9.
- Langridge J. (1968) Genetic evidence for the disposition of the substrate binding site of beta-galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**, 1260-1267.
- Langridge J. (1969) Mutations conferring quantitative and qualitative increases in beta-galactosidase activity in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **105**, 74-83.
- Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L. V., Muller R. N. (2008) *Chem. Rev.* **108**, 2064-2110.
- Lei C., Shin Y., Liu J., Ackerman E. J. (2002) Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11242-11243.
- Lei C., Soares T. A., Shin Y., Liu J., Ackerman E. J. (2008) Enzyme specific activity in functionalized nanoporous supports. *Nanotechnology* **19**, 125102-125111.
- Liu B., Zhang W., Zhang Q., Zhang H., Yu J., Yang X. (2012) Facile method for synthesis of hollow porous magnetic microspheres with controllable structure. *J. Colloid Interf. Sci.* **375**, 70-77.
- Liu Y., Liu, H. Y., Qian, J. H., Deng, J. Q., Yu, T. Y. (1995) Immobilization of glucose oxidase in the regenerated silk fibroin membrane-characterization of the membrane structure and its application to an amperometric glucose sensor employing ferrocene as electron shuttle. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **64**, 269–276.
- Long R., K., Reynolds C., Malcolm Y., Schaeffer A., Severs T., Wanekaya A. (2010) Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of therapeutic DNA, RNA, and other biological macromolecules. *Nanotechnology, Science and Applications* **3**, 53-63.
- 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.
- Lu Y., Yin Y., Mayers B. T., Xia Y. (2002) Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol-Gel Approach. *Nano lett.* **2**, 183-186.

- Mahoney R. R., Wilder, T. (1989) Stabilization of lactase (*Escherichia coli*) by milk components and related compounds. *J. Food Sci.* **54**, 899-901.
- Maischberger T., Nguyen T. H., Sukyai P., Kittl R., Riva S., Ludwig R., Haltrich D. (2008) Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. *Carbohydr. Res.* **343**, 2140-2147.
- Ma J., Liu W., Zhang S., Zhao J., Li W. (2011) One-step solvothermal approach for preparing soft magnetic hydrophilic PFR coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals. *J. Alloys Compd.* **509**, 7895-7899.
- Malhotra B. D., Singhal R., Chaubey A., Sharma S. K., Kumar A. (2005) Recent trends in biosensors. *Curr. Appl. Phys.* **5**, 92-97.
- Marchesi S. L., Steers E., Jr., Shifrin, S. (1969) Purification and characterization of the multiple forms of  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli*. *Biochimica Et Biophysica Acta* **181**, 20-34.
- Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451-1463
- Matthews B. W. (2005) The structure of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase. *C. R. Biol.* **328**, 549-556.
- Mazi B. G., Hamamci H., Dungan R. (2012) One-step separation of  $\beta$ -galactosidase from  $\beta$ -lactoglobulin using water-in-oil microemulsions. *Food Chem.* **132**, 326-332.
- Mislovicova D., Gemeiner P., Sandula J., Masarova J., Vikartovska A., Docolomansky P. (2000) Examination of bioaffinity immobilization by precipitation of mannan and mannan containing enzymes with legume lectins. *Biotechnol. Appl. Bioc.* **31**, 153-159.
- Moccelini S. K., Franzoi A. C., Vieira I. C., Dupont J., Scheeren C. W. (2011) A novel support for laccase immobilization: cellulose acetate modified with ionic liquid and application in biosensor for methyl dopa detection. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 3549-3554.
- Morrow A. L., Ruiz-Palacios G. M., Altaye M., Jiang X., Guerrero M. L., Meinen-Derr J. K., Farkas T., Chaturvedi P., Pickering L. K., Newburg



- D. S. (2004) Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J. Pediatr.* **145**, 297-303.
- Nagy, Z., Kiss, T., Szentirmai, A., Biro, S. (2001)  $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production purification and characterization of the enzyme. *Protein Expr. Purif.* **21**, 24-29.
  - Neri D. F. M., Balcao V. M., Carneiro-da-Cunha M. G., Carvalino Jr. L. B., Teixeira, J. A. (2008). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catal. Commun.* **9**, 2334-2339.
  - Nguyen Q. D., Rezessy-Szabó J. M., Bhat M. K., Hoschke Á. (2005) Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochem.* **40**, 2461-2466.
  - North J. P., Chapel H. M. (1987) Comparison of polyacrylamide and agarose support media for detection of oligoclonal IgG bands in CSF. *J. Immunol. Meth.* **98**, 119-122.
  - Numanoglu Y., Sungur S. (2004)  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose–gelatin carrier system. *Process. Biochem.* **39**, 703-709.
  - Ohmiya K., Ohashi H., Kobayashi T., Shimizu S. (1997) Hydrolysis of lactose by immobilized microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 137-146.
  - Okutucu B., Çelem E. B., Önal S. (2010) Immobilization of  $\alpha$ -galactose-containing polymeric beads. *Enzyme Microb. Technol.* **46**, 200-205.
  - Olurode K., Neelgund G. M., Oki A., Luo Z. (2012) A facile hydrothermal approach for construction of carbon coating on TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A* **89**, 333-336.
  - Ovsejevi K., Grazú V., Batista-Viera F. (1998)  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* immobilized on to thiolsulfinate/thiolsulfonate supports for lactose hydrolysis in milk and dairy by-products. *Biotechnol. Tech.* **12**, 143-148.
  - Ozmen E. Y., Sezgin M., Yilmaz M. (2009) Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **57**, 109-114.

- Ozmihci S., Kargi F. (2007) Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: effects of hydraulic residence time. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **30**, 79-86.
- Ozmihci S., Kargi F. (2009) Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: effects of feed sugar concentration. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 106-111.
- Panesar P. S., Kumari S., Panesar R. (2010) Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research.* **2010**, 1-16.
- Panesar P. S., Panesar R., Singh R. S., Kennedy J. F., Kumar H. (2006) Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 530–543.
- Park A. R., Oh D. K. (2010a) Effects of galactose and glucose on the hydrolysis reaction of a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1427-1435.
- Paquet C., Page L., Kell A., Simard B. (2010) Nanobeads Highly Loaded with Superparamagnetic Nanoparticles Prepared by Emulsification and Seeded-Emulsion Polymerization. *Langmuir* **26**, 5388-5396.
- Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F. F., Snijders B., Kummeling I., van den Brandt P. A., Stobberingh E. E. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118**, 511-521.
- Pereira-Rodríguez A., Fernández-Leiro R., González-Siso M. I., Cerdán M. E., Becerra M., Sanz-Aparicio J. (2012) Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. *J. Struct. Biol.* **177**, 392-401.
- Pessela B. C. C., Dellamora-Ortiz G., Betancor L., Fuentes M., Guisán J. M., Fernandez-Lafuente R. (2007) Modulation of the catalytic properties of multimeric  $\beta$ -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. *Enzyme Mikrob. Technol.* **40**, 310-315.
- Pessela B. C. C., Mateo C., Carrascosa A. V., (2003a) One-step purification, covalent immobilization, and additional of a thermophilic poly-his-tagged  $\beta$ -galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2 by using novel heterofunfunctional chelate-epoxy sepabeads. *Biomacromolecules* **4**, 107-113.

- Pessela B. C. C., Vian A., Mateo C., Fernández-Lafuente R., García J. L., Guisán J. M., Carrascola A. V. (2003b) Overproduction of *Thermus* sp. Strain T2  $\beta$ -galactosidase in *Escherichia coli* and preparation by using tailor-made metal chelate supports. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1967-1972.
- Portaccio M., Stellato S., Rossi S., Bencivenga U., Mohy Eldin M. S., Gaeta F. S., Mita D. G. (1998) Galactose competitive inhibition of  $\beta$ -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) immobilized on chitosan and nylon supports. *Enzyme Mikrob. Technol.* **23**, 101-106.
- Puri M., Gupta S., Pahuja P., Kaur A., Kanwar J. R., Kennedy J. F. (2010) Cell Disruption Optimization and Covalent Immobilization of  $\beta$ -D-Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for Lactose Hydrolysis in Milk. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 98-108.
- Rantwijk F., Woudenberg-van Oosterom M., Sheldon R. A. (1999) Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **6**, 511-32.
- Rauf S., Ihsan A., Akhtar K., Ghauri M. A., Rahman M., Anwar M. A., Khalid A. M. (2006) Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetatepolymethylmethacrylate membrane. *J. Biotechnol.* **121**, 351–360.
- Rhimi M., Boisson A., Dejob M., Boudebouze S., Maguin E., Haser R., Aghajari N. (2010) Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a  $\beta$ -galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. *Res. Microbiol.* **161**, 515-525.
- Rogalski J., Dawidowicz A., Leonowicz A. (1994) Lactose hydrolysis in milk by immobilized  $\beta$ -galactosidase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **93**, 223-245.
- Rouwenhorst R. J., Pronk J. T., van Dijken J. P. (1989) The discovery of  $\beta$ -galactosidase. *Trends biochem. Sci.* **14**, 416–418.
- Roy I., Gupta M. N. (2003) Lactose hydrolysis by Lactosym TM immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process. Biochem.* **39**, 325-332.
- Sako T., Matsumoto K., Tanaka R. (1999) Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. *Int. Dairy J.* **9**, 69-80.
- Saleemuddin M.,(1999) Bioaffinity based immobilization of enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **64**, 203–226.

- Salis A., Bhattacharyya M. S., Monduzzi M., Solinas V. (2009) Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **57**, 262-269.
- Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B. D. (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **30**, 489–511.
- Sheldon R. A. (2007) Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1289-1307.
- Shukla H., Chaplin, M. (1993) Noncompetitive inhibition of  $\beta$ -galactosidase (*A. oryzae*) by galactose. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 297–299.
- Schreuder H. A., Welling G. W. (1983) Determination of beta-galactosidase activity in the intestinal tract of mice by ion-exchange high-performance liquid chromatography using epsilon-N-1-(1-deoxylactulosyl)-L-lysine as substrate. *J. Chromatogr.* **278**, 275-282.
- Simos G., Giannakouros T., Georgatsos J. G. (1989) Plant  $\beta$ -galactosidases-purification by affinity-chromatography and properties. *Phytochemistry* **28**, 2587-2592.
- Sinnott M. L. (1978) Ions, ion-pairs and catalysis by the *lacZ*  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* **94**, 1–9.
- Sinnott M. L. (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171–1202.
- Siso M. I. G. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour. Technol.* **57**, 1-11.
- Sowasod N., Nakagawa K., Tanthapanichakoon W., Charinpanitkul T. (2012) Development of encapsulation technique for curcumin loaded O/W emulsion using chitosan based cryotropic gelation. *Materials Science and Engineering C* **32**, 790–798.
- Staniszewski M., Kujawski W., Lewandowska M. (2009) Semicontinuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product e Kinetic model predictions considering glucose repression. *J. Food Eng.* **91**, 240-249.
- Subramani S., Lee S. J., Lee J. M., Choi S. W., Kim J. H. (2009) A facile preparation of microparticles from sulfonated polyester nanoparticles via

emulsion–aggregation process. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **340**, 40-49.

- Sungur S. a Akbulut U. (1994) Immobilization of betagalactosidase onto gelatin by glutaraldehyde and chromium (III) acetate. *J. Chem. Technol. Biot.* **59**, 303-306.
- Suye, S., Kumon, Y., Ishigaki, A. (1998) Immobilization of glucose oxidase on poly-(L-lysine)-modified polycarbonate membrane. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **27**, 245–248.
- Szczodrak J. (2000) Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **10**, 631–637.
- Tanriseven A. S., Dogan E. (2002) A novel method for the immobilization of de  $\beta$ -galactosidase. *Process. Biochem.* **38**, 27–30.
- Taqieddin E., Amiji M. (2005) Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-202 shell microcapsules. *Biomaterials* **25**, 1937-1945.
- Tello-Solís S. R., Jiménez-Guzmán J., Sarabia-Leos C., Gómez-Ruiz L., Cruz-Guerrero A. E., Rodríguez-Serrano G. M., García-Garibay M. (2005) Determination of the Secondary Structure of *Kluyveromyces lactis*  $\alpha$ -Galactosidase by Circular Dichroism and Its Structure-Activity Relationship as a Function of the pH. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 10200-10204.
- Tischer W., Wedekind F. (1999) Immobilized enzymes: methods and applications. *Topics Curr. Chem.* **200**, 95-126.
- Ulezlo I. V., Tsereteli A. K., Portnaya I. B., Bezborodov A. M. (2001)  $\beta$ -Galactosidase of the extreme thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobium* sp. 2905 and its immobilization. *Appl. Biochem. Mikrobiol.* **37**, 41–44.
- Urfer R., Kirschner K. (1992) The importance of surface loops for stabilizing an eightfold beta alpha barrel protein. *Protein Sci.* **1**, 31-45.
- Verma M. L., Barrow C. J., Kennedy J. F., Puri M. (2012) Immobilization of  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 432-437.

- Voget C. E., Flores M. V., Faloci M. M., Ertola R. J. J. (1994) Effects of the ionic environment on the stability of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* **27**, 324-330.
- Wallenfels K., Malhotra O. P. (1960)  $\beta$ -galactosidase. V *The Enzymes*, Vol. 4, Academic Press (Boyer, ed.), pp. 409-418, New York, USA.
- Wine Y., Cohen-Hadar N., Freeman A., Frolow F. (2007) Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **98**, 711–718.
- Xu J., McRae M. A., Harron S., Rob B., Huber R. E. (2004) A study of the relationships of interactions between Asp-201, Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup>, and galactosyl C6 hydroxyl and their effects on binding and reactivity of beta-galactosidase. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 275-284.
- Yang H., Yuan B., Lu Y., Cheng R. (2009) Preparation of magnetic chitosan microspheres and its applications in wastewater treatment. *Science in China series B: chemistry.* **52**, 249-256.
- Yang S. T., Okos M. R. (1989) A new graphical method for determining parameters in Michaelis-Menten-type kinetics for enzymatic lactose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **34**, 763-773.
- Yegorov A. M., Markaryan A. N., Vozniy Y. V., Cherednikova T. V., Demcheva M. V., Berezin I. V. (1988) 4-trifluoromethylumbelliferyl-beta-D-galactopyranoside-its synthesis and application as fluorogenic substrate of beta-galactosidase *Escherichia coli* for screening monoclonal-antibodies by immunosorbent ELISA. *Anal. Lett.* **21**, 193-209.
- Yoshida E., Sakurama H., Kiyohara M., Nakajima M., Kitaoka M, Ashida H., Hirose J., Katayama T., Yamamoto K., Kumagai H. (2012) Bifidobacterium longum subsp. infantis uses two different  $\beta$ -galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. *Glycobiology* **22**, 361-368.
- Zarate S., Lopez-Leiva M. H. (1990) Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. *J. Food Protect.* **53**, 262-268.
- Zhang S., Gao S., Gao G. (2010a) Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto magnetic beads. *Appl. Biochem. Biotech.* **160**, no. 5, 1386–1393.

- Zhang X., Jiang W., Gong X., Zhang Z. (2010b) Sonochemical synthesis and characterization of magnetic separable Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ag composites and its catalytic properties. *J. Alloys Compd*, **508**, 400-405.
- Zhang L., Li Q., Liu S., Ang M., Tade M. O., Gu H. C. (2011) Synthesis of pyramidal, cubical and truncated octahedral magnetite nanocrystals by controlling reaction heating rate. *Adv. Powder Technol.* **22**, 532-536.
- Zhou Q. Z. K., Chen X. D. (2001a) Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* . *Biochem Eng J.* **9**, 33-40.
- Zhou Q. Z. K., Chen X. D. (2001b) Immobilization of β-galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *J. Food Engineering* **48**, 69-74.

## 6 SEZNAM ZKRATEK

BSA	hovězí sérový albumin
DEAE	diethylaminoethyl
ELISA	imunologická metoda k detekci protilátek
Gal	galaktosa
Glu	glukosa
GMA	glycidylmethakrylát
MMA	methylmethakrylát
mPOS-PVA	polysiloxan-polyvinyl alkohol magnetické komposita
ONPG	o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
OR	aglykon
PVA	polyvinylalkohol
X-gal	5-bromo-4-chlor-3- $\beta$ -indoyl-D- galaktopyranosid
ZnO	nativní oxid zinečnatý
ZnO-NČ	nanočástice oxidu zinečnatého