

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie



Přehled technik imobilizace proteinových makromolekul na polymerní nosiče

Immobilization of protein macromolecules onto polymer carriers:

An overview

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Helena Badalcová

Vedoucí práce: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Prohlášení autora:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Podpis:

Děkuji především PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za trpělivost a odborné vedení při vypracování diplomové práce a také rodině za nekonečnou podporu.

Obsah

1	Abstrakt.....	5
2	Abstract.....	6
3	Cíl	7
4	Seznam zkratk.....	8
5	Úvod	9
6	Hlavní část.....	10
6.1	Imobilizace enzymů – teorie.....	10
6.1.1	Adsorpce nekovalentní.....	11
6.1.1.1	Adsorpce na silikáty	11
6.1.1.2	Adsorpce na MOF	14
6.1.1.3	Adsorpce na jílové minerály	16
6.1.2	Kovalentní imobilizace.....	17
6.1.2.1	Chitin a chitosan.....	17
6.1.2.2	Eupergit® C.....	21
6.1.2.3	Anorganické nosiče	24
6.1.3	Entrapment.....	27
6.1.3.1	Sol-gel imobilizace	27
6.1.4	Enkapsulace	31
6.1.4.1	Algináty.....	31
6.1.4.2	Syntetické polymery	32
6.1.4.3	Lipozomy	32
6.1.5	Cross-linking.....	36
6.1.5.1	Glutaraldehyd	37
6.1.5.2	CLECs.....	37
6.1.5.3	CLEAs	40
6.2	Biomedicínské aplikace.....	42
6.2.1	Biosenzory.....	43
6.2.1.1	Amperometrické biosenzory.....	44
6.2.1.2	Optické biosenzory.....	46
7	Závěr.....	47
8	Použitá literatura.....	48

1 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Posluchač: Helena Badalcová

Název diplomové práce: Přehled technik imobilizace proteinových makromolekul na polymerní nosiče

Již od 70. let získávají imobilizované enzymy zájem a pozornost nejen vědeckých a laboratorních pracovníků, ale také průmyslových společností. Enzymy, jedinečné biokatalyzátory vynikající svou specifitou, šetrností k přírodě a schopností reagovat za mírných podmínek, totiž velmi snadno podléhají denaturaci či inhibici. S ohledem na mnohdy vysokou pořizovací cenu by jejich využití mohlo být často nevýhodné. Imobilizační techniky nabízí efektivní řešení tohoto problému a výrazně zjednodušují využití enzymů v průmyslu i výzkumu. Oproti volným formám vykazují imobilizované enzymy mimo jiné vyšší aktivitu, stabilitu a umožňují opakované použití i snadnější oddělení od produktů.

V této práci je uveden přehled základních imobilizačních metod – prosté fyzikální adsorpce a kovalentní vazby na nosič, entrapmentu, enkapsulace a beznosičových technik využívajících cross-linking. Na závěr jsou nastíněny možné biomedicínské aplikace a také využití imobilizovaných enzymů v biosenzorech.

2 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Student: Helena Badalcová

Title of Thesis: Immobilization of protein macromolecules onto polymer carriers:
An overview

Since the 70s, the immobilised enzymes have been getting the attention of not only scientific and laboratory workers, but also industrial companies. Enzymes are unique biocatalysts, which are distinguished by their specificity, environment-friendliness and the ability to react under mild conditions can be easily subject of denaturation or inhibition. With regard to the usually high cost of purchase, the use of these enzymes could often be disadvantageous. Immobilization techniques offer an efficient solution to this problem and greatly simplify the use of enzymes in industry and research. Compared to the free forms, immobilized enzymes show greater activity, stability and allow repeated use as well as easier separation from products.

This thesis contains an overview of the basic methods of immobilization - physical absorption and covalent bonds to the carrier, entrapment, encapsulation and carrier-free techniques using cross-linking. Finally, we outline possible biomedical applications as well as the use of immobilised enzymes in biosensors.

3 Cíl

Cílem této práce je nastítnit přehled nejčastěji používaných metod pro imobilizaci enzymů a to jak v laboratorních podmínkách, tak v průmyslovém měřítku a pomocí nejrozšířenějších nosičů ukázat konkrétní příklady. Dále také zhodnotit výhody a nevýhody jednotlivých postupů a vzájemně je porovnat a nakonec poukázat na možné biomedicínské aplikace imobilizovaných enzymů.

4 Seznam zkratek

APTES — 3-aminopropyltriethoxysilan
CLEs — Cross-linked dissolved enzymes
CLEAs — Cross-linked enzyme aggregates
CLECs — Cross-linked enzyme crystals
CSDEs — cross-linked spray-dried enzymes
CYCU — Chung Yuan Christian University
FAD — Flavinadenindinukleotid
FITC — Fluorescein-isothiokyanát
GA — Glutaraldehyd
GDH — Glukosadehydrogenáza
GO — Glukosaoxidáza
GOS — Galakto-oligosacharidy
HRP — Avidin-peroxidáza
MBS — Mezoporézní benzenosilikáty
MCM-41 — Mobil Composition of Matter no 41
MOF — Metal Organic Frameworks
MP-11 — Mikroperoxidáza 11
MPS — Mezoporézní silikáty
NAD — Nikotinamidadenindinukleotid
PCP — Porézní koordinační polymery
PEG — Polyethylenglykol
PMO — Periodické mezoporézní organosilikáty
PNIPAAm — Poly(N-isopropylakrylamid)
PQQ — Pyrolochinolinochinon
PVA — Polyvinylalkohol
SBA-15 — Santa Barbara Amorphous no 15
TPP — tripolyfosfát sodným

5 Úvod

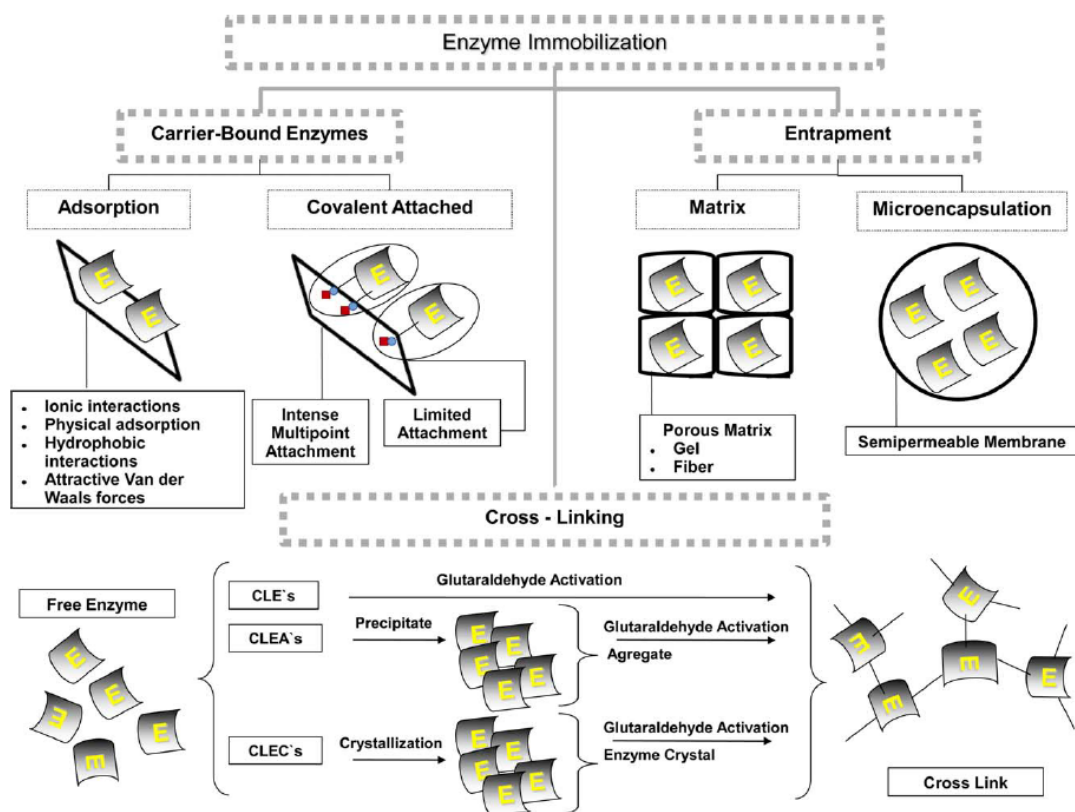
Enzymy jsou látky vykazující vlastní biokatalytickou aktivitu, tedy urychlující reakce probíhající ve všech organismech. Jejich využití je široce rozšířené nejenom v průmyslu a potravinářství, ale také v medicíně, genetickém inženýrství či jako analytických činidel. Od počátku 20. století dochází k širokému uplatňování mikrobiálních enzymů, zdokonalování jejich získávání, čištění a produkci (1). Oproti klasickým chemickým katalyzátorům jsou díky získávání z obnovitelných zdrojů šetrnější k životnímu prostředí, navíc působí v příznivějších podmínkách, kterými rozumíme fyziologické pH, mírnou teplotu i tlak, vodné prostředí (2). Jedním z nástrojů k ještě efektivnějšímu využití enzymů je jejich imobilizace.

První enzymová imobilizace byla sice poprvé popsána již v roce 1916 Nelsonem a Griffinem, ale až teprve na konci 70. let mohl být každý enzym imobilizován vhodně zvolenou metodou nebo na vhodný nosič při konkrétních podmínkách (3). Výhody imobilizovaných enzymů oproti jejich volným formám jsou nesporné – zvýšení stability a odolnosti k inhibitorům (4), možnost opakovaného použití, zjednodušení oddělení produktů reakce vzhledem k nerozpustnosti imobilizovaných enzymů a větší čistota produktů. Velkým přínosem je také aktivita mnohých imobilizovaných enzymů v organických rozpouštědlech, ačkoliv jejich volná forma vykazuje katalytickou aktivitu pouze ve vodném prostředí (5). Mimo jiné můžeme zohlednit také ekologický a ekonomický aspekt, neboť ceny enzymů jsou všeobecně velmi vysoké a jejich recyklace tedy může výrazně snížit náklady.

6 Hlavní část

6.1 Imobilizace enzymů – teorie

Metody imobilizace enzymů lze rozdělit do několika základních kategorií: adsorpce, kovalentní imobilizace, entrapment, enkapsulace a cross-linking. Jednotlivé metody lze ovšem také kombinovat. Základní přehled je uveden na obrázku 1.



Obrázek 1 Hlavní metody imobilizace enzymů (71)

6.1.1 Adsorpce nekovalentní

Adsorpce je nejstarší metoda imobilizace enzymů. Mezi její výhody patří jednoduchost, reverzibilita a také možnost zachování vysokého stupně aktivity enzymu oproti jiným metodám, protože nedochází ke kovalentní chemické vazbě a díky tomu ani k modifikaci struktury (3). Vazba enzymu na pevný nosič totiž probíhá prostřednictvím slabých vazebných interakcí, jako jsou van der Waalsovy síly, které jsou ale příliš slabé a proto musí být podpořeny ještě dalšími silami - iontovými vazbami, hydrofobními interakcemi a vodíkovými můstky (6). Elektrostatické síly ovšem mohou působit i mezi molekulami imobilizovaného enzymu, proto je vhodnější provádět reakci při hodnotách pH blízkých isoelektrickému bodu konkrétního enzymu. Průběh imobilizace může rovněž ovlivnit teplota a samozřejmě i fyzikálně chemické vlastnosti použitého nosiče (jeho povrchová plocha, průměr pórů i typy funkčních skupin) a koncentrace substrátu. Adsorpce může probíhat jak na povrch nosiče, tak v pórech mezoporézního materiálu. Nevýhodou vyplývající ze slabé vazby je obvykle nedostatečná síla k udržení navázaného enzymu a jeho vymývání z nosiče (2). Pro prevenci unikání enzymu z nosiče je vhodné používat enzymy imobilizované pouhou adsorpcí spíše v hydrofobním prostředí (7). Pro úspěšnou imobilizaci je nejen v tomto případě klíčové zvolit správný nosič, kterých je k dispozici celá řada (8). Výhodou této metody je také možnost nosné matrice ve většině případů regenerovat (9).

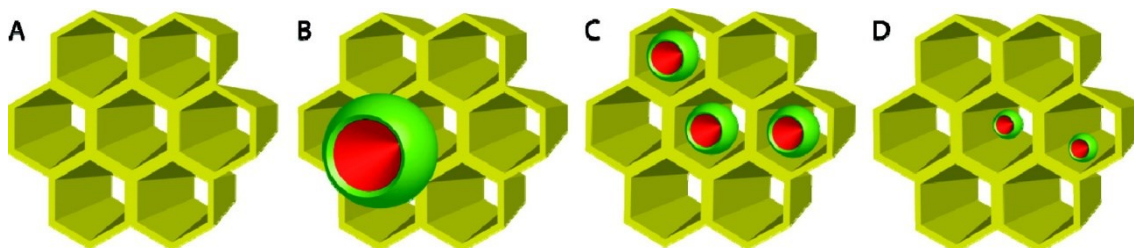
6.1.1.1 Adsorpce na silikáty

Řešením slabé vazby enzymu může být například využití specifických a na míru připravených porézních materiálů jako nosičů, případně chemická úprava povrchu nosiče nebo enzymu, jako například glykosylace enzymu, díky které dojde k vytvoření vodíkových můstků mezi nosičem a proteinem. (10) Například hydroxynitril lyáza získaná z mandlí stromu *Prunus amygdalus* se díky glykosylované formě může vázat na nosiče vodíkovými vazbami (11).

Elektrostatické interakce mezi enzymem a silikátem jsou nejsilnější, pokud je adsorpce prováděna při hodnotách pH, při kterých enzym vykazuje pozitivní náboj (tzn. hodnota pH nižší než pI zvoleného enzymu), ale zároveň při hodnotách pH vyšších než 3, kdy nese silikát záporný náboj. Čím silnější je kladný náboj proteinu, tím pevnější je ovšem nejen vazba, ale také výraznější vzájemné odpudivé síly mezi adsorbovanými molekulami enzymu, které mohou vést až k desorpci (12). Takto je tedy možné změnou pH ovlivňovat průběh reakce.

Dle definice IUPAC dělíme porézní materiály na mikroporézní (velikost pórů < 2nm), mezoporézní (2–50nm) a makroporézní (>50nm).

Za účelem imobilizace enzymů jsou hojně využívány mezoporézní silikáty (MPS) a to již od 90. let od syntézy silikátu MCM-41 (13) a později také SBA-15 (s větší velikostí pórů, která rozšiřuje možnost imobilizace i pro objemnější proteiny) (14), které byly rovněž testovány například jako drug-delivery systémy. Jejich předností je velký specifický vazebný povrch, jednotná a specifická velikost pórů, která odpovídá potřebám imobilizace biomolekul. Klíčové je však zvolit nosič s odpovídající velikostí pórů pro imobilizovaný enzym, jak je zobrazeno na obrázku 2.

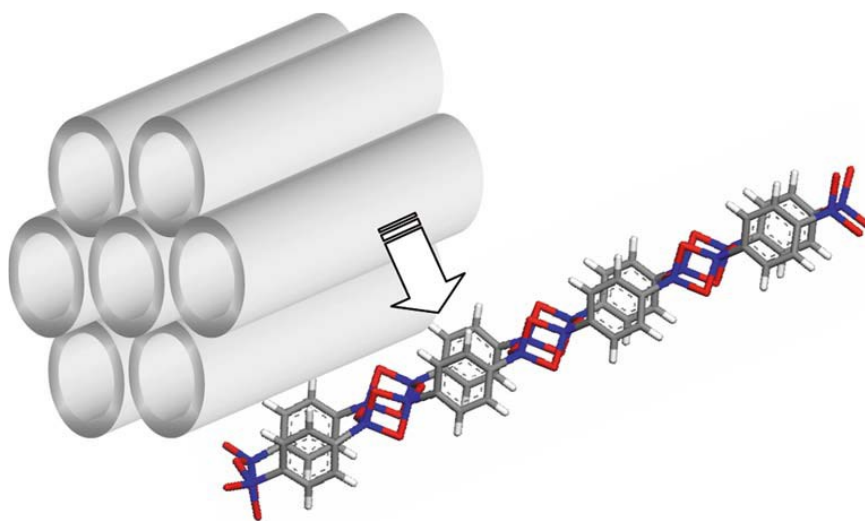


Obrázek 2 A) Schéma mezoporézního silikátu. (B) Enzym je příliš velký, aby se vešel do pórů a je adsorbován hlavně na vnějším povrchu MPS. (C) Enzym je adsorbovaný uvnitř pórů, v této situaci se velikost pórů a enzymu shoduje. (D) Opak případu B, póry jsou mnohem větší než enzym a ten je náchylný k vymývání. (15)

Pro výrazné zvýšení kapacity nosičů MCM-41 a SBA-15 je stále vyvíjeno mnoho funkčních i strukturních úprav (14), například inkorporace kovových, kupříkladu hliníkových nebo titanových atomů (12), nebo připojení alifatických uhlovodíků, organosilanů, thiolových, vinylových, fenylových, aminových a perfluorových skupin (16). Vyskytují se také různorodé morfologické formy jako tyčky,

hexagony, dutá vlákna, aj. (17). Tyto nosiče jsou využívány například k imobilizaci cytochromu c, trypsinu, papainu, peroxidázy, penicilin G acylázy, avidin-peroxidázy, α -chymotrypsinu, α -amylázy, lysozymu, cytochromu P450 a mnoha jiných (14, 18).

Další modifikací MPS jsou hybridní periodické mezoporézní organosilikáty (PMO). Tyto látky mají ve stěně póru zabudovanou organickou skupinu, obsahují tedy organickou i anorganickou část. Poprvé byly uvedeny v roce 1999 (19). PMO jsou připravovány s využitím přemostěných organosilanů, $(R'O)_3Si-R-Si(OR')_3$, jako prekurzorů (20). Pro potřebu imobilizace konkrétních enzymů lze tedy zvolit vhodný substituent R. Například pro lipázy jsou využívány především hydrofobní skupiny, které vytváří výhodné prostředí pro aktivní konformaci enzymu (15), díky které je zachována vyšší aktivita enzymu. Postupně jsou syntetizovány i odlišné modifikace PMO: mezoporézní benzenosilikáty (MBS), jehož struktura je zobrazena na obrázku 3, aminopropyl-MBS, ethylendiamin-MBS a další (21).



Obrázek 3 Schéma mezoporézního benzenosilikátu (21)

Dalším typem mezoporézního materiálu využívaného k adsorpci enzymů jsou tzv. mezoporézní buněčné pěny (mesoporous cellular foams - MCF) s větším objemem a rozměrem pórů. (22) Úspěšnost imobilizace však závisí na správně zvolené funkcionalizaci povrchu. Například modelové enzymy invertáza a glukooamyláza vykazovaly vyšší aktivitu při imobilizaci na MCF s vhodně modifikovaným povrchem než na silica gel i než enzymy ve volné formě (23).

6.1.1.2 Adsorpce na MOF

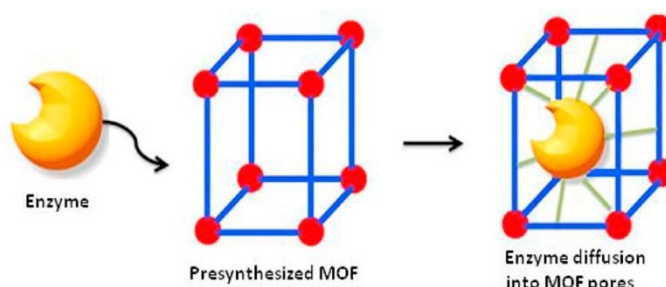
Jako materiál s mimořádnými vlastnostmi jsou označovány tzv. MOF (metal organic frameworks) nebo také PCP (porézní koordinační polymery). Jedná se o porézní krystalické hybridní sloučeniny, kovové ionty jsou různě propojeny koordinačními vazbami s organickými linkery. Tím vzniká všestranná trojdimenzionální struktura s mnoha vazebnými místy (24).

MOF vynikají vysokou chemickou i tepelnou stabilitou, možností předem navrhnout požadovanou strukturu, modifikovatelností povrchu, nebývalou vnitřní porozitou a rovnoměrností pórů. Svým obrovským povrchem překonávají dříve známé porézní materiály (25).

MOF jsou syntetizovány od 90. let a jejich hlavní využití tkví ve skladování a separaci plynů, katalýze, testovány jsou také jako drug-delivery systémy. A samozřejmě jsou používány jako nosiče při imobilizaci bioaktivních molekul, mimo enzymů například také DNA, léčiv i jiných proteinů (24).

Jako centrální kovové ionty lze využít prakticky jakýkoliv kov, jeho koordinační číslo poté určuje molekulárně-geometrické uspořádání materiálu. Nejobvyklejší linkery jsou potom karboxyláty, aminy, nitráty, fosfáty nebo sulfonáty (24).

Adsorpce v pórech nosiče je bohužel limitovaná menší velikostí pórů, které se obvykle nacházejí v řádu mikrometrů, proto mnoho z důležitých rozměrnějších enzymů nelze touto metodou imobilizovat. Souhra velikosti póru a molekuly enzymu je přitom v této metodě klíčová, jak je naznačeno na obrázku 4. Přesný mechanismus vazby enzymu v pórech nebyl zatím zcela objasněn (26).



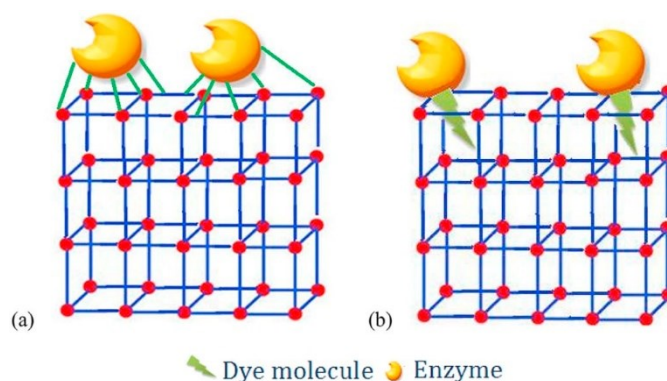
Obrázek 4 Schéma adsorpce enzymu v MOF (24)

Příkladem vhodně zvoleného nosiče je případ imobilizace mikroperoxidázy-11 (MP-11), kde je tento faktor již od počátku zohledňován. Enzym MP-11 je hemový undekapeptidový zbytek cytochromu c, který si stále zachovává peroxidázovou

aktivitu. Jeho úspěšná imobilizace byla provedena pomocí fyzikální adsorpce na jeden z mála mezoporézních MOF Tb-TATB, neboli Tb-meso MOF založeném na trojmocných iontech terbia a triazin-1,3,5-tribenzoátu jako organickém linkeru (27), přičemž vzniklý komplex imobilizovaného enzymu a nosiče vykazoval výrazně lepší vlastnosti než srovnávací vzorek využívající jako nosič MCM-41 i než volný enzym, který velmi rychle podléhá agregaci (28).

Vynikající výsledky vykazovala také prasečí pankreatická lipáza, jež byla dále využita k syntéze warfarinu, imobilizovaná na několik druhů mikroporézních MOF. Imobilizace proběhla bez jakékoliv chemické modifikace enzymu, pouze fyzikální adsorpcí, tudíž byla zachována vysoká katalytická účinnost enzymu a opakovatelnost reakce (29).

Testována byla také například imobilizace lakázy na další mezoporézní Cu-MOF, avšak v tomto případě je potřeba podmínky ještě optimalizovat. Při vysoké zachované počáteční aktivitě (95%) totiž dochází k rychlému poklesu aktivity po opakování biokatalytické reakce i při skladování ve vodném prostředí pravděpodobně kvůli velké velikosti pórů, jež způsobuje vymývání enzymu (30). Jinou možností, kromě imobilizace v pórech nosiče, je adsorpce na jeho povrchu. Probíhá pomocí navázání malých molekul barviva, ve velikosti v řádu mikrometrů, na enzym. Barvivo poté díky svým malým rozměrům podléhá fyzikální adsorbci v mikropórech nosiče, zatímco enzym je díky tomu stabilně zakotven na povrchu (obrázek 5).



Obrázek 5 Adsorpce molekuly barviva navázané na enzymu v MOF (24)

Jako příklad poslouží konjugace trypsinu s fluorescein-isothiokyanátem (FITC) a následná reakce s CYCU-4, tj. mikroporézním MOF založeném na iontech

hliníku. Stabilita i opakovatelnost katalytické reakce zůstala uspokojivě zachována. Značnou výhodou této metody je ovšem především časová nenáročnost celého procesu, zejména v porovnání s ostatními postupy, u kterých je nezbytná modifikace a funkcionalizace jednotlivých činidel (31).

MOF jsou široce aplikované také v dalších metodách imobilizace, pomocí kovalentní vazby a in-situ entrapmentu, které budou zmíněny dále.

6.1.1.3 Adsorpce na jílové minerály

Méně rozšířeným, přesto stále využívaným materiálem jsou jílové minerály. Jedná se o hydratované hlinité nebo hořčikové fylosilikáty hojně se vyskytující v přírodě. Jsou tedy snadno dostupné a jejich pořizovací cena není tak vysoká. Mají dvourozměrnou vrstvenou strukturu skládající se z tetraedrů a oktaedrů. Vyznačují se velkým povrchem, schopností bobtnat a vlastnostmi iontoměniče. Dalším využívaným mechanismem imobilizace kromě prosté fyzikální adsorpce je kovalentní vazba enzymu (32).

Úspěšně byla imobilizována například glukoamyláza na montmorillonit, v němž byl enzym interkalován a to pomocí dvou metod, fyzikální adsorpcí i kovalentní vazbou, která v tomto případě vykazovala vyšší aktivitu enzymu (66%), zatímco pomocí fyzikální adsorpce si imobilizovaný enzym uchoval 49% své původní aktivity (33).

Pro zvýšení efektivity adsorpce byly testovány také různé úpravy jílového materiálu, například modifikací bentonitu kovalentním navázáním různých aminokyselin do jeho mezivrstev, kupříkladu cysteinu při imobilizaci katalázy (34), histidinu při imobilizaci IgG (35) nebo tryptofanu při imobilizaci lysozymu (36). V jiném případě byl pozměněn povrch bentonitu jednou až dvěma vrstvami surfaktantu ke zvýšení lipofility pro účel imobilizace lipázy produkované kvasinkou *Candida rugosa*. Jako nejvhodnější se projevila jednoduchá vrstva surfaktantu, kde na rozdíl od dvojité vrstvy nedochází k iontovým interakcím, které snižují aktivitu enzymu (37).

6.1.2 Kovalentní imobilizace

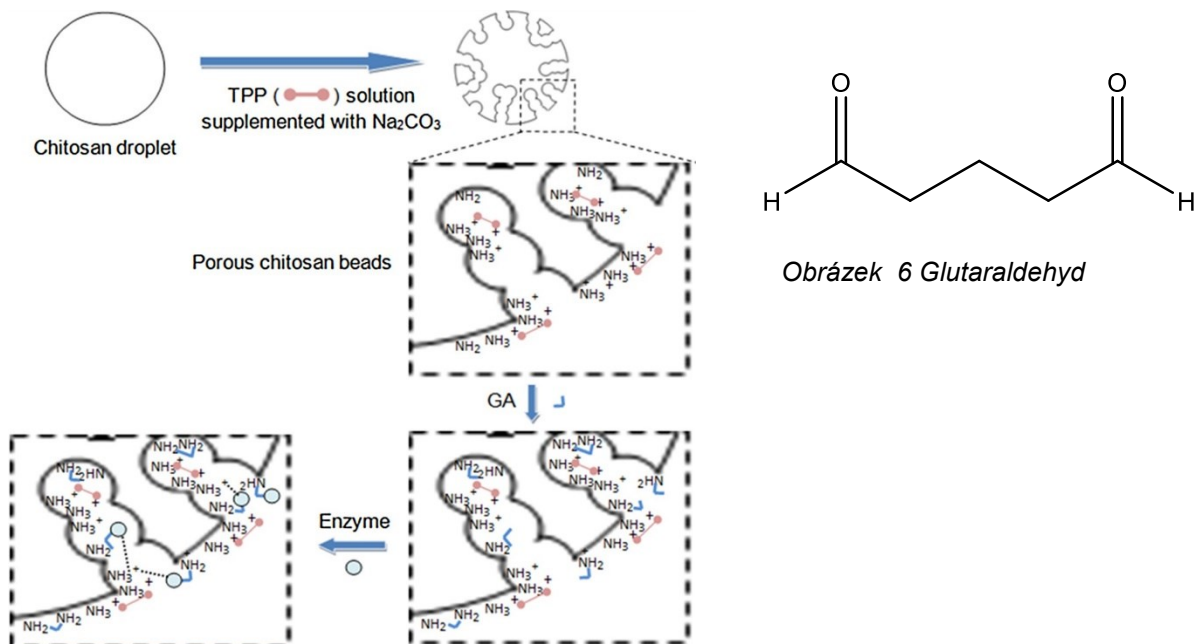
Tento způsob enzymové imobilizace probíhá prostřednictvím kovalentních vazeb mezi aktivními aminokyselinovými zbytky z proteinu a funkčními skupinami na povrchu nosiče (3), které je ovšem obvykle v případě anorganických materiálů potřeba upravit připojením funkčních skupin a aktivovat (38).

Metoda vyniká zejména pevností vazby, zvláště je-li mnohonásobná, čímž účinně brání vymývání enzymu z nosiče a odolává i drastičtějším reakčním podmínkám. Přináší s sebou ovšem riziko modifikování vlastností enzymu, ke kterým dochází ať už z fyzikálního, nebo chemického hlediska právě ireverzibilní vazbou a vlivem konformačních změn (3), jež mohou vést i k deaktivaci enzymu. Z tohoto důvodu se některé zkušební imobilizace nových enzymů, provádějí v přítomnosti substrátu, jeho analogu nebo inhibitoru enzymu. Ten reverzibilně obsadí aktivní místo enzymu, při následné reakci s nosičem pak nedojde k nežádoucí změně konformace (39, 40). Někteří zástupci nejběžněji užívaných skupin nosičů, jako jsou biopolymery, syntetické pryskyřice nebo anorganické polymery (41) jsou uvedeny níže.

6.1.2.1 Chitin a chitosan

Chitin a především jeho hlavní deacetylovaný derivát chitosan se řadí mezi přírodní polyamínosacharidy. Jsou snadno dostupné, získávají se přečištěním vedlejších produktů potravinářského průmyslu zpracovávajícího mořské živočichy. V lineárním polyglukosaminovém řetězci chitosanu se v každém monomeru nachází jedna aminoskupina a dvě hydroxylové skupiny. V oblasti fyziologického pH je nerozpustný (42), bazické aminoskupiny umožňují rozpustnost ve vodném kyselém prostředí, ve kterém dochází k ionizaci na —NH_3^+ (43). Tento pozitivní náboj umožňuje reakci chitosanu s aniontovými zbytky enzymů a tím také imobilizaci formou adsorpce. Reaktivní aminoskupiny glukosaminu mohou být také snadno derivatizovány glutaraldehydem (GA) tak, aby se zvýšila mechanická odolnost a stabilita chitosanu a také aby bylo možné kovalentně imobilizovat enzymy, schéma je zobrazeno na obrázku 7.

Chitosanové kuličky jsou nejprve syntetizovány ionotropní gelací s tripolyfosfátem sodným (TPP) a porogenem uhličitanem sodným. Následným přidáním glutaraldehydu dojde k zesíťování (cross-linkingu) kladně nabitých aminoskupin na inter- a intramolekulární úrovni (44).



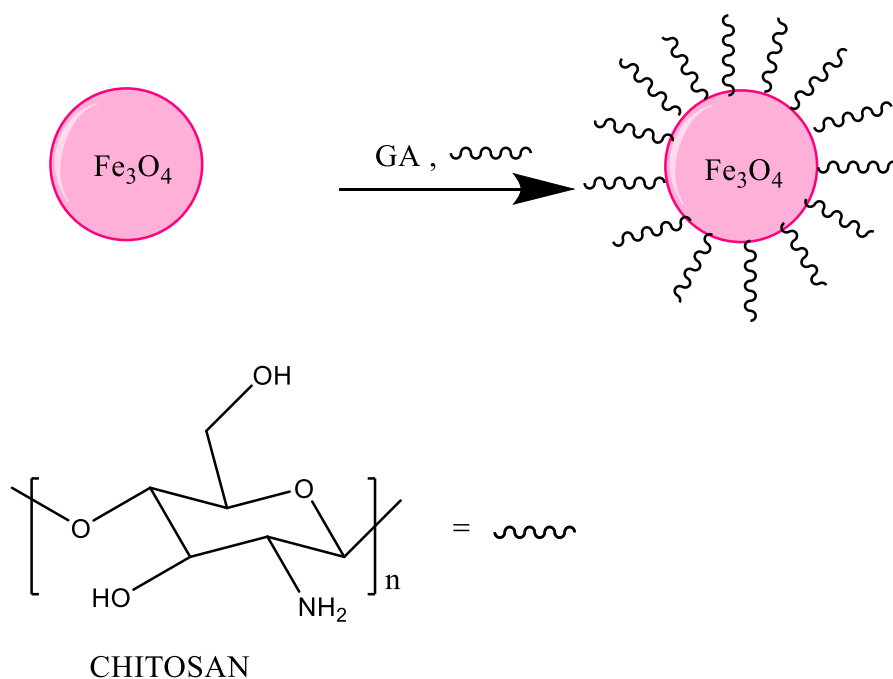
Obrázek 7 Schéma přípravy a derivatizace chitosanu (44)

Vlastnosti chitosanu je dále možné upravovat také použitím porogenu při jeho přípravě. Například na chitosanové kuličky ošetřené při syntéze porogenem a glutaraldehydem byla velmi úspěšně imobilizována β -d-galaktosidáza, významný enzym široce využívaný například v potravinářství k získání mléčných výrobků s nízkým obsahem laktózy či k syntéze galakto-oligosacharidů (GOS). (44)

Spolu se schopností tvořit gel, biologickou nezávadností a dalšími přednostmi se jeví jako ideální sloučenina pro použití v biotechnologii a medicíně. Chitin/chitosan můžeme použít ve formě komerčně dostupných vloček, prášků, kuliček nebo perlového gelu. Rozmanitějších forem docílíme přípravou v laboratoři, například dutých vláken, vláken, membrán, aj. Princip spočívá v rychlém rozpuštění chitosanu ve zředěném roztoku organické kyseliny, zvyšováním pH se tvoří viskózní roztok a nakonec reakcí s polyanionickými sloučeninami vznikají ve vodě nerozpustné ionotropní komplexy. (43)

Například chitosanové kuličky, připravené pomocí zesíťování chitosanu glyoxalem a následném ošetření glutaraldehydem, jenž zvyšuje jejich odolnost vůči kyselému prostředí, byly použity k imobilizaci pepsinu a katalázy, které po imobilizaci vykazovaly zvýšenou tepelnou a skladovací stabilitu (45, 46).

Mimo jiné byl chitosan také úspěšně použit pro imobilizaci proteázy α -chymotrypsinu, a to ve formě magnetických nanočástic oxidu železnatoželezitého (Fe_3O_4). Tyto nanočástice jsou netoxické, biologicky kompatibilní a široce užívané v mnoha modifikacích jak v biotechnologii, tak v medicíně. Ačkoliv nejsou škodlivé, nanočástice Fe_3O_4 nejsou příliš stabilní a snadno podléhají oxidaci, jejich povrch musí být tedy náležitě upraven ochrannou vrstvou. V tomto případě byla použita metoda tzv. double-crosslinking, Fe_3O_4 je nejprve aktivován glutaraldehydem a teprve poté reaguje s chitosanem za vzniku stabilní core/shell struktury (obrázek 8) se superparamagnetickými vlastnostmi (47).



Obrázek 8 Schéma vzniku core/shell struktury Fe_3O_4 a chitosanu; GA - glutaraldehyd

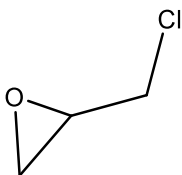
Využití komplexu Fe_3O_4 @Chitosan jako nosiče pro kovalentní imobilizaci α -chymotrypsinu kromě ostatních výhod takto upravených enzymů také velmi snižuje náklady celého procesu zvláště pro průmyslové využití (48).

Také řada dalších biokatalyzátorů byla imobilizována na tento magnetický nanomateriál, například lipáza produkovaná kvasinkou *Candida rugosa*, v tomto

případě bylo hlavní předností mimo snížených nákladů také snadné oddělení komplexu enzym-nosič z reakční směsi a to při zachování velmi vysoké aktivity i po několika cyklech (49).

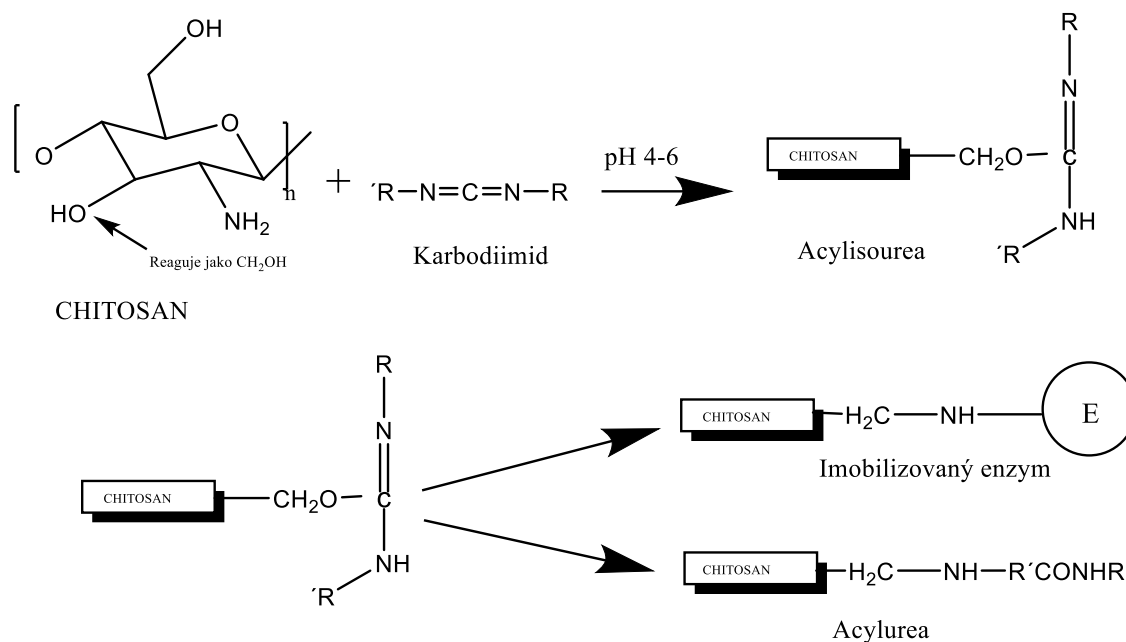
Jako další příklad poslouží imobilizace modelových enzymů, acetylcholinesterázy a β -glukosidázy jako relativně nízkomolekulárního proteinu, na polystyrenové mikrotitrační destičky potažené vrstvou chitosanu. Pro zvýšení efektivity procesu byl použit glutaraldehyd, jehož molekula má na obou stranách aldehydy, které se kovalentně váží na aminy, čímž vytváří silnou vazbu mezi chitosanem a biomolekulami. V porovnání s klasickou mikrotitrační destičkou vykazuje chitosanem pokrytá destička vysokou vazebnou schopnost enzymů a nabízí se tedy jako slibný základ pro výrobu biosenzorů. Nevýhodou této metody je ovšem nestabilita chitosanu v kyselém prostředí (50).

Dalším typem nosiče na bázi chitosanu jsou hybridní nanočástice chitosanu a alginátu v poměru 1:1, jenž vytváří polyelektrolytový komplex s kladně nabitými aminoskupinami chitosanu a opačně nabitými karboxyláty z alginátu. Tento nosič je dále aktivován epoxy skupinou z epichlorohydrinu, čímž je upravena jeho hydrofobicita a je tudíž vhodný k imobilizaci lipáz (51, 52).



Obrázek 9 Epichlorhydrin

Aktivace hydroxylové skupiny glukosaminu byla provedena při imobilizaci lipázy produkované kvasinkou *Candida rugosa* pomocí karbodiimidu, který se obecně používá jako karboxyl-aktivující činidlo pro amidovou vazbu s primárními aminy. Hypotetické schéma je zobrazeno na obrázku 10. Aktivace hydroxyly je efektivním způsobem pro imobilizaci lipáz s jediným omezením, a to nutností provádět reakci na hydratovaný chitosan, neboť jinak ve vodném roztoku podléhá bobtnání, které snižuje aktivitu enzymu (53).



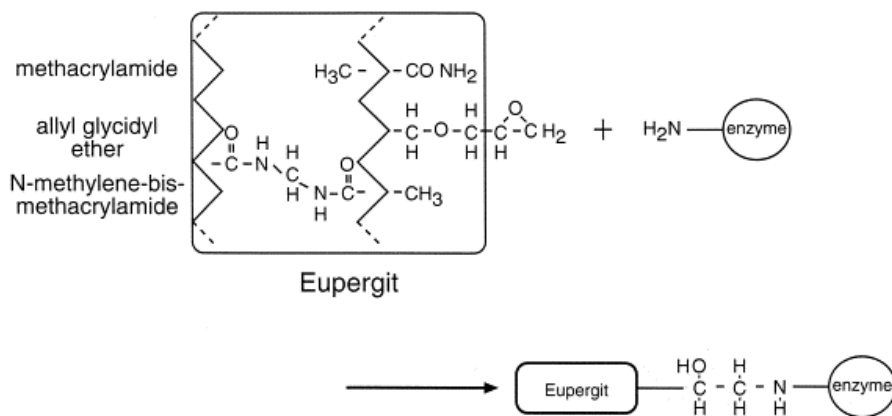
Obrázek 10 Hypotetické schéma imobilizace enzymu na chitosan pomocí aktivace karbodiimidem

Upravit vlastnosti chitosanu lze také inkorporací zlatých nanočástic, které výrazně zlepšily stabilitu enzymu při následné přípravě biosenzoru, a také se zvýšila citlivost biosenzoru. Zlaté nanočástice silně vážou enzym (vazba probíhá zejména přes aminové skupiny a cysteinové zbytky), čímž se zabránilo jeho vymývání (54, 55).

6.1.2.2 Eupergit® C

Eupergit® C byl vyvinut mezi lety 1974 – 1980 firmou Röhm v Německu. Jedná se o makroporézní kuličky (beads) vzniklé polymerizací methakrylátu. Díky své struktuře je chemicky i mechanicky odolný v rozmezí pH 0 – 14, ani po výrazných změnách v tomto rozmezí nepodléhá bobtnání nebo srážení. Výrazné opotřebení nevykazoval ani po 650 cyklech ve velkoobjemovém průtočném chemickém reaktoru (stirred tank reactor) (56).

Eupergit® C váže proteiny prostřednictvím oxiranových skupin (obrázek 11), které reagují při neutrálním a alkalickém pH s aminoskupinami proteinů za vzniku kovalentních vazeb, které jsou dlouhodobě stabilní v rozmezí pH od 1 do 12.

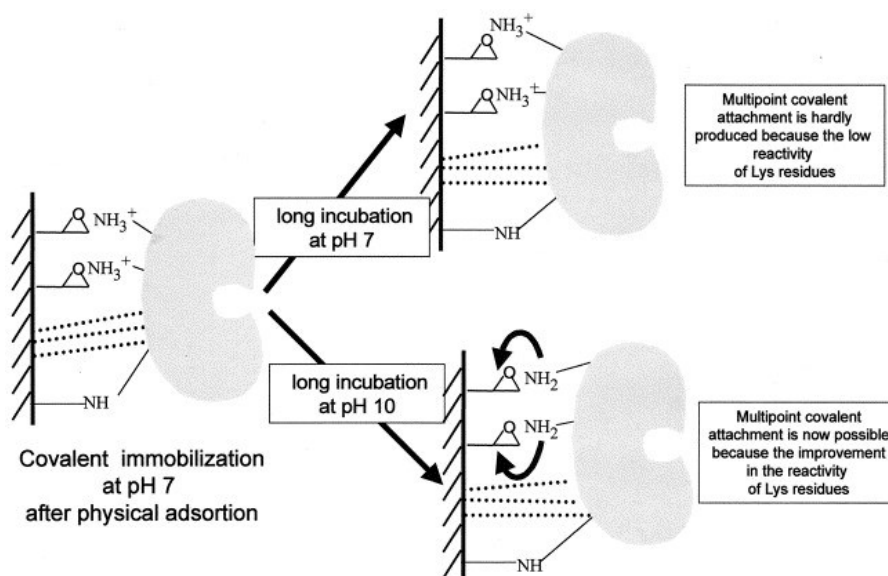


Obrázek 11 Vazba enzymu na Eupergit® C prostřednictvím oxiranových skupin (56)

Vazba může probíhat také prostřednictvím sulfhydrylových a karboxylových skupin enzymu v kyselém, neutrálním i alkalickém prostředí (56). Výjimkou ovšem není ani vazba zprostředkovaná aktivací glutaraldehydem.

Velké množství enzymů bylo úspěšně imobilizováno na Eupergit® C, a to jak v laboratorním, tak v průmyslovém měřítku. Například obtížně imobilizovatelná cyklodextrin glukosyltransferáza (CGTáza) produkovaná druhem *Thermoanaerobacter*, která katalyzuje čtyři možné reakce. Na konci té nejdůležitější reakce jsou produkty známé jako cyklodextriny. Ty jsou široce využívané v potravinářství, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Oproti ostatním metodám si CGTáza v tomto případě zachovala větší aktivitu a také vysokou odolnost proti tepelné a acidobazické denaturaci (57).

Pro zvýšení stability enzymu je možné použít k imobilizaci vícebodovou kovalentní vazbu. Princip spočívá v počáteční reakci enzymu a nosiče za mírných podmínek při teplotě 20°C a pH 7. V tomto prostředí se vytvoří menší množství slabších vazeb, protože tyto podmínky nejsou vhodné pro reaktivní skupiny enzymu, například lysinové zbytky (obrázek 12). Dalším krokem je inkubace již imobilizovaného enzymu s nosičem za drastičtějších podmínek, přičemž sledované proměnné jsou teplota, hodnota pH a čas. Nakonec jsou zbývající vazebná místa nosiče zablokována, aby nedocházelo k dalším interakcím s enzymem. Imobilizované enzymy poté vykazovaly mnohonásobně vyšší konformační stabilitu než volná forma (58).

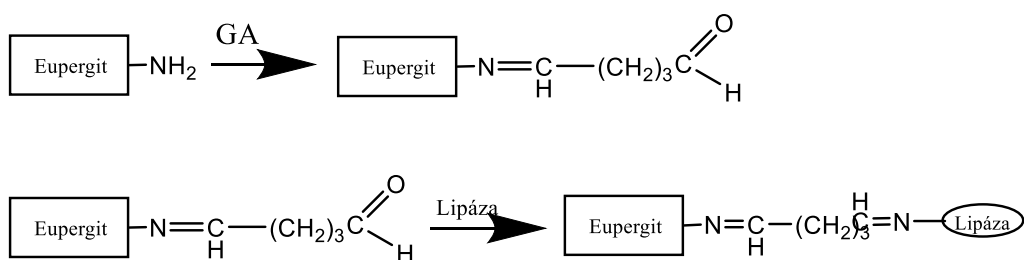


Obrázek 12 Schéma zvýšení stability enzymu pomocí vícebodové kovalentní vazby změnou reakčních podmínek (58)

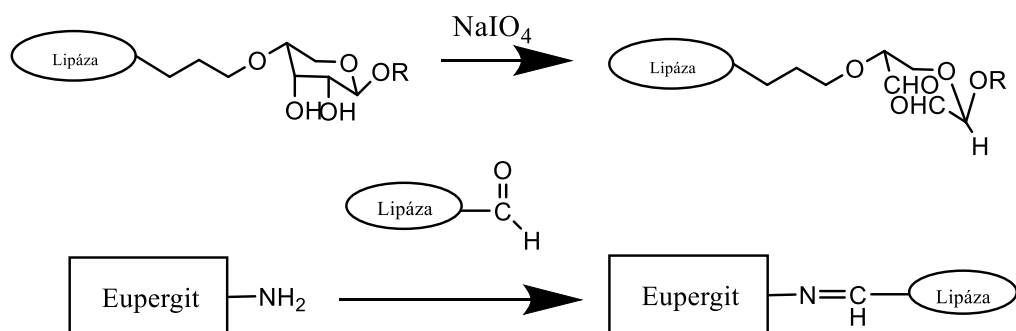
Také lipáza byla imobilizována na Eupergit® C, pro srovnání hned třemi metodami. Klasickou vazbou přes oxiranovou skupinu (obrázek 11), pomocí aktivace glutaraldehydem (obrázek 13 A.) a nakonec oxidací enzymu jodistanem sodným a navázáním aminových skupin na nosič a jejich následnou vazbou přes uhlovodíkový řetězec (obrázek 13 B.). Nejvyšší hydrolytickou aktivitu si enzym zachoval poslední zmiňovanou metodou, stejně jako stabilitu ve vodném prostředí, zvýšil se také poločas enzymu oproti volné formě a to zvláště při vyšších teplotách (59).

Při imobilizaci β -glukosidázy byla nejprve zablokována aktivní místa enzymu reakcí s inhibítorem (glukózou) a teprve následně provedena imobilizace, čímž se zvýšil výtěžek reakce o 20%. Při vynechání tohoto kroku dochází totiž k nežádoucí inaktivaci enzymu interakcí oxiranových skupin Eupergitu s aktivním místem enzymu. Pokud je po imobilizaci komplex dále inkubován s bovinním sérovým albuminem (BSA), výtěžek vzroste až o 30%, a to díky dodatečnému zablokování všech nezreagovaných oxiranových skupin (60).

A.



B.



Obrázek 13 A. Vazba enzymu na Eupergit pomocí aktivace glutaraldehydem (GA); B. Oxidace enzymu jodistanem sodným a následná imobilizace na Eupergit

6.1.2.3 Anorganické nosiče

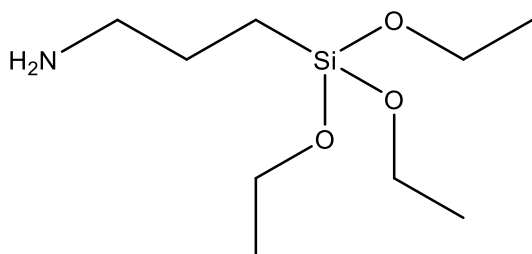
Anorganické nosiče mají oproti organickým polymerům o něco menší pozornost a to zejména díky snadné výrobě požadovaných struktur a dostupností reaktivních funkčních skupin organických polymerů (61).

Mezi rozšířené anorganické nosiče pro kovalentní imobilizaci enzymů patří již výše zmiňované mezoporézní silikáty. Výhodou této metody na rozdíl od fyzikální adsorpce je pevnější vazba a tím pádem také omezení vymývání enzymu z nosiče.

Například β -galaktosidáza byla imobilizována na různé SBA-15 materiály s odlišnou velikostí pórů, od klasických přes velké až k ultra velkým a na komerčně dostupný amorfní materiál Sipernat®. Cílem bylo získat enzym katalyzující vznik galakto-oligosacharidů (GOS) s nejvyšším prebiotickým efektem, tzn. tri-GOS a tetra-GOS. Tradičně se tento enzym používá pro katalýzu hydrolytické reakce, ale ukázalo se, že vyšší specifita pro přípravu GOS

je při použití cesty transgalaktosylace laktózy. Jako nejúspěšnější nosič pro tento účel byl vyhodnocen materiál s největší velikostí pórů, který umožňuje nejlepší přístup substrátu a nejvyšší výtěžek, ačkoliv jeho specifita pro transgalaktosylační reakci je nejnižší (62).

Mezi populární anorganické nosiče patří také skleněné kuličky (glass beads). Jejich výhodou je nízká pořizovací cena, dobrá komerční dostupnost a také obnovitelnost a možnost opakovaného použití. Velmi úspěšně byla na tento materiál imobilizována α -amyláza, která je využívána k hydrolyze škrobu a produkci maltózy. Povrch skleněných kuliček musí být funkcionalizován, často je silanizován pomocí aminosilanu 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES, obrázek 14).



Obrázek 14 APTES - 3-aminopropyltriethoxysilan

Aminoskupiny katalyzují tvorbu siloxanových vazeb se silanoly na povrchu skla a jsou také schopné reagovat s organickými molekulami, které mají aldehydové nebo epoxidové funkční skupiny. V tomto případě byla kromě této funkcionalizace ještě provedena reakce s ftaloylchloridem, který může následně kovalentně vázat enzym. Takto imobilizovaný enzym poté vykazuje větší termostabilitu a samozřejmě lepší odolnost pro skladování a opakované použití (63).

Také sójová peroxidáza a avidin-peroxidáza (HRP) byly imobilizovány na skleněné kuličky, v tomto případě byl nosič modifikován pomocí APTES, a to silanizací ve vodném prostředí. Na rozdíl od silanizace v organických rozpouštědlech vytváří na povrchu nosiče monovrstvu silanu s vysokou hydrolytickou stabilitou a poskytuje vhodnější podporu. Upravený nosič byl potom aktivován glutaraldehydem a kovalentně spojen s enzymy prostřednictvím dostupných aminoskupin. Oba enzymy si zachovaly vysokou aktivitu – sójová

peroxidáza 74% a HRP 78% i praktickou využitelnost při odstraňování fenolu z odpadních vod (64).

Také magnetické materiály jsou využívány pro kovalentní immobilizaci enzymů. Jejich výhodou je například usnadněná separace použitím magnetu, kde se odstraní buď roztok substrátu, zatímco immobilizovaný enzym je držen na místě magnetickým polem, nebo naopak. Tohoto jevu je využíváno v případě lipázy immobilizované na maghemitové ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) magnetické nanočástice (65). Magnetické nanočástice získaly popularitu jako immobilizující nosiče pro enzymy také díky své nízké toxicitě a chemicky modifikovatelným povrchům. Vazba proteinu pak probíhá prostřednictvím různých funkčních skupin včetně aminových, aldehydových, karboxylových, epoxidových, thiolových a maleimidových (66).

Za účelem co nejefektivnější immobilizace jsou také magnetitové nanočástice funkcionalizovány karboxylovou skupinou. Nejprve je magnetitové jádro potaženo vrstvou silikátu dle Stöberovy metody za vzniku core/shell struktury, dále je na jeho povrch navázána aminoskupina a na ní konečně karboxylová skupina. Na tento nosič je následně immobilizována prasečí pankreatická lipáza, která si zachovává vysokou aktivitu, zároveň získává lepší chemickou stabilitu, tepelnou a acidobazickou odolnost (67).

6.1.3 Entrapment

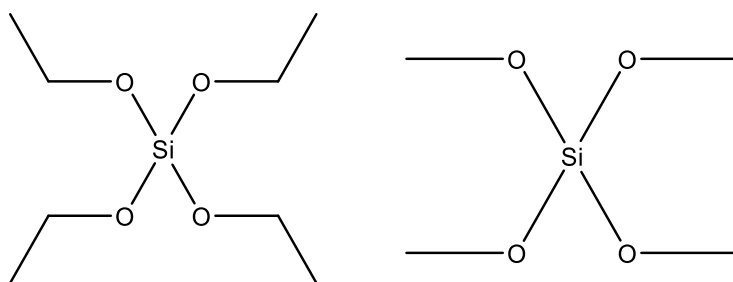
Entrapment představuje fyzikální „zachycení“ molekul enzymu. Protein je obklopen monomerními jednotkami nosiče, které v jeho přítomnosti polymerizují a tím jej uzavírají do mřížky. Tato metoda může být využita nejen k imobilizaci izolovaných enzymů, ale rovněž celých buněk. K efektivní imobilizaci je ovšem nezbytné umožnit průchodnost pro molekuly substrátu i produktu skrz membránu nosiče při současném zadržení enzymu, případně buňky, v rámci mřížky. Toho lze docílit následným upevněním enzymu uvnitř matrix, například kovalentní vazbou (3).

Při správném provedení je výhodou této metody zachování původní struktury enzymu bez nežádoucích změn. Rizikem ovšem jsou denaturace a znehodnocení enzymů během reakce, kdy dochází ke změnám reakčního prostředí. Problematické může být také samovolné unikání molekul proteinu mimo matrix (68).

Jako matrix mohou sloužit jak tradiční biopolymery, například alginát použitý při imobilizaci komplexu peroxidázy z rostliny *Brassica rapa* a lektinu konkanavalinu A, čímž se snížilo unikání enzymu z membrány a zvýšila odolnost vůči denaturačním agens (69). Využívaný je dále například také karagenan, v němž byla zachycena mimo jiné i α -amyláza a to za účelem zvýšení skladovací stability s možností dalšího využití v drug-delivery systémech (70). Další nosiče jako hydrogely a silikátové sol-gely (71) jsou popsány níže.

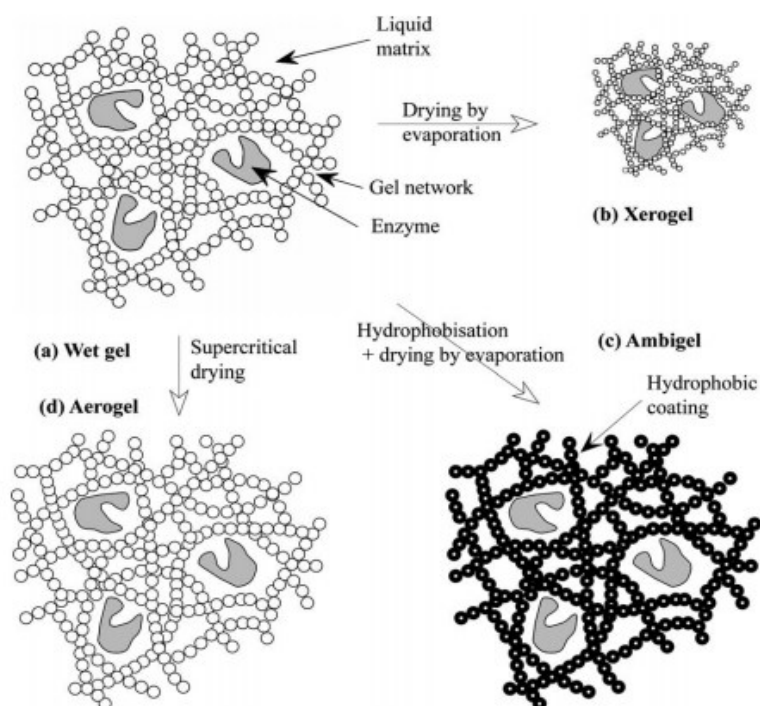
6.1.3.1 Sol-gel imobilizace

Sol-gel je proces, při kterém dochází k transformaci koloidní suspenze (sol) na pevnou látku (gel). Principem je série hydrolytických reakcí a kondenzačních polymerací prekurzorů, převážně kovových a polotuhých alkoxidů, alkoxysilanů za vzniku matrice SiO_2 (využívány jsou ale také oxidy titanu, zirkonu a hliníku), ve které je zachycen enzym. Běžně využívané jsou tetramethoxysilany (TMOS) a tetraetoxysilany (TEOS), jejichž struktura je zobrazena na obrázku 15.



Obrázek 15 vlevo TEOS a vpravo TMOS

Sol-gel přechod probíhá při laboratorní teplotě a za mírných podmínek, což z něj činí vhodnou metodu pro práci s biomolekulami, které velmi snadno podléhají denaturaci (72). Sol je mírně koncentrovaný koloidní roztok, v němž dochází při vhodných podmínkách ke vzájemným interakcím dispergované látky a jejich postupnému propojení, což se projevuje zvyšováním viskozity, až vzniká gel. Finální morfologie sol-gelů je poté určena také tepelným zpracováním gelů. Při normálním tlaku a běžném tepelném zpracování vznikají prášky – xerogely, ve kterých se při kapilárním stresu způsobeném sušením smršťují póry i vzniklé enzymové nano klece. Pokud jsou jako prekursorů spolu s alkokidy použity také alkylosiloxany, povrch sol-gelu je hustě naplněn hydrofobními alkylovými skupinami a kapilární napětí, které působí během odpařování, je z velké části oslabené a poskytuje tzv. ambigely, ve kterých nedochází ke kontrakci nano klecí. Při superkritických podmínkách za zvýšeného tlaku a teploty vznikají aerogely s vysokou pórovitostí, nesmírně velkým vnitřním povrchem a nízkou hustotou, jak je zobrazeno na obrázku 16 (41). Výhodou silikátů je možnost příslušné gely snadno přizpůsobit podle konkrétních potřeb, disponují totiž širokým spektrem porézních textur, síťových struktur, povrchových funkcí i podmínek zpracování. Hodnota pH, doba gelování, tvarování, průhlednost nebo hydrofobicita mohou být přizpůsobeny konkrétnímu enzymu nebo aplikaci (73). Aby bylo dosaženo vhodné velikosti pórů a tedy dostupnosti substrátu, je možno použít molekulu s rozměry podobnými substrátu jako šablonu pro vznik pórů a to přímo přidáním do reakční směsi, jak je uvedeno například při imobilizaci celobiázy pomocí TEOS – zde byla užita D-fruktóza (74).



Obrázek 16 Sol-gel immobilizace: (a) Hydrogel se zachyceným enzymem, sušením pomocí odpařování vzniká (b) xerogel; pomocí odpařování s hydrofobním pláštěm vzniká (c) ambigel; sušením při superkritických podmínkách vzniká (d) aerogel (73)

Důležitým faktorem při entrapmentu je dostupnost substrátu v aktivním místě enzymu. Přístupová cesta je ovlivňována jak velikostí pórů, tak interakcí substrátu s matricí, které probíhají formou elektrostatických a hydrofobních interakcí, ale také vodíkových vazeb. V případech, kdy mezi nosičem a substrátem existuje silná odpuzivá nebo přitažlivá síla, sol-gelová matrice propouští substrát buď nedostatečně, nebo naopak nadměrně. Vzhledem k tomu, že silikátová matrice je aniontová, můžeme předpokládat snadnější vychytávání kationtových částic. Mohou být ovšem také tak silně adsorbovány na povrch nosiče, že se k proteinu vůbec nedostanou. To platí také pro polární molekuly, které jsou schopné vázat se na silikáty vodíkovými můstky. (75)

Jedním z prvních enzymů immobilizovaných pomocí sol-gel entrapmentu byla alkalická fosfatáza v roce 1990 (úplné počátky sahají až do 60. let). Již v tomto experimentu byl však pozorován negativní vliv denaturačního agens, zde NaOH a methanolu použitých ke kondenzaci solu, na následnou aktivitu enzymu. Immobilizovaný biokatalyzátor si přesto uchoval pouze 30% původní aktivity. (76)

Například pro entrapment lipázy je prostředí SiO_2 pravděpodobně příliš polární a při tomto způsobu imobilizace vykazuje velmi nízkou aktivitu, proto je potřeba použít hydrofobnější prekurzory, jako je například polydimethylsiloxan, který disponuje nehydrolyzovatelnými lipofilními alkylovými skupinami. Běžným rozšířením této metody je použití dalších porézních pevných nosičů během procesu sol-gel. Tento typ "dvojité imobilizace" zahrnuje vazbu směsi gel-lipáza do rozměrných pórů pevné látky (obvykle jsou využívány silikáty). Tato úprava zvyšuje mechanickou stabilitu, ale také aktivitu enzymu. (77) Jedná se tedy o kombinaci dvou metod – entrapmentu a fyzikální adsorpce.

Široce rozšířenou úpravou jsou tzv. ORMOSILy – organicky modifikované silikáty a funkcionalizované siloxany. Alkoxidové monomery jsou funkcionalizovány různými skupinami, například amino, glycidoxy, epoxy, hydroxy, aj. (78) Tyto modifikace umožňují manipulovat s hydrofilitou a hydrofobicitou, iontovým nábojem a pufrovací kapacitou, elektrickou vodivostí, porézností, smáčitelností a objemovými mechanickými vlastnostmi výsledné matrice (79).

Velmi žádanou strukturou odvozenou od sol-gelů a využívanou v biosenzorech jsou tenké filmy – díky tenké vrstvě umožňují snadnou dostupnost a rychlou interakci a detekci analytu (78). Důležitá je také jejich transparentnost pro následné hodnocení optickými senzory.

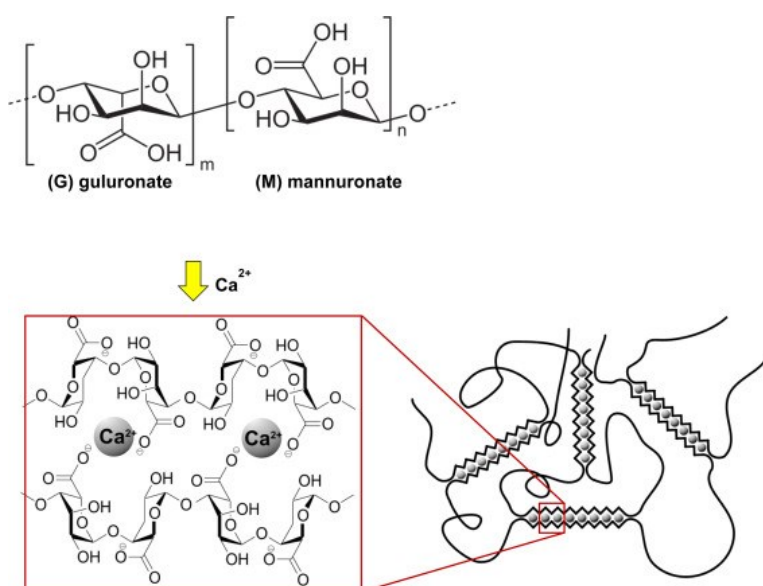
Kromě enzymů můžeme touto metodou využít k entrapmentu neméně důležitých proteinů – protilátek (80).

6.1.4 Enkapsulace

Enkapsulace velmi připomíná entrapment, narozdíl od této metody však není enzym uzavřen v matrix, ale v polopropustné membráně (3). Enkapsulace lze dosáhnout například tvorbou liposomálních vesikul nebo pomocí nanočástic. Významně se využívá k tvorbě biosenzorů (81). Výhodou enkapsulace oproti ostatním metodám jsou mírné reakční podmínky a také možnost imobilizovat několik enzymů najednou za vzniku multienzymového komplexu. Pro účely tohoto přehledu a oddělení od entrapmentu jsou uváděny enzymy zapouzdřené ve sférických membránách (3).

6.1.4.1 Algináty

Nejrozšířenějším nosičem pro enkapsulaci, nebo také mikroenkapsulaci, je přírodní biopolymer alginát. Alginát je extrakt z mořských řas složený ze střídajících se zbytků kyselin α -L-guluronové a β -D-manuronové. Alginátové nosiče se obvykle vyrábějí zesíťováním karboxylové skupiny kyseliny α -1-guluronové roztokem kationtového síťovacího činidla, jako je chlorid vápenatý, chlorid barnatý nebo poly(L-lysin). Alginátové matrice zesíťované ionty Ca^{2+} (obrázek 17) jsou však nestabilní ve fyziologickém prostředí nebo v běžných pufovacích roztocích s vysokou koncentrací fosfátových a citrátových iontů, které mohou extrahovat Ca^{2+} z alginátu a tím zkapalnit systém (42).



Obrázek 17 Alginát zesíťovaný vápenatými ionty (82)

Pro imobilizaci modelového enzymu β -galaktosidázy byl použit komplex chitosanu (s pozitivním nábojem) a alginátu (s negativním nábojem). Výsledná core-shell struktura se skládá z alginátového jádra, které je tvořeno mikrosférami. Jako síťovací činidlo byl použit chlorid vápenatý, který poskytuje tekuté prostředí, a chlorid barnatý, který tvoří pevné jádro. Druhý jmenovaný vykazoval v tomto případě lepší výsledky. Tloušťka propustné chitosanové membrány na povrchu je ovlivněna jak koncentrací, tak molekulární hmotností zvoleného chitosanu. Přítomnost tohoto pláště pochopitelně negativně ovlivňuje dostupnost substrátu, na druhou stranu zvyšuje stabilitu a odolnost enzymu (42).

6.1.4.2 Syntetické polymery

Také syntetické polymery jsou využívány jako nosiče pro enkapsulace enzymů. Poly(N-isopropylakrylamid) neboli PNIPAAm byl použit pro imobilizaci lakázy ve formě sférických mikrogelových částic. Ukázalo se, že množství zachyceného enzymu i jeho aktivita mohou výrazně vzrůstat při současném použití vinylimidazolu jako komonomeru. Funkcionalizací PNIPAAm vinylimidazolem se totiž zvětšují elektrostatické interakce mezi opačnými náboji imobilizovaného proteinu a nosiče (83).

Dalším příkladem využití syntetických polymerů je imobilizace lipázy třemi různými způsoby, adsorpcí, pomocí cross-linkingu a enkapsulací na polyvinylalkoholové (PVA) mikrosféry. Všechny tři techniky spojuje počáteční tvorba emulze, přičemž u enkapsulace probíhá již s přítomností enzymu, následovaná síťovací reakcí s glutaraldehydem, která stabilizuje vzniklé částice. Jako nejvhodnější metoda se prokázala enkapsulace, kdy dochází ke správné orientaci molekuly lipázy díky zachycení v membráně, zvýšení operační stability a zachování nejvyšší aktivity enzymu (84).

6.1.4.3 Lipozomy

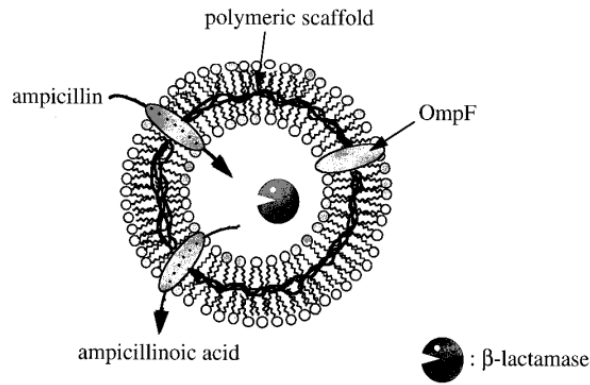
Lipozomy jsou sférické částice vezikulárního typu. Jejich stěna je tvořena jednou nebo více dvouvrstevných lamel z nerozpustných amfifilních fosfolipidů jako je například fosfatidylcholin, fosfatidylserin, aj. Hydrofobní části tvoří hydrofobní

vnitřek dvojvrstvy, zatímco polární hlavičky jsou v kontaktu s vodnou fází uvnitř i vně lipozomu. V závislosti na způsobu přípravy mohou lipidové vezikuly být multi-, oligo- nebo unilamelární, obsahující mnoho, několik nebo jednu dvojvrstvou. Průměr lipidových váček se může pohybovat mezi asi 20 nm a několika stovkami mikrometrů (85).

Ve vnitřním vodném kompartmentu je možné zachytit – enkapsulovat biomolekuly. Enkapsulace v lipozomu ovšem neznamená, že by se enzym nacházel pouze ve vodné fázi. Je možné, že během tvorby lipidové dvojvrstvy hydrofobní části enzymu penetrují tuto lipidovou vrstvu, zatímco hydrofilní části se nachází extralipozomálně nebo intralipozomálně ve vodné fázi (86).

Základní schéma enkapsulace do lipozomu je rozpuštění požadovaných lipidů v organickém rozpouštědle, které je následně odpařeno, lipidový prášek je následně dispergován v roztoku obsahujícím enzym a lipozomální vezikuly vzniknou spontánně (86).

Nevýhodou lipozomů je jejich nízká stabilita, která ovšem může být vylepšena zabudováním hydrofobního polymeru, kupříkladu methakrylátového monomeru, do lipidového jádra. Tyto monomery jsou následně uvnitř membrány polymerizovány pouze vlivem UV záření, čímž se vytvoří stabilizační síť, skrz kterou mohou lipidy volně proplouvat. Tímto způsobem byla imobilizována β -laktamáza, ochranný enzym bakteriálních buněk blokující účinek β -laktamových antibiotik. Její aktivita byla ovšem kvůli nepropustnosti membrány velmi nízká. Jako řešení tohoto problému byla zvolena inkorporace proteinového membránového kanálu, kterým může být rovněž kontrolována selektivita substrátu. V tomto případě byl zvolen membránový protein OmpF z cytoplazmatické membrány *Escherichia coli*, jeden z transmembránových proteinů vyskytující se u Gram-negativních bakterií, kde tvoří poriny naplněné vodou, které umožňují pasivní difúzi malých rozpuštěných látek, jako jsou ionty, živiny nebo antibiotika přes biologickou membránu (obrázek 18). Částicím s molekulovou hmotností větší než 400 je prostup stericky blokován. Výsledkem tedy je, že enzym si zachovává plnou aktivitu, substrát je díky kanálům dostupný a zároveň je protein chráněn před škodlivými vlivy okolního prostředí (např. proteázami) (87).



Obrázek 18 Lipozom se zabudovaným membránovým proteinem OmpF (87)

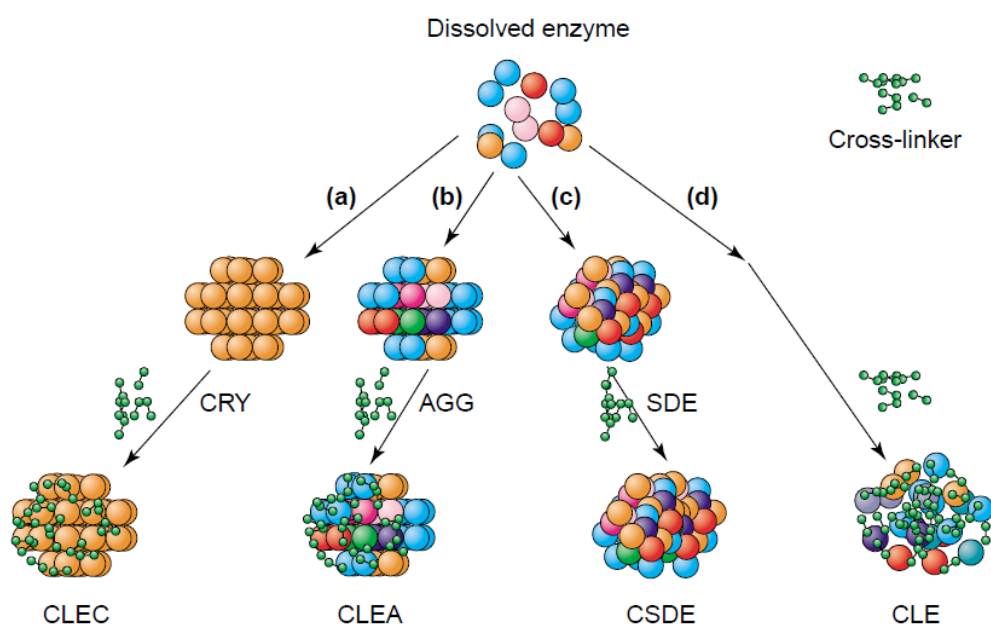
Další využití potenciálu lipozomů bylo provedeno při imobilizaci glukosaoxidázy (GO), enzymu katalyzujícímu oxidaci glukózy za vzniku glukonové kyseliny a peroxidu vodíku. Je známo, že vznikající peroxid vodíku se zvyšující se koncentrací inhibuje funkci GO. K potlačení tohoto jevu byla použita kataláza rozkládající peroxid vodíku na kyslík a vodu. Společně s GO byla kataláza imobilizována uvnitř lipozomu. Využito bylo také výše zmiňovaného membránového kanálu OmpF, který usnadnil transport glukózy z vnějšího prostředí dovnitř lipozomu. Takto sestavený bioreaktor vykazuje jak vysokou aktivitu GO, tak vylepšenou stabilitu celého systému (88).

Lipozomy jsou využity také jako pomocná šablona při imobilizaci GO pomocí enkapsulace v biomimetickém silikátu, tzn. silikátu formovaném podle určitého vzoru (tzv. molecular imprinting). Nejprve je enzym zachycen do lipozomu, následně s použitím lipozomu jako templátu a polydimethyldialyl-amonia jako induktoru byl prekurzor silikátu dehydratován za vzniku silikátového obalu na povrchu lipozomu. Nakonec byla lipidová vrstva odstraněna za použití Tritonu X-100. Celý tento proces zabránil nežádoucím interakcím enzymu s reaktivními silanovými skupinami, kdy by mohlo dojít ke kovalentní vazbě a snížení aktivity enzymu. V porovnání s klasickou sol-gel imobilizací probíhá tato reakce, biomimetická silicifikace, v mnohem mírnějších podmínkách. Tepelná stabilita enzymu se zvýšila, stejně jako odolnost vůči denaturačním agens (89). Enzymy ovšem nemusí být imobilizovány pouze uvnitř lipozomu. Například extracelulární chitosanáza, jež katalyzuje vznik oligochitosanů, byla imobilizována na jeho povrchu. Lipozomy jsou dokonce za určitých tepelných podmínek schopny reagovat s povrchem buňky produkujícím chitosanázu a

zvýšit produkci a sekreci tohoto enzymu. Za použití inhibitoru signální peptidázy, čímž je zabráněno odstřížení signálního peptidu odpovídajícího za uvolnění zralého proteinu z membrány. Při vzrůstající teplotě se také zvýší hydrofobicita membrán, dojde k fúzi membrány lipozomu a buňky, internalizaci enzymu do membrány lipozomu a po snížení teploty desorpce lipozomu a vznik komplexu imobilizované chitosanázy na povrchu lipozomu (90).

6.1.5 Cross-linking

Zesíťení, neboli cross-linking, patří k velmi oblíbeným a vzhledem k zachování aktivity enzymu pravděpodobně nejefektivnějším imobilizačním technikám. Vyniká také svou jednoduchostí. Od ostatních metod se odlišuje nevyužitím pevného nosiče. Samotné zesíťení probíhá spojením jednotlivých molekul enzymu kovalentní vazbou aminoskupin enzymu přes bifunkční nebo multifunkční činidlo – například glutaraldehyd, aj. Podle výchozí podoby enzymu (prekurzorů) rozlišujeme CLEs (cross-linked dissolved enzymes) a CSDEs (cross-linked spray-dried enzymes) – vzhledem k nízkému stupni zachování aktivity méně rozšířené metody imobilizace enzymů, CLEAs (cross-linked enzyme aggregates), CLECs (cross-linked enzyme crystals), zobrazeny jsou na obrázku 19 (91).



Obrázek 19 Rozdělené přístupů získávání beznosičových imobilizovaných enzymů: (a) krystalizace, (b) agregace, (c) sprejové sušení, (d) rozpouštění (91)

6.1.5.1 Glutaraldehyd

Pravděpodobně nerozšířenější síťovací agens je glutaraldehyd. Jedná se o lineární pětiuhlíkový dialdehyd (obrázek 6). Glutaraldehyd je čirá, bezbarvá až slabě zabarvená, štiplavá, olejovitá kapalina, která je rozpustná ve všech poměrech ve vodě a alkoholu, stejně jako v organických rozpouštědlech. K dispozici jsou především kyselé vodné roztoky (pH 3,0-4,0), jejichž koncentrace se pohybuje v rozmezí od méně než 2% do 70% (hmotnost/objem). Popularita glutaraldehydu spočívá kromě vysoké reaktivity také v jeho komerční dostupnosti a nízkých pořizovacích nákladech. Rychle reaguje s aminovými skupinami (obvykle lysinové zbytky proteinu) v oblasti neutrálního pH a při síťování (cross-linking) je účinnější než ostatní aldehydy. Komerčně dostupný glutaraldehyd je ovšem multikomponentní směs, ve které se glutaraldehyd nevyskytuje pouze jako monomer, ale také jako dimer, trimer a polymer. Jeho chemické chování se tedy může mírně proměňovat (92).

Při cross-linkingu je potřeba věnovat pozornost jak reakčním podmínkám, tak koncentraci enzymu i glutaraldehydu. Nízké koncentrace totiž zvyšují pravděpodobnost nežádoucích intramolekulárních interakcí. Příliš vysoká koncentrace ovšem naopak vede k příliš intenzivnímu síťování, při kterém může docházet k zablokování aktivního místa enzymu a denaturaci (92).

6.1.5.2 CLECs

Zesítěné enzymové krystaly – cross-linked enzyme crystals (CLECs) jsou vysoce aktivní, snadno manipulovatelnou, odolnou a recyklovatelnou formou imobilizovaných enzymů. První zesítění krystalického enzymu bylo popsáno již v roce 1964 Quiochem a Richardsem a to pomocí glutaraldehydu. Původním účelem ovšem nebyla imobilizace enzymu, nýbrž stabilizace enzymových krystalů pro studium jejich struktury pomocí rentgenové difrakční analýzy. Autoři ovšem zaznamenali také katalytické vlastnosti materiálu (93).

Technologie CLECs je mezi imobilizačními metodami výrazným zlomem, neboť přináší stabilizaci a imobilizaci enzymu bez ztráty aktivity, přičemž proteinová

matrice je jak katalyzátor, tak i nosič. Tato metoda zahrnuje zesílení enzymových mikrokrytalů (v rozsahu 1-200 μm s tím, že čím menší jsou krystaly, tím vyšší je následná aktivita) s bifunkčními činidly, nejčastěji glutaraldehydem. CLECs jsou vysoce aktivní, pevné mikroporézní materiály, které mají rovnoměrně rozmístěné kanály naplněné rozpouštědlem procházející celým tělem krystalu. Rozpouštědlo přitom tvoří 30-65% hmotnosti krystalu a usnadňuje volný transport substrátů a produktů do a z krystalu. Výrobní proces CLECs se skládá ze dvou hlavních kroků: nejprve krystalizace enzymů a následně chemického zesílení krystalů takovým způsobem, že je udržena aktivita proteinu a není porušena krystalická mřížka (94).

Krystalizace je vynikajícím nástrojem pro čištění, izolaci a dlouhodobé skladování enzymů. Účinnost krystalizace je pro čistotu enzymů obvykle větší než jakákoli jiná metoda. Obecně jsou enzymy mnohem stabilnější v krystalické formě než v rozpustné nebo amorfní formě a také koncentrovanější. Krystalizace makromolekul vyžaduje vytvoření přesyceného stavu. Jedná se o nerovnovážný stav, ve kterém je v roztoku přítomno určité množství nad limitem rozpustnosti makromolekul. Při přípravě CLECs kvalita krystalu určuje stabilitu zesíleného enzymu, protože samotný krystal enzymu působí jako vlastní nosič. Krystalizace enzymů dosáhneme úpravou rychlosti odpařování rozpouštědla, hodnotou pH a teploty a také manipulací s koncentrací proteinu a precipitantu. Jako precipitanty jsou užívány obvykle anorganické soli, organická rozpouštědla a polymery typu polyethylenglykolu (PEG) o různé molekulové hmotnosti (95).

Samotný cross-linking poté výrazně zvyšuje odolnost enzymu. Inter- a intramolekulární kovalentní křížové vazby s linkovacím činidlem poskytují bariéru proti deaktivaci katalyzátoru. Cross-linking brání molekulám enzymu tvořícím krystal od opětovného rozpouštění, imobilizuje molekuly enzymu na mikrokrytalické částice. Intermolekulární zesílení je nezbytné k udržení krystalových struktur v jiném prostředí, než je krystalizační roztok. Rovněž zvyšuje stabilitu při skladování a to i při zvýšených teplotách.

Zatímco krystalizace proteinu tedy vytváří přesné prostorové uspořádání molekul, následné zesílení uvnitř krystalu zablokuje přítomné proteiny. Rozlišujeme dva typy síťovacích činidel – homobifunkční a heterobifunkční.

Homobifunkční činidla mají dvojici stejných funkčních skupin, jako jsou dva aldehydy, dva aminy nebo dva thioly. Mezi tato činidla patří například dialdehydy (glyoxal, glutaraldehyd, sukcininaldehyd), diaminy (ethylendiamin, hexamethylendiamin, oktandiamin), bis(imidoestery) a bis(sukcinimidylestery). V heterobifunkčních reakčních činidlech jsou tyto dvě reaktivní skupiny různé, což umožňuje vytváření křížových vazeb mezi různými funkčními skupinami. Proto jsou také tato činidla využívána ke cross-linkingu dvou odlišných molekul, například enzymu s protilátkou nebo nukleové kyseliny s léčivem (95).

V obou krocích, krystalizaci i cross-linkingu, je důležité vhodně optimalizovat parametry. Například velikost krystalických částic může být ovlivněna hodnotou pH, teplotou, koncentrací, ale i rychlostí míchání. Pro biokatalýzu je preferovaná velikost krystalů od 50 do 150 μm , jelikož vykazují vhodnou kombinaci filtračních vlastností a aktivity (96).

S výhodou jsou CLECs užívány také v neředěných organických rozpouštědlech a to při zachování poměrně vysoké katalytické aktivity (96). Biotransformace v nevodném prostředí je aplikována v mnoha syntetických procesech a to přesto, že enzym má v tomto prostředí nižší aktivitu než v prostředí vodném. Mnohdy jsou totiž v reakční směsi ve vodě nerozpustné nepolární složky, výhodou je také vyšší tepelná stabilita enzymů, změněná stereoselektivita enzymů, snadnější recyklace i regenerace enzymů pomocí filtrace nebo centrifugace, jednoduché získávání produktu odpařením při použití těkavého organického rozpouštědla jako reakčního média či zabránění kontaminace způsobenou růstem mikroorganismů, která je inhibována organickými rozpouštědly (97). Při ověřování vlivu rozpouštědla na katalytickou aktivitu enzymu byl jako modelový enzym použit subtilisin Carlsberg. Jedná se o extracelulární nespecifickou bakteriální alkalickou proteázu produkovanou například kmeny *Bacillus subtilis* (98) a *Bacillus licheniformis*. Jako rozpouštědlo byl použit oktan a acetonitril a jejich směsi s vodou. Enzym v organických rozpouštědlech vykazuje vysokou konformační rigiditu a tím je jeho aktivita snížena. Vzhledem k tomu, že voda působí v enzymu jako „mazadlo“, jeho přidávání k organickým rozpouštědlům zvyšuje mobilitu enzymu a tím také jeho aktivitu. Proto byla aktivita enzymů po přidání vody výrazně vyšší. V porovnání s volným enzymem byla ovšem aktivita

CLECs ve všech a případech vyšší, stejně jako enantioselektivita, u které je tento rozdíl ještě markantnější (97).

6.1.5.3 CLEAs

Zesíťované enzymové precipitáty jsou novější, jednodušší a levnější metodou imobilizace vycházející z CLECs. Nákladná krystalizace je však nahrazena agregací, díky které disponují imobilizované enzymy také vysoce zachovanou aktivitou, výbornou stabilitu a možností opakovaného použití. Tuto metodu poprvé popsali v roce 2000 Cao a Sheldon. Jako modelový enzym použili penicilin G acylázu, která ve formě CLEAs vykazovala dokonce vyšší aktivitu než CLECs (99).

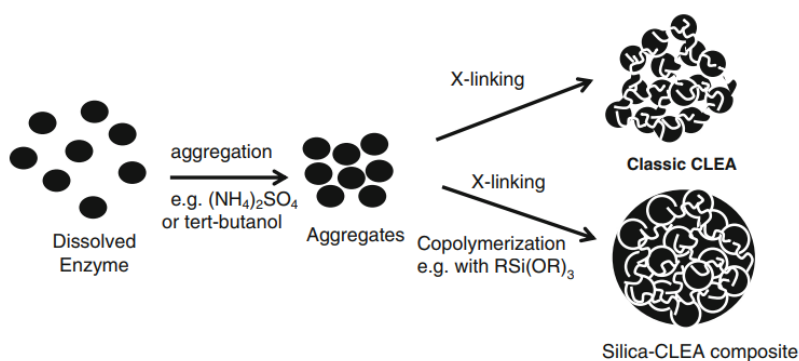
Je všeobecně známo, že přidáním solí (síran amonný), organických rozpouštědel (terc-butanol) a neiontových polymerů (PEG) k roztoku proteinu dochází k agregaci proteinových molekul a to bez poškození jeho původní struktury. Tyto agregáty jsou k sobě vázány pouze nekovalentně a snadno se rozpadají a znovu rozpouštějí ve vodě. Pokud jsou ovšem tyto předem fyzikálně agregované molekuly enzymů dále zesíťovány, dochází ke vzniku CLEAs – cross-linked enzyme aggregates. Jejich velikost může dosahovat až 100 μm (100).

Precipitace je jedna z nejčastějších metod čištění enzymů, proto není nutné disponovat enzymem nejvyšší čistoty. Je také možné agregovat více enzymů/proteinů najednou, pokud to umožní výchozí materiál. Tvorba CLEAs s různými druhy enzymů, tzv. combi-CLEAs přináší možnost sekvence dvou po sobě jdoucích reakcí, které mohou být provedeny v této směsi enzymů (101).

Po úspěšné agregaci následuje cross-linking. Jako linkovací činidlo je také nejčastěji používán glutaraldehyd. Reakce probíhá podobně jako u CLECs interakcí volných aminoskupin z lysinových zbytků na povrchu sousedících enzymových molekul s oligomery nebo polymery glutaraldehydu, jejichž výsledkem jsou inter- a intramolekulární aldolové kondenzace, přesný průběh reakce je ovlivněn hodnotou pH (102). V některých případech, například u enzymu nitrilázy, je však toto činidlo nevhodné. Reaguje totiž s aminokyselinovými zbytky, které jsou v aktivním místě enzymu, a jeho aktivita se

poté výrazně snižuje. Je to dáno malou velikostí glutaraldehydu a tedy schopností penetrovat do vnitřní struktury enzymu a inaktivovat ho. Řešením je použití objemnějšího činidla, k tomuto účelu byly použity například objemné polyaldehydy získané z dextranů (103).

Existuje také několik možností, jak proces cross-linkingu modifikovat za účelem dosažení vylepšených vlastností imobilizovaného enzymu. Při cross-linkingu je možné přidat do reakční směsi monomer, který za daných podmínek podléhá polymerizaci. Například pokud je cross-linking proveden v přítomnosti siloxanu, výsledkem je komplex CLEA-silikát (obrázek 20). Podle požadovaných vlastností a charakteristik enzymu je možné zvolit konkrétní siloxany. Další možností úpravy jsou "inteligentní" magnetické CLEAs provedením zesíťení v přítomnosti funkcionalizovaných magnetických nanočástic. Tyto mCLEA pak mohou být snadno odděleny magnetickou dekantací (102).



Obrázek 20 Schéma přípravy CLEAs a modifikovaných komplexů CLEA-silikát (102)

Další možností je kombinace dvou metod imobilizace. Například α -chymotrypsin a lipáza byly imobilizovány nejprve pomocí fyzikální adsorpce na mesocelulární mezoporézní silikát s velice pravidelnými póry. Takto adsorbovaný enzym byl poté stabilizován pomocí cross-linkingu a to reakcí s glutaraldehydem. Tyto CLEAs výrazně omezí vymývání enzymu a díky tomu velmi vzroste stabilita enzymu v porovnání s použitím pouhé adsorpce. Zachovaná aktivita je však bohužel poměrně nízká, pouze 30% původní aktivity volného enzymu (104).

Přestože se jedná o efektivní a univerzální techniku, je pochopitelně nutné i v této metodě pro dosažení nejlepších výsledků vhodně optimalizovat parametry

(teplota, pH, koncentrace, rychlost míchání, precipitační činidlo, přísady a síťovací činidlo) pro jednotlivé enzymy (105).

6.2 Biomedicínské aplikace

Také medicína těží z enzymové imobilizace. Imobilizované enzymy se osvědčily pro mnoho aplikací v oboru, včetně drug-delivery systémů a identifikace nádorů, jakož i glukózových senzorů jako nástroje pro kontrolování hmotnosti a diabetu (8). Modifikované enzymy mohou působit jako biosenzory pro diagnostiku onemocnění pomocí detekce, měření a zaznamenávání hladin biomarkeru. Dále mohou být imobilizované enzymy užitečné při léčbě určitých onemocnění, například při vrozených metabolických vadách, kardiovaskulárních onemocněních, rakovině, střevních onemocněních nebo při léčbě intoxikace. Enzymy mohou účinkovat zachycením akumulačních produktů určité metabolické cesty nebo eliminací toxických xenobiotik. Kromě toho mohou enzymy zlepšit některé patologické stavy, konkrétně oxidační stres a zánět. Použitelnost izolovaných enzymů v medicíně je však omezena kvůli labilní povaze těchto molekul, možnosti imunogenní reakce a jejich obtížné akumulaci na cílovém místě (106). Imunogenní reakci by bylo možné zabránit použitím tělu vlastního nosiče – erytrocytu. Enzymy enkapsulované v červených krvinkách mohou být využity mimo jiné při vrozené poruše tvorby některého enzymu a nutnosti exogenního dodání enzymu. Enkapsulace enzymu v erytrocytu by mohla vyřešit nejen možné alergické reakce či tkáňovou toxicitu, ale také prodloužit krátký poločas. Jejich klinické testování je ovšem velmi omezené. Výjimkou je například L-asparagináza, která rozkládá aminokyselinu nezbytnou pro nádorové buňky, a proto byla použita k léčbě některých novotvarů, zejména akutní lymfoblastické leukémie u pediatrických pacientů. Pokud je podávána jako volný enzym, vykazuje velmi krátký poločas a navíc bylo toto použití spojeno s imunologickými změnami, s intolerancí a dokonce s toxicitou v některých orgánech a tkáních, zejména v játrech a pankreatu. Jeho enkapsulace v erytrocytech může zmírnit tyto nevýhody, významně snížit imunologické reakce

a chránit je před plazmatickými proteázami, čímž prodlužuje jeho poločas (107, 108)

Další oblastí je použití imobilizovaných enzymů s antioxidačními vlastnostmi. Zvýšené reaktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species) se vyskytují v oblastech zasažených oxidačním stresem, tj. zejména po úrazech a při patologických zánětlivých stavech, například ateroskleróza, Parkinsonova choroba, autoimunitní onemocnění nebo rakovina, kdy dále poškozují zasažené buňky i tkáně. ROS mohou být neutralizovány antioxidačními enzymy, zejména superoxid dismutázou (SOD). Vzhledem k velmi krátkému poločasu superoxid dismutázy (asi 6 min) a nízké distribuci do buněk, je její imobilizace v drug-delivery systému zásadní pro zajištění dostatečného léčebného účinku, jenž je využíván také při infarktu myokardu (106).

6.2.1 Biosenzory

Biosenzory jsou citlivá analytická zařízení, jež interakcí s analytem generují fyzikálně chemický signál, který dále přeměňují a zesilují do lépe měřitelné podoby. Mohou být považovány za doplňkové nástroje k běžným analytickým metodám, jako je například HPLC. Využívány jsou v monitorování životního prostředí, potravinářském průmyslu i ke klinickým analýzám. Biosenzory (obrázek 21) se skládají ze dvou úzce spojených prvků, bioreceptoru (tj. citlivý imobilizovaný biologický prvek, např. enzym) a převodníku, který se používá k převodu biochemického signálu, jenž je výsledkem interakce analytu s

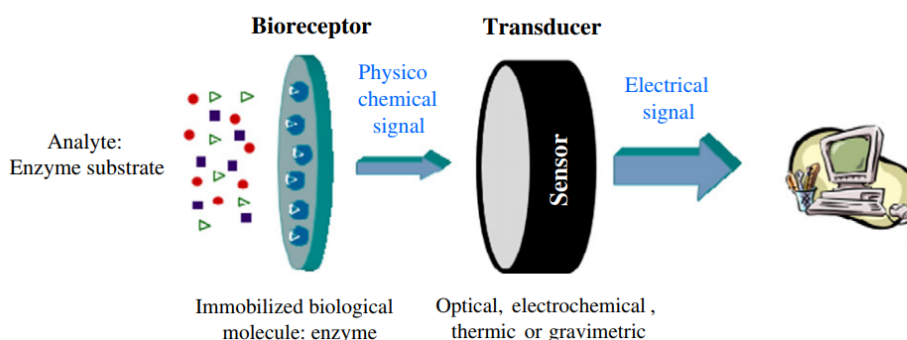


Fig. 1. Scheme of a biosensor.

Obrázek 21 Schéma biosenzoru (109)

bioreceptorem na elektrochemický (nebo také optický, gravimetrický, kalorimetrický) signál (109).

Elektrochemický senzor na bázi imobilizovaného enzymu je tvořen tenkou vrstvou enzymu (enzymů) na povrchu membrány elektrody. Monitorovaný analyt difunduje do enzymové vrstvy, kde dochází ke katalytické reakci, kdy dojde buď ke spotřebování substrátu, nebo vytvoření produktu, který lze elektrochemicky detekovat. Produkované elektroaktivní částice jsou monitorovány buď potenciometricky nebo amperometricky, elektrochemický signál koreluje s koncentrací analyzované látky, která má být měřena. Imobilizační metoda může ovlivnit aktivitu imobilizovaného enzymu a může tak významně přispět k citlivosti biosenzoru. Kromě elektrochemických transdukčních systémů jsou známé také optické biosenzory, využívané pro monitorování glukózy, cholesterolu, fosfolipidů a bilirubinu, které budou popsány dále (110).

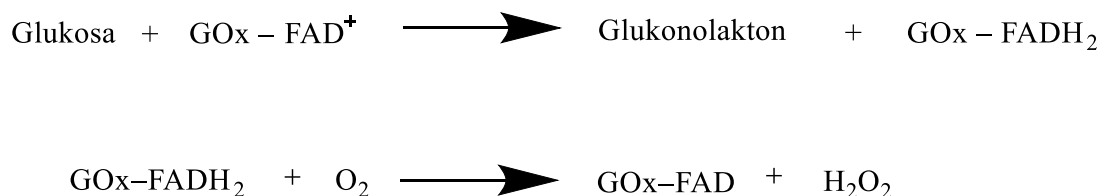
6.2.1.1 Amperometrické biosenzory

První biosenzor byl připraven již v roce 1962 Clarkem a Lyonsem spojením glukosaoxidázy s amperometrickou elektrodou pro měření parciálního tlaku kyslíku pO_2 (111). Od té doby začal o původně nazývané tzv. enzymové elektrody vzrůstat zájem a úměrně roste i jejich klinické využití. V současnosti jsou nejrozšířenější a komerčně dostupné biosenzory pro měření glukózy v plné krvi, séru, plazmě a moči. Důvodem tak velkého zájmu vědecké obce i komerčního sektoru je potřeba diagnostikovat světově široce rozšířený diabetes mellitus a pečlivě monitorovat hladinu krevního cukru u pacientů trpících tímto onemocněním.

Amperometrie je specifická elektrochemická technika, která využívá skutečnosti, že určité chemické sloučeniny mají redoxní potenciál (podléhají redoxním reakcím) na elektrodách inertních kovů, do nichž je vložen konstantní potenciál. Indikační (pracovní, polarizovatelná) elektroda je obvykle vyrobena z kovu, jako je platina nebo zlato. Referenční elektroda poskytuje pevný potenciál, proti kterému se měří potenciál aplikovaný na indikační elektrodu. Pokud je na indikační elektrodu vložen kladný potenciál vzhledem k referenční elektrodě,

probíhá na ní oxidační reakce a je označována jako anoda elektrochemického článku. Při aplikaci na biosenzory anoda monitoruje tvorbu produktu nebo vyčerpání reaktantu, tj. analyzuje průběh biochemické reakce (například enzymem katalyzované reakce), které se v blízkosti povrchu elektrody účastní analyt. Analyty difundují na povrch elektrody, kde podléhají této redoxní reakci (112).

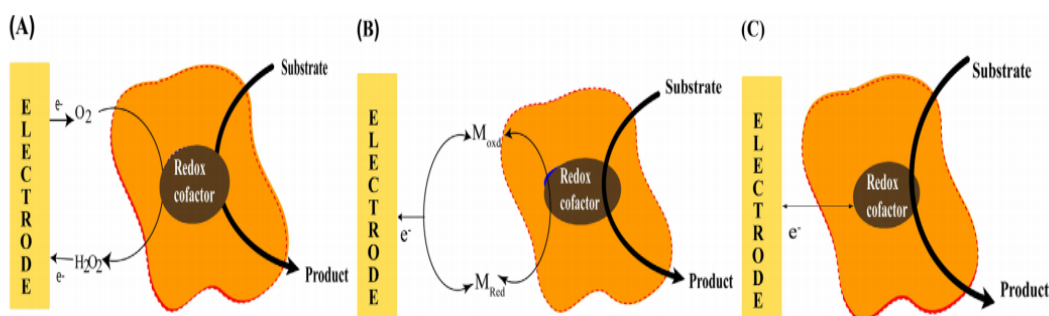
Základní koncept glukózového biosenzoru je založen na skutečnosti, že imobilizovaná glukosaoxidáza katalyzuje oxidaci β -D-glukózy molekulárním kyslíkem za vzniku kyseliny glukonové, resp. glukonolaktonu a peroxidu vodíku (obrázek 22). Aby mohla glukosaoxidáza pracovat jako katalyzátor, vyžaduje redoxní kofaktor flavinadenindinukleotid (FAD). FAD funguje jako počáteční elektronový akceptor a redukuje se na FADH₂. Reakcí s kyslíkem je kofaktor regenerován a vzniká peroxid vodíku. První generace biosenzorů byla založena na detekci a měření peroxidu vodíku. Nevýhodou však byla nutnost udržovat konstantní hladinu kyslíku (113).



Obrázek 22 Základní princip glukosového biosenzoru, GOx - glukosaoxidáza

Druhá generace biosenzorů přichází s nefyziologickým akceptorem elektronů, jenž nahrazuje kyslík. Tyto syntetické akceptory se nazývají redoxní mediátory a jsou schopné převádět elektron z enzymu na povrch indikační elektrody (114). Jako mediátory jsou běžně užívány např. ferrocen a jeho deriváty, hexakvanoželezitan, methylenová modř, benzochinon a další. Mediátory umožňují nižší potenciál na elektrodách a díky tomu jsou elektrody méně náchylné k interferencím s jinými látkami (115).

Biosenzory třetí generace jsou založené na přímém přenosu elektronů mezi redoxním centrem enzymu a elektrodou a výměna tak probíhá bez difúzní bariéry (116). Základní schéma je uvedeno v obrázku 23.



Obrázek 23 Schéma biosenzorů: (A) první, (B) druhé, (C) třetí generace (116)

Nezávisle na kyslíku může být glukosa oxidována také pomocí glukosadehydrogenázy (GDH). Tato reakce probíhá dvěma mechanismy (obrázek 24), v prvním případě je kofaktorem NAD^+ , jenž se redukuje na NADH (117). Druhý způsob je použití quinoprotein glukosadehydrogenázy, která nevyžaduje kyslík ani NAD^+ . Jako kofaktor využívá pyrolochinolinochinon (PQQ), je tedy označována jako PQQ-dependentní glukosadehydrogenáza (PQQ-GDH). Jednotlivé děje jsou schematicky popsány v rovnicích. Tyto enzymy jsou rovněž využívány pro měření glukosy v krvi.



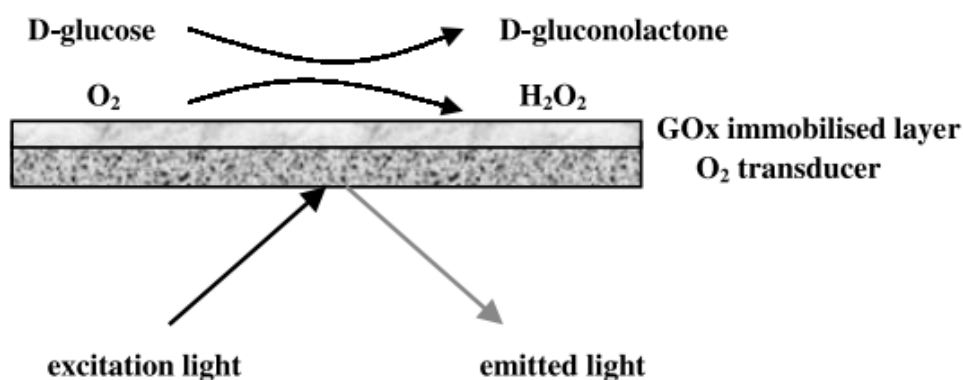
Obrázek 24 Schéma redoxních dějů při využití enzymu glukosa dehydrogenázy

6.2.1.2 Optické biosenzory

Optické biosenzory jsou založeny na měření absorbovaného nebo emitovaného světla v důsledku biochemické reakce. Obdobně jako u elektrochemických převodníků se hodnotí dva typy reakcí – vyčerpání reaktantu (tzv. afinitní biosenzory založené například na protilátkách nebo receptorových bílkovinách) nebo vznik produktu enzymatickou reakcí (tzv. katalytické biosenzory) (118, 119).

Světelné vlny jsou vedeny optickými vlákny do vhodných detektorů (120). Měření se provádí například pomocí optických spektroskopických metod.

Jako příklad opět poslouží široce rozšířený glukosový biosenzor (obrázek 25). Ve většině případů je také založen na glukosaoxidáze jako bioreceptoru. U optického převodníku však nedochází k tak výrazným interferencím jako u amperometrických zařízení. Stanovení se provádí opticky sledováním spotřeby kyslíku nebo tvorby H_2O_2 . Vzhledem k tomu, že kyslík je účinné luminiscenční zhášedlo pro mnoho sloučenin, je většina glukózových enzymatických optických biosenzorů založena na ozařování kyslíku a sledování jeho množství. Využívány jsou také pro domácí glukometry (119).



Obrázek 25 Základní schéma glukosového optického biosenzoru (120)

7 Závěr

V práci byl učiněn základní přehled technik pro imobilizaci enzymů. V praxi samozřejmě vzniká mnoho nových kombinací, jsou nalézány další nosiče i možnosti. Neexistuje však univerzální hodnocení, která z těchto metod je nejlepší. Pro každý enzym je nutné volit metodu individuálně s přihlédnutím k následnému využití imobilizovaného komplexu.

8 Použitá literatura

1. ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays In Biochemistry* [online]. 2015, **59**(0), 1–41. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/bse0590001
2. SHELDON, Roger A. a Sander VAN PELT. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* [online]. 2013, **42**(15), 6223–6235. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C3CS60075K
3. CAO, Linqiu. *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design* [online]. 2006. ISBN 3527607080. Dostupné z: doi:10.1201/9783527607082
4. RODRIGUES, Rafael C., Claudia ORTIZ, Ángel BERENGUER-MURCIA, Rodrigo TORRES a Roberto FERNÁNDEZ-LAFUENTE. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.* [online]. 2013, **42**(15), 6290–6307. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C2CS35231A
5. CARREA, Giacomo a Sergio RIVA. Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* [online]. 2000, **39**, 2226–2254. ISSN 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/1521-3773(20000703)39:13<2226::AID-ANIE2226>3.0.CO;2-L
6. JESIONOWSKI, Teofil, Jakub ZDARTA a Barbara KRAJEWSKA. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption* [online]. 2014, **20**(5–6), 801–821. ISSN 09295607. Dostupné z: doi:10.1007/s10450-014-9623-y
7. HANEFELD, Ulf, Lucia GARDOSI a Edmond MAGNER. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* [online]. 2009, **38**(2), 453–468. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/B711564B
8. SPAHN, Cynthia a Shelley MINTEER. Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering* [online]. 2008, **2**(3), 195–200. ISSN 18722121. Dostupné z: doi:10.2174/187221208786306333
9. LIU, Dong-Mei, Juan CHEN a Yan-Ping SHI. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, **102**, 332–342. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.03.011

10. HARTMANN, Martin a Xenia KOSTROV. Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. *Chemical Society Reviews* [online]. 2013, **42**(15), 6277. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/c3cs60021a
11. HANEFELD, Ulf. Immobilisation of hydroxynitrile lyases. *Chemical Society Reviews* [online]. 2013, **42**(15), 6308. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/c3cs35491a
12. YIU, Humphrey H. P. a Paul A. WRIGHT. Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2005, **15**(35–36), 3690. ISSN 0959-9428. Dostupné z: doi:10.1039/b506090g
13. TAGUCHI, Akira a Ferdi SCHÜTH. *Ordered mesoporous materials in catalysis* [online]. 2005. ISBN 4920830629. Dostupné z: doi:10.1016/j.micromeso.2004.06.030
14. FAN, Jie, Jie LEI, Limin WANG, Chengzhong YU, Bo TU a Dongyuan ZHAO. Rapid and high-capacity immobilization of enzymes based on mesoporous silicas with controlled morphologies Electronic supplementary information (ESI) available: XRD and nitrogen sorption isotherms for MPSs used in bioimmobilization. See <http://www.rsc.org/>. *Chemical Communications* [online]. 2003, **15**(17), 2140. ISSN 1359-7345. Dostupné z: doi:10.1039/b304391f
15. TRAN, D N a K J BALKUS. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *Acs Catalysis* [online]. 2011, **1**(8), 956–968. Dostupné z: doi:10.1021/cs200124a
16. HARTMANN, Martin a Dirk JUNG. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. *J. Mater. Chem.* [online]. 2010, **20**(5), 844–857. ISSN 0959-9428. Dostupné z: doi:10.1039/B907869J
17. GASCÓN, Victoria, Isabel DÍAZ, Carlos MÁRQUEZ-ÁLVAREZ a Rosa M. BLANCO. Mesoporous silicas with tunable morphology for the immobilization of laccase. *Molecules* [online]. 2014, **19**(6), 7057–7071. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules19067057
18. HUDSON, Sarah P., Simon WHITE, Dimple GORADIA, Hayder ESSA, Baohong LIU, Liang QIAO, Yun LIU, Jakki C. COONEY, B. Kieran

- HODNETT a Edmond MAGNER. Proteins in mesoporous silicates. *ACS Symposium Series* [online]. 2008, **986**, 49–60. ISSN 19475918. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2008-0986.ch002
19. ZHU, Ling, Xiaoyan LIU, Tong CHEN, Zhigang XU, Wenfu YAN a Haixia ZHANG. Functionalized periodic mesoporous organosilicas for selective adsorption of proteins. *Applied Surface Science* [online]. 2012, **258**(18), 7126–7134. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2012.04.011
20. SERRA, Elías, Eva DÍEZ, Isabel DÍAZ a Rosa M. BLANCO. A comparative study of periodic mesoporous organosilica and different hydrophobic mesoporous silicas for lipase immobilization. *Microporous and Mesoporous Materials* [online]. 2010, **132**(3), 487–493. ISSN 13871811. Dostupné z: doi:10.1016/j.micromeso.2010.03.031
21. PISKLAK, Thomas J., Minedys MACÍAS, Decio H. COUTINHO, Rita S. HUANG a Kenneth J. BALKUS. Hybrid materials for immobilization of MP-11 catalyst. *Topics in Catalysis* [online]. 2006, **38**(4), 269–278. ISSN 10225528. Dostupné z: doi:10.1007/s11244-006-0025-6
22. CHOUYYOK, Wilaiwan, Joongjai PANPRANOT, Chanchana THANACHAYANANT a Seerong PRICHANONT. Effects of pH and pore characters of mesoporous silicas on horseradish peroxidase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. 2009, **56**(4), 246–252. ISSN 13811177. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcatb.2008.05.009
23. SZYMAŃSKA, Katarzyna, Jolanta BRYJAK, Julita MROWIEC-BIAŁOŃ a Andrzej B. JARZEBSKI. Application and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain efficient biocatalysts. *Microporous and Mesoporous Materials* [online]. 2007, **99**(1–2), 167–175. ISSN 13871811. Dostupné z: doi:10.1016/j.micromeso.2006.08.035
24. MEHTA, Jyotsana, Neha BHARDWAJ, Sanjeev K. BHARDWAJ, Ki Hyun KIM a Akash DEEP. Recent advances in enzyme immobilization techniques: Metal-organic frameworks as novel substrates. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2016, **322**, 30–40. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2016.05.007

25. BÉTARD, Angélique a Roland A. FISCHER. Metal-organic framework thin films: From fundamentals to applications. *Chemical Reviews* [online]. 2012, **112**(2), 1055–1083. ISSN 00092665. Dostupné z: doi:10.1021/cr200167v
26. LIAN, Xizhen, Yu FANG, Elizabeth JOSEPH, Qi WANG, Jialuo LI, Sayan BANERJEE, Christina LOLLAR, Xuan WANG a Hong-Cai ZHOU. Enzyme–MOF (metal–organic framework) composites. *Chem. Soc. Rev.* [online]. 2017, **46**(11), 3386–3401. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C7CS00058H
27. PARK, Young Kwan, Beom Choi SANG, Hyunuk KIM, Kimoon KIM, Byoung Ho WON, Kihang CHOI, Jung Sik CHOI, Wha Seung AHN, Nayoun WON, Sungjee KIM, Hyun Jung DONG, Seung Hoon CHOI, Ghyung Hwa KIM, Sun Shin CHA, Ho Jhon YOUNG, Kuk Yang JIN a Jaheon KIM. Crystal structure and guest uptake of a mesoporous metal-organic framework containing cages of 3.9 and 4.7 nm in diameter. *Angewandte Chemie - International Edition* [online]. 2007, **46**(43), 8230–8233. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200702324
28. LYKOURINO, Vasiliki, Yao CHEN, Xi Sen WANG, Le MENG, Tran HOANG, Li June MING, Ronald L. MUSSELMAN a Shengqian MA. Immobilization of MP-11 into a mesoporous metal-organic framework, MP-11@mesoMOF: A new platform for enzymatic catalysis. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2011, **133**(27), 10382–10385. ISSN 00027863. Dostupné z: doi:10.1021/ja2038003
29. WANG, Weichen, Weiqing ZHOU, Juan LI, Dongxia HAO, Zhiguo SU a Guanghui MA. Comparison of covalent and physical immobilization of lipase in gigaporous polymeric microspheres. *Bioprocess and biosystems engineering* [online]. 2015, **38**(11), 2107–2115. ISSN 16157605. Dostupné z: doi:10.1007/s00449-015-1450-3
30. ZHONG, Ziwei, Shilong PANG, Yanwen WU, Shu JIANG a Jie OUYANG. Synthesis and characterization of mesoporous Cu–MOF for laccase immobilization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. 2017, **92**(7), 1841–1847. ISSN 10974660. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.5189
31. LIU, Wan-Ling, Sheng-Han LO, Brenda SINGCO, Chun-Chuen YANG, Hsi-Ya HUANG a Chia-Her LIN. Novel trypsin–FITC@MOF bioreactor

- efficiently catalyzes protein digestion. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2013, **1**(7), 928. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/c3tb00257h
32. AN, Ning, Chun Hui ZHOU, Xiao Yu ZHUANG, Dong Shen TONG a Wei Hua YU. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. *Applied Clay Science* [online]. 2015, **114**, 283–296. ISSN 01691317. Dostupné z: doi:10.1016/j.clay.2015.05.029
 33. SANJAY, Gopinath a Sankaran SUGUNAN. Glucoamylase immobilized on montmorillonite: Influence of nature of binding on surface properties of clay-support and activity of enzyme. *Journal of Porous Materials* [online]. 2007, **14**(2), 127–136. ISSN 13802224. Dostupné z: doi:10.1007/s10934-006-9017-y
 34. ÖZTÜRK, Nevra, Ahmet TABAK, Sinan AKGÖL a Adil DENIZLI. Reversible immobilization of catalase by using a novel bentonite-cysteine (Bent-Cys) microcomposite affinity sorbents. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2008, **322**(1–3), 148–154. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2008.03.001
 35. ÖZTÜRK, Nevra, Ahmet TABAK, Sinan AKGÖL a Adil DENIZLI. Newly synthesized bentonite-histidine (Bent-His) micro-composite affinity sorbents for IgG adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2007, **301**(1–3), 490–497. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2007.01.026
 36. KALBURCU, Tulden, Ahmet TABAK, Nevra OZTURK, Nalan TUZMEN, Sinan AKGOL, Bulent CAGLAR a Adil DENIZLI. Adsorption of lysozyme from aqueous solutions by a novel bentonite-tyrptophane (Bent-Trp) microcomposite affinity sorbent. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2015, **1083**(August), 156–162. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2014.11.055
 37. GHIACI, M., H. AGHAEI, S. SOLEIMANIAN a M. E. SEDAGHAT. Enzyme immobilization. Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Applied Clay Science* [online]. 2009, **43**(3–4), 289–295. ISSN 01691317. Dostupné z: doi:10.1016/j.clay.2008.09.008
 38. ZUCCA, Paolo a Enrico SANJUST. Inorganic materials as supports for

- covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules* [online]. 2014, **19**(9), 14139–14194. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules190914139
39. ADLERCREUTZ, Patrick. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Reviews* [online]. 2013, **42**(15), 6406. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/c3cs35446f
 40. D'SOUZA, S.F. *Immobilized enzyme in bioprocess*. 1999
 41. SHELDON, Roger A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis* [online]. 2007, **349**(8–9), 1289–1307. ISSN 16154150. Dostupné z: doi:10.1002/adsc.200700082
 42. TAQIEDDIN, Ehab a Mansoor AMIJI. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials* [online]. 2004, **25**(10), 1937–1945. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2003.08.034
 43. KRAJEWSKA, Barbara. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2004, **35**(2–3), 126–139. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.013
 44. WAHBA, Marwa I. Porous chitosan beads of superior mechanical properties for the covalent immobilization of enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **105**, 894–904. ISSN 18790003. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.102
 45. ALTUN, Gamze Durgun a Senay Akkus CETINUS. Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry* [online]. 2007, **100**(3), 964–971. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.005
 46. AKKUŞ ÇETINUS, Şenay a H. NURSEVIN ÖZTOP. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2003, **32**(7), 889–894. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-0229(03)00065-6
 47. HE, Linghao, Lu YAO, Fujun LIU, Bing QIN, Rui SONG a Wei HUANG. Magnetic Fe₃O₄@ Chitosan Nanoparticle: Synthesis, Characterization and Application as Catalyst Carrier. *Journal of nanoscience and nanotechnology* [online]. 2010, **10**(10), 6348–6355. ISSN 1533-4880. Dostupné z: doi:10.1166/jnn.2010.2549

48. JU, Hen Yi, Chia Hung KUO, Jui Rze TOO, Hsin Yi HUANG, Yawo Kuo TWU, Chieh Ming J CHANG, Yung Chuan LIU a Chwen Jen SHIEH. Optimal covalent immobilization of α -chymotrypsin on Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. 2012, **78**, 9–15. ISSN 13811177. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcatb.2012.01.015
49. WU, Yue, Yujun WANG, Guangsheng LUO a Youyuan DAI. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution. *Bioresource Technology* [online]. 2009, **100**(14), 3459–3464. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2009.02.018
50. ZHANG, Yaodong, Li LI, Caihong YU a Tingting HEI. Chitosan-coated polystyrene microplate for covalent immobilization of enzyme. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2011, **401**(7), 2311–2317. ISSN 16182642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5306-7
51. MENDES, Adriano A., Heizir F. DE CASTRO, Grazielle S S ANDRADE, Paulo W. TARDIOLI a Raquel De L C GIORDANO. Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2013, **73**(1), 160–167. ISSN 13815148. Dostupné z: doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2012.08.023
52. SILVA, J. A., G. P. MACEDO, D. S. RODRIGUES, R. L.C. GIORDANO a L. R.B. GONÇALVES. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2012, **60**, 16–24. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2011.09.011
53. CHIOU, Shao Hua a Wen Teng WU. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials* [online]. 2004, **25**(2), 197–204. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00482-4
54. LUO, Xi Liang, Jing Juan XU, Ying DU a Hong Yuan CHEN. A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Analytical Biochemistry* [online]. 2004, **334**(2), 284–289. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2004.07.005

55. LUO, Xi Liang, Jing Juan XU, Qing ZHANG, Gong Jun YANG a Hong Yuan CHEN. Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2005, **21**(1), 190–196. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2004.07.029
56. KATCHALSKI-KATZIR, Ephraim a Dieter M. KRAEMER. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* [online]. 2000, **10**(1–3), 157–176. ISSN 13811177. Dostupné z: doi:10.1016/S1381-1177(00)00124-7
57. MARTÍN, M. Teresa, Francisco J. PLOU, Miguel ALCALDE a Antonio BALLESTEROS. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. 2003, **21**(4–6), 299–308. ISSN 13811177. Dostupné z: doi:10.1016/S1381-1177(02)00264-3
58. MATEO, Cesar, Olga ABIAN, Roberto FERNANDEZ-LAFUENTE a Jose M. GUISAN. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2000, **26**(7), 509–515. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-0229(99)00188-X
59. KNEZEVIC, Zorica, Nenad MILOSAVIC, Dejan BEZBRADICA, Zivana JAKOVLJEVIC a Radivoje PRODANOVIC. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2006, **30**(3), 269–278. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2006.05.009
60. TU, Maobing, Xiao ZHANG, Arwa KURABI, Neil GILKES, Warren MABEE a Jack SADDLER. Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology Letters* [online]. 2006, **28**(3), 151–156. ISSN 01415492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-005-5328-3
61. WANG, P, S DAI, S D WAEZSADA, A Y TSAO a B H DAVIDSON. Enzyme stabilization by covalent binding in nonoparous sol-gel glass for nonaqueous biocatalysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 2001, **74**(3), 249–255.
62. GONZÁLEZ-DELGADO, Isabel, Yolanda SEGURA, Antonio MARTÍN,

- María José LÓPEZ-MUÑOZ a Gabriel MORALES. β -galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS). *Microporous and Mesoporous Materials* [online]. 2018, **257**, 51–61. ISSN 13871811. Dostupné z: doi:10.1016/j.micromeso.2017.08.020
63. KAHRAMAN, M. Vezir, Gülay BAYRAMOĞLU, Nilhan KAYAMAN-APOHAN a Atila GÜNGÖR. α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chemistry* [online]. 2007, **104**(4), 1385–1392. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.054
64. GÓMEZ, J. L., A. BÓDALO, E. GÓMEZ, J. BASTIDA, A. M. HIDALGO a M. GÓMEZ. Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2006, **39**(5), 1016–1022. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2006.02.008
65. DYAL, Ansil, Katja LOOS, Mayumi NOTO, Seung W. CHANG, Chiara SPAGNOLI, Kurikka V.P.M. SHAFI, Abraham ULMAN, Mary COWMAN a Richard A. GROSS. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2003, **125**(7), 1684–1685. ISSN 00027863. Dostupné z: doi:10.1021/ja021223n
66. LI, Dan, Wey Yang TEOH, J. Justin GOODING, Cordelia SELOMULYA a Rose AMAL. Functionalization strategies for protease immobilization on magnetic nanoparticles. *Advanced Functional Materials* [online]. 2010, **20**(11), 1767–1777. ISSN 1616301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.201000188
67. ZHU, Yuan Ting, Xiao Yun REN, Yi Ming LIU, Ying WEI, Lin Sen QING a Xun LIAO. Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: Characterization and application for enzymatic inhibition assays. *Materials Science and Engineering C* [online]. 2014, **38**(1), 278–285. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2014.02.011
68. DAVID, Allan E, Arthur J YANG a Nam Sun WANG. Enzyme Stabilization and Immobilization by Sol-Gel Entrapment. In: Shelley D MINTEER, ed.

- Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, s. 49–66. ISBN 978-1-60761-895-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-895-9_6
69. MAHREEN, Matto a Husain QAYYUM. Entrapment of porous and stable concanavalin A–peroxidase complex into hybrid calcium alginate–pectin gel. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. nedatováno, **81**(7), 1316–1323. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.1540
70. SANKALIA, Mayur G, Rajshree C MASHRU, Jolly M SANKALIA a Vijay B SUTARIYA. Stability improvement of alpha-amylase entrapped in kappa-carrageenan beads: Physicochemical characterization and optimization using composite index. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2006, **312**(1), 1–14. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.048
71. BEZERRA, Camilla Salviano, Celina Maria Gentil DE FARIAS LEMOS, Marylane DE SOUSA a Luciana Rocha Barros GONÇALVES. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2015, **132**(26), 1–15. ISSN 10974628. Dostupné z: doi:10.1002/app.42125
72. AVNIR, David, Sergei BRAUN, Ovadia LEV a Michael OTTOLENGHI. Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials. *Chemistry of Materials* [online]. 1994, **6**(10), 1605–1614. ISSN 15205002. Dostupné z: doi:10.1021/cm00046a008
73. PIERRE, A. C. The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatalysis and Biotransformation* [online]. 2004, **22**(3), 145–170. ISSN 10242422. Dostupné z: doi:10.1080/10242420412331283314
74. DAS, Sudipto, David BERKE-SCHLESSEL, Hai Feng JI, John MCDONOUGH a Yen WEI. Enzymatic hydrolysis of biomass with recyclable use of cellobiase enzyme immobilized in sol-gel routed mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. 2011, **70**(1–2), 49–54. ISSN 13811177. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcatb.2011.02.003
75. JIN, Wen a John D. BRENNAN. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2002, **461**(1), 1–36. ISSN 00032670. Dostupné

- z: doi:10.1016/S0003-2670(02)00229-5
76. BRAUN, Sergei, Sara RAPPOPORT, Rivka ZUSMAN, David AVNIR a Michael OTTOLENGHI. Biochemically active sol-gel glasses: The trapping of enzymes. *Materials Letters* [online]. 2007, **61**(14–15), 2843–2846. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2007.03.046
 77. REETZ, Manfred T. Practical Protocols for Lipase Immobilization Via Sol-Gel Techniques. In: Jose M GUISAN, ed. *Immobilization of Enzymes and Cells* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2006, s. 65–76. ISBN 978-1-59745-053-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-59745-053-9_6
 78. GUPTA, R. a N. K. CHAUDHURY. Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2007, **22**(11), 2387–2399. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2006.12.025
 79. GILL, Iqbal a Antonio BALLESTEROS. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol gel encapsulated biologicals. *Trends in Biotechnology* [online]. 2000, **18**(7), 282–296. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/s0167-7799(00)01457-8
 80. TURNIANSKY, A, D AVNIR, A BRONSHTEIN, N AHARONSON a M ALTSTEIN. Sol-gel entrapment of monoclonal anti-atrazine antibodies. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* [online]. 1996, **7**(1–2), 135–143. ISSN 0928-0707. Dostupné z: doi:10.1007/BF00401894
 81. PARK, Byung Wook, Do Young YOON a Dong Shik KIM. *Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes* [online]. 2010. ISBN 0956-5663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2010.04.033
 82. BRUCHET, Marion a Artem MELMAN. Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through reductive cation exchange. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, **131**, 57–64. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.021
 83. SCHACHSCHAL, Susann, Hans Juergen ADLER, Andrij PICH, Stefanie WETZEL, Anke MATURA a Karl Heinz VAN PEE. Encapsulation of enzymes in microgels by polymerization/cross-linking in aqueous droplets. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2011, **289**(5–6), 693–698. ISSN 0303402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-011-2392-1
 84. PIACENTINI, Emma, Mengying YAN a Lidietta GIORNO. Development of

- enzyme-loaded PVA microspheres by membrane emulsification. *Journal of Membrane Science* [online]. 2017, **524**(July 2016), 79–86. ISSN 18733123. Dostupné z: doi:10.1016/j.memsci.2016.11.008
85. WALDE, Peter a Sosaku ICHIKAWA. Enzymes inside lipid vesicles: Preparation, reactivity and applications. *Biomolecular Engineering* [online]. 2001, **18**(4), 143–177. ISSN 13890344. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-0344(01)00088-0
 86. GREGORIADIS, Gregory. [17] Enzyme entrapment in liposomes. In: *Immobilized Enzymes* [online]. B.m.: Academic Press, 1976, Methods in Enzymology, s. 218–227. ISSN 0076-6879. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/S0076-6879(76)44019-3
 87. GRAFF, Alexandra, Mathias WINTERHALTER a Wolfgang MEIER. Nanoreactors from polymer-stabilized liposomes. *Langmuir* [online]. 2001, **17**(3), 919–923. ISSN 07437463. Dostupné z: doi:10.1021/la001306m
 88. YOSHIMOTO, Makoto, Shaoqing WANG, Kimitoshi FUKUNAGA, Didier FOURNIER, Peter WALDE, Ryoichi KUBOI a Katsumi NAKAO. Novel immobilized liposomal glucose oxidase system using the channel protein OmpF and catalase. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2005, **90**(2), 231–238. ISSN 00063592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.20422
 89. ZHU, Yanan, Yanjun JIANG, Jing GAO, Liya ZHOU, Ying HE a Fei JIA. Immobilization of glucose oxidase in liposome-templated biomimetic silica particles. *Chinese Journal of Catalysis* [online]. 2013, **34**(4), 741–750. ISSN 18722067. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-2067(11)60519-6
 90. NGO, Kien Xuan, Hiroshi UMAKOSHI, Toshinori SHIMANOUCI, Hiroyuki SUGAYA a Ryoichi KUBOI. Chitosanase displayed on liposome can increase its activity and stability. *Journal of Biotechnology* [online]. 2010, **146**(3), 105–113. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.014
 91. CAO, Linqiu, Luuk VAN LANGEN a Roger A. SHELDON. Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2003, **14**(4), 387–394. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-1669(03)00096-X
 92. MIGNEAULT, Isabelle, Catherine DARTIGUENAVE, Michel J. BERTRAND a Karen C. WALDRON. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution,

- reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* [online]. 2004, **37**(5), 790–802. ISSN 07366205. Dostupné z: doi:10.2144/3705A0790
93. HUBLAND, Am. Cross-linked enzyme crystals Dietmar Häring and Peter Schreier *. 1999, 35–38.
 94. GOVARDHAN, Chandrika P. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 1999, **10**(4), 331–335. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-1669(99)80060-3
 95. ROY, J. Jegan a T. Emilia ABRAHAM. Strategies in making cross-linked enzyme crystals. *Chemical Reviews* [online]. 2004, **104**(9), 3705–3721. ISSN 00092665. Dostupné z: doi:10.1021/cr0204707
 96. MARGOLIN, Alexey L. Novel crystalline catalysts. *Trends in Biotechnology* [online]. 1996, **14**(7), 223–230. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10031-7
 97. NORITOMI, Hidetaka, Akihiro SASANUMA, Satoru KATO a Kunio NAGAHAMA. Catalytic properties of cross-linked enzyme crystals in organic media. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2007, **33**(3), 228–231. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.024
 98. DELANGE ROBERT J., Smith Emil L. Subtilisin Carlsberg. *The Journal of Biological Chemistry*. 1968, **243**(9), 2134–2143.
 99. CAO, Linqiu, Fred VAN RANTWIJK a Roger A. SHELDON. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Organic Letters* [online]. 2000, **2**(10), 1361–1364. ISSN 1523-7060. Dostupné z: doi:10.1021/ol005593x
 100. SHELDON, R.A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2007, **35**(6), 1583–1587. ISSN 0300-5127. Dostupné z: doi:10.1042/BST0351583
 101. GUPTA, Munishwar N a Smita RAGHAVA. Enzyme Stabilization via Cross-Linked Enzyme Aggregates. In: Shelley D MINTEER, ed. *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, s. 133–145. ISBN 978-1-60761-895-9.

Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-895-9_11

102. SHELDON, Roger A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, **92**(3), 467–477. ISSN 01757598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-011-3554-2
103. SHELDON, R. A., R. SCHOEVAART a L. M. VAN LANGEN. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation* [online]. 2005, **23**(3–4), 141–147. ISSN 10242422. Dostupné z: doi:10.1080/10242420500183378
104. KIM, Moon Il, Jungbae KIM, Jinwoo LEE, Hongfei JIA, Hyon Bin NA, Jong Kyu YOUN, Ja Hun KWAK, Alice DOHNALKOVA, Jay W GRATE, Ping WANG, Taeghwan HYEON, Hyun Gyu PARK a Ho Nam CHANG. Crosslinked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica: A simple and effective method for enzyme stabilization. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. nedatováno, **96**(2), 210–218. Dostupné z: doi:10.1002/bit.21107
105. TALEKAR, Sachin, Asavari JOSHI, Gandhali JOSHI, Priyanka KAMAT, Rutumbara HARIPURKAR a Shashikant KAMBALE. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Advances* [online]. 2013, **3**(31), 12485. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c3ra40818c
106. PASTOR, Marta, Amaia ESQUISABEL a José Luis PEDRAZ. Biomedical Applications of Immobilized Enzymes: An Update. In: Jose M GUISAN, ed. *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, s. 285–299. ISBN 978-1-62703-550-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-550-7_19
107. JADHAV, Kisan R., Shirish V. SANKPAL, Sahil M. GAVALI, Sneha V. SAWANT a Vilasrao J. KADAM. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as drug carrier. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* [online]. 2012, **12**(1), 79–88. ISSN 0976044X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2003.11.018
108. HALFON-DOMENECH, Carine, Xavier THOMAS, Sylvie CHABAUD, Andre BARUCHEL, François GUEYFFIER, Françoise MAZINGUE, Anne

- AUVRIGNON, Selim CORM, Herve DOMBRET, Patrice CHEVALLIER, Claire GALAMBRUN, Françoise HUGUET, Faezeh LEGRAND, Françoise MECHINAUD, Norbert VEY, Irène PHILIP, David LIENS, Yann GODFRIN, Dominique RIGAL a Yves BERTRAND. L-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: Results of the GRASPALL 2005-01 randomized trial. *British Journal of Haematology* [online]. 2011, **153**(1), 58–65. ISSN 00071048. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08588.x
109. SASSOLAS, Audrey, Loïc J. BLUM a Béatrice D. LECA-BOUVIER. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* [online]. 2012, **30**(3), 489–511. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.003
110. LIANG, Jun F, Yong T LI a Victor C YANG. MINI-REVIEW Biomedical Application of Immobilized Enzymes. *J Pharm Sci* [online]. 2000, **89**(8), 979–990. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1002/1520-6017(200008)89:8<979::aid-jps2>3.0.co;2-h
111. C., Clark Leland a Lyons CHAMP. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. nedatováno, **102**(1), 29–45. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x
112. D'ORAZIO, Paul. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2003, **334**(1–2), 41–69. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-8981(03)00241-9
113. YOO, Eun Hyung a Soo Youn LEE. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors* [online]. 2010, **10**(5), 4558–4576. ISSN 14248220. Dostupné z: doi:10.3390/s100504558
114. WANG, Joseph. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews* [online]. 2008, **108**(2), 814–825. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr068123a
115. CHAUBEY, Asha a B. D. MALHOTRA. Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2002, **17**(6–7), 441–456. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(01)00313-X
116. DAS, Priyanki, Madhuri DAS, Somasekhar R. CHINNADAYYALA, Irom Manoj SINGHA a Pranab GOSWAMI. Recent advances on developing 3rd

- generation enzyme electrode for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **79**, 386–397. ISSN 18734235. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2015.12.055
117. NEWMAN, Jeffrey D. a Anthony P.F. TURNER. Home blood glucose biosensors: A commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2005, **20**(12), 2435–2453. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2004.11.012
118. RASSAEI, Liza, Wouter OLTHUIS, Seiya TSUJIMURA, Ernst J.R. SUDHÖLTER a Albert VAN DEN BERG. Lactate biosensors: Current status and outlook. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2014, **406**(1), 123–137. ISSN 16182642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-013-7307-1
119. CHOI, Martin M.F. Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. *Microchimica Acta* [online]. 2004, **148**(3–4), 107–132. ISSN 00263672. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-004-0273-8
120. GERARD, Manju, Asha CHAUBEY a B. D. MALHOTRA. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2002, **17**(5), 345–359. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(01)00312-8