

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



Diplomová práce

**Imobilizace proteinových
makromolekul na polymerní nosiče**

Protein macromolecules immobilization onto polymer
carriers

Michaela Šitnerová

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

Hradec Králové

2017

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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne:

Podpis:

Děkuji PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při vypracování diplomové práce a pplk. prof. RNDr. Miroslavu Pohankovi, Ph.D., DSc. za ochotu a pomoc při realizaci zadaných úkolů.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Posluchač: Michaela Šitnerová

Název diplomové práce: Imobilizace proteinových makromolekul na polymerní nosiče

Enzymy jsou pro své vlastnosti unikátními biokatalyzátory. Jsou vysoce specifické, selektivní a funkční i při mírných reakčních podmínkách. Ke zvýšení jejich operační stability, aktivity a možnosti opětovného užití je využívána metoda imobilizace. Tento proces umožňuje široké uplatnění enzymů v průmyslu. Například v oblasti potravinářství, zemědělství, analytické chemie, chemické syntézy či ve farmaceutickém průmyslu. Cílem mé práce byla imobilizace enzymu acetylcholinesterasy (AChE) na pelety z mikrokryalické celulosy (MCC). Využívána byla metoda prosté sorpce, imobilizace pomocí glutaraldehydu a oxidace MCC pomocí TEMPO. K měření aktivity AChE sloužila dobře známá Ellmanova metoda. Absorbance roztoku s imobilizovanou AChE byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Student: Michaela Šitnerová

Title of Thesis: Protein macromolecules immobilization onto polymer carriers

Enzymes are unique biocatalysts because of their properties. They are highly specific, selective and functional even under mild reaction conditions. The method of immobilization is used to increase their operational stability, activity and possible reuse. This process allows the wide use of enzymes in industry, for example in the food industry, analytical chemistry, chemical synthesis and in the pharmaceutical industry. The aim of my thesis was immobilized enzyme acetylcholinesterase (AChE) on the surface pellets of microcrystalline cellulose (MCC). Used method was simple sorption, immobilization using glutaraldehyde, and TEMPO oxidation using MCC. Well known Ellman's method served to measure the activity of AChE. The absorbance of the solution with the immobilized AChE was measured spectrophotometrically at 412 nm.

Obsah

Seznam zkratk	8
Cíl práce	9
Úvod.....	10
Teoretická část	11
1 Acetylcholinesterasa	11
1.1 Význam a funkce v organismu.....	11
1.2 Struktura enzymu	12
1.3 Inhibitory AChE.....	15
1.4 Stanovení aktivity AChE	15
2. Mikrokrystalická celulóza	17
2.1 Vlastnosti MCC a její význam v klinické praxi.....	18
2.2 Oxidace MCC pomocí TEMPO	19
3. Imobilizační techniky.....	20
3.1 Výhody a nedostatky imobilizovaných enzymů	20
3.2 Typy imobilizace	21
4. Terminologie užívaná pro imobilizaci enzymů	27
4.1 Výtěžek imobilizace.....	27
4.2 Účinnost imobilizace	27
4.3 Obnova aktivity enzymu	27
5. Imobilizovaný enzym ve funkci biosenzoru	28
5.1 Biosenzory acetylcholinesterasy	29
5.2 Optické biosenzory	29
5.3 Elektrochemické biosenzory	31

Experimentální část.....	32
6. Materiál a použité metody.....	32
6.1 Chemikálie a přístroje	32
6.2 Metody měření	32
7. Výsledky	36
8. Diskuse.....	51
9. Závěr	53
10. Seznam literatury	54

Seznam zkratek

ACh – acetylcholin

AChE – acetylcholinesterasa

Asp – asparagová kyselina

ATChCl – acetylthiocholin

BChE - butyrylcholinesterasa

BSA – bovinní sérový albumin

CLEAs – crosslinked enzyme aggregates

CLECs – crosslinked enzyme crystals

DTNB – 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina

FET – tranzistor řízený elektrickým polem

GA - glutaraldehyd

Glu – glutamová kyselina

GPI – glykofosfatidylinositol

His – histidin

MCC – mikrokrytalická celulosa

Phe - fenylalanin

Ser – serin

Trp – tryptofan

Tyr – tyrosin

VNS – vegetativní nervový systém

Cíl práce

Cílem teoretické části této práce je znázornění struktury acetylcholinesterasy, objasnění imobilizačních technik a zdůraznění výhod, které přinášejí.

Náplní experimentální části práce je pak vlastní imobilizace proteinové makromolekuly na polymerní nosič – konkrétně acetylcholinesterasy na pelety z mikrokrystalické celulosy. Dále hodnocení parametrů enzymové aktivity a sestavení vhodného imobilizačního protokolu. Zvolená metoda imobilizace by měla být maximálně šetrná k použitému enzymu, aby nedošlo k poškození jeho funkce a byla zachována co možná nejvyšší měřitelná aktivita.

Úvod

Enzymy jako biokatalyzátory vykazují řadu velmi výhodných vlastností v porovnání s konvenčními chemickými katalyzátory. Jsou vysoce aktivní, specifické a funkční i za mírných podmínek tlaku, teploty a pH (1). Práce s enzymy je vysoce ekonomická i šetrná k životnímu prostředí. Aplikovány jsou v potravinářství, zemědělství, v oblasti analytické chemie, organické syntézy i v medicíně a ve farmaceutickém průmyslu.

Během manipulace však enzymy ztrácejí svou přirozenou strukturu, funkčnost, stabilitu a aktivitu. Metoda imobilizace je krokem k zachování, optimalizaci či zvýšení enzymové aktivity (2). Imobilizovaný enzym lze navíc použít opakovaně, čímž se výrazně sníží jeho počáteční cena. Jednotlivé imobilizační techniky, které budou diskutovány níže, můžeme rozdělit dle původu nosiče nebo dle principu fixace biokatalyzátoru (3). Rozebrány budou imobilizace na nosič, zachycení do membrán i zesílení enzymů tzv. crosslink. Jako předlohouv molekula enzymu byla v této práci zvolena acetylcholinesterasa. Její struktura a význam funkce v organismu znázorňuje první kapitola. Imobilizované enzymy jsou hojně využívány ke konstrukci biosenzorů mající velký potenciál zejména v medicíně, monitorování polutantů životního prostředí a ve farmaceutické analýze. V práci bude pojednáno o optických a elektrochemických biosenzorech a o biosenzorech založených na acetylcholinesterase. V následujících letech bude potřeba řada dalších výzkumů a studií imobilizačních technik, aby byly výše zmíněné vlastnosti, kterými enzymy disponují, plně využity.

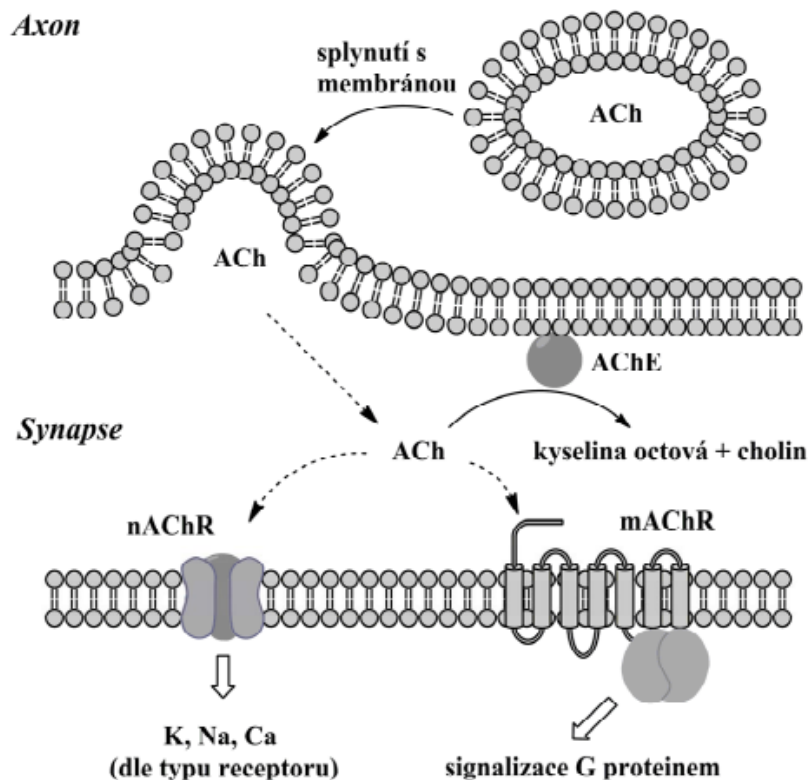
Teoretická část

1 Acetylcholinesterasa

1.1 Význam a funkce v organismu

Acetylcholinesterasa je enzym ze skupiny esteras štěpící molekulu acetylcholinu na bazický cholin a kyselinu octovou, čímž je kontrolována správná doba trvání přenosu cholinergního signálu. V aktivním centru se nachází katalytická triáda Ser – 200, His – 440, Glu – 327 (sekvence aminokyselin AChE elektrického úhoře) obdobně jako u dalších α/β hydrolas (4). Účinek acetylcholinu trvá velmi krátce. Je tak zabráněno poškození organismu vlivem hyperstimulace membrán cholinergních neuronů (5-6).

Mezi cholinergní neurony patří presynaptické neurony vegetativního nervového systému, postsynaptické neurony parasymphatické části VNS a taktéž neurony vegetativních ganglií a nervosvalových plotének. Dle stavby receptorových proteinů rozlišujeme muskarinové a nikotinové receptory acetylcholinu. Muskarinové receptory odvozené od specifického účinku muskarinu z muchomůrky červené (*Amanita muscaria*) jsou spojeny s G-proteinem, zatímco nikotinové, odvozené od účinku nikotinu, s iontovým kanálem (6). AChE lze kromě nervového systému nalézt i v krevním řečišti – v erythrocytech, proto někdy bývá označována také jako krevní cholinesterasa (4). Parasymphatomimetické účinky acetylcholinu způsobují miózu a pokles nitroočního tlaku, zvýšení motility hladkého svalstva žaludku, střev a močového měchýře, relaxaci sfinkterů, zvýšení sekrece žláz, konstrikcii bronchů a vasodilataci mimo oblast srdce. V centrálním nervovém systému má acetylcholin taktéž nezastupitelnou roli jako excitační a v některých případech i inhibiční neuromediátor (5).



Obrázek 1 Acetylcholinová neurotransmise (7)

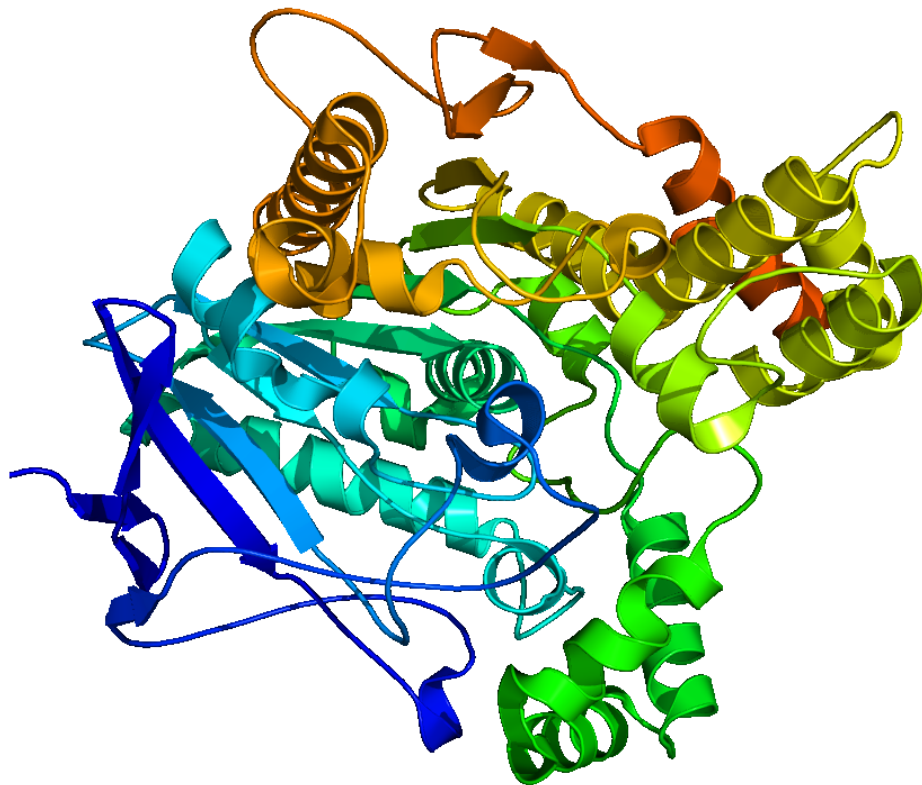
1.2 Struktura enzymu

Molekula AChE je tvořena dvěma peptidovými řetězci označovanými jako α a β . β -řetězec obsahuje β -anionické místo – lokalizované na povrchu enzymu a oblast hydrofobních interakcí, která bývá označována jako γ -anionické místo či aromatické hrdlo. Tato místa obsahují větší množství aromatických aminokyselin jako je Tyr, Trp a Asp (5,7). Aromatické hrdlo umožňuje selektivitu AChE k ACh, jehož penetraci dovoluje kation – π interakce mezi kvartérním amoniem ACh a π – elektrony aromatických jader Phe, Trp a Tyr. β -anionické místo je cílem mnoha inhibitorů enzymu (4).

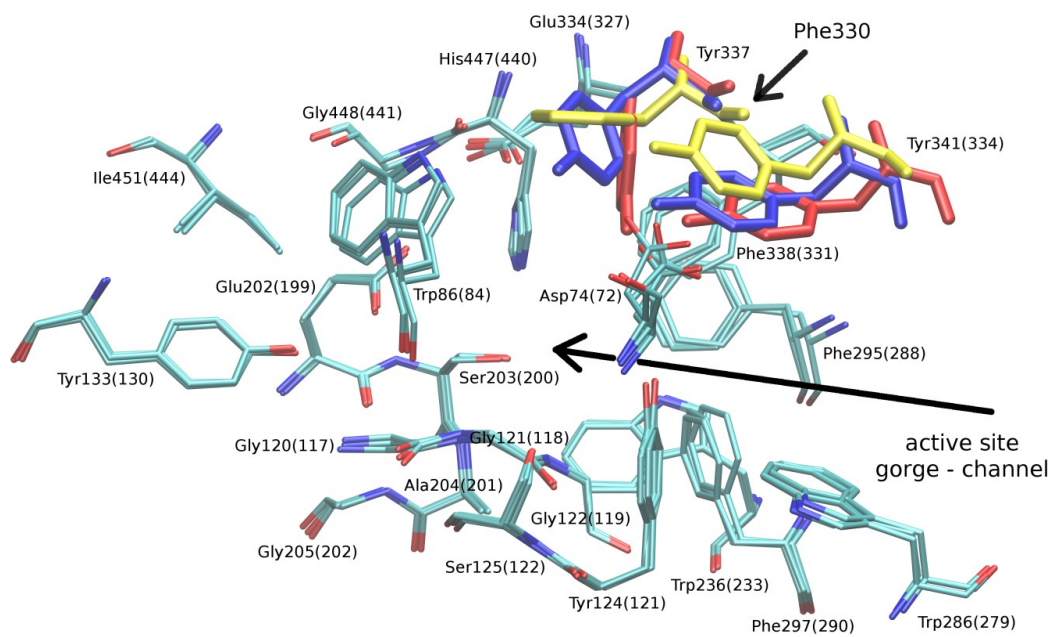
Aktivní místo enzymu, kde je rozkládána molekula ACh, je umístěno v α -řetězci na konci dlouhé a úzké dutiny. Obsahuje jednak α -anionické místo tvořené Asp popřípadě Glu, ale i katalytické centrum, v němž hraje nezbytnou roli Ser (5,7). α -anionická část interaguje s kvartérním amoniem AChE a je zodpovědná za její správnou orientaci (4).

Interakce ACh s AChE je obdobou vazby acetylcholinu na cholinergní receptory. Prvním krokem k vytvoření vazby mezi ACh a AChE je právě vazba amoniové skupiny a α -anionického centra. Neméně důležitou úlohu zde zaujímají i hydrofobní interakce. Cholin je následně uvolněn a zbytek kyseliny octové esterifikuje serinový hydroxyl estratického centra, čímž vznikne acetylovaná AChE. Ke spontánnímu návratu aktivity enzymu dochází velmi rychlým hydrolytickým odštěpením kyseliny octové (5,7).

V uspořádání kvartérní struktury AChE převažuje tetrametr G4, může se však objevit i ve formě mono-, di- či trimeru. Jedná se o amfifilní molekulu, obsahující hydrofilní i hydrofobní oblasti. Ve struktuře se nachází i jedna ne-katalytická podjednotka P o molekulové hmotnosti 20 kDa, která je asymetricky vázaná ke dvěma G podjednotkám. Z chemického hlediska jde o glykofosfatidylinositol (GPI) označovaný jako GPI kotva. V případě lidské AChE je lipofilní částí kotvy GPI palmitát. Dle experimentů je dohromady volných i membránově vázaných molekul AChE 83% amfifilních a jen 17% hydrofilních (4).



Obrázek 2 3D struktura AChE (8)



Obrázek 3 Detailní struktura aktivního centra acetylcholinesterasy (9)

1.3 Inhibitory AChE

Inhibitor je látka snižující aktivitu enzymu, aniž by způsobila jeho destrukci. Inhibice může být kompetitivní, kdy se inhibitor váže do stejného místa jako substrát či nekompetitivní, kdy inhibitor, váže se do jiného než aktivního místa, mění konformaci enzymu. Vazba může být ireverzibilní nebo reverzibilní charakteru (10,11).

Toxiny inhibující AChE spadají do dvou hlavních skupin – organofosfáty a karbamáty. Organofosfáty jako například bojové plyny, některé pesticidy a léky ireversibilně inhibují AChE vazbou na Ser v aktivním centru enzymu. V případě karbamátů dochází po pseudoireverzibilní inhibici ke spontánní hydrolyze karbamoylu. Takrin, který byl použit při experimentu je po chemické stránce 1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin inhibující α - i β -anionické místo AChE. V minulosti byl pod značkou Cognex preferovaným lékem v terapii Alzheimerovi nemoci. Takrin je metabolizován komplexem cytochromů P450, nejvíce pak izoformou 1A2. Pro svou hepatotoxicitu byl však stažen z trhu a nadále se již nepoužívá (12).

1.4 Stanovení aktivity AChE

V této práci byla ke stanovení aktivity acetylcholinesterasy použita dobře známá Ellmanova metoda. Substrátem AChE je namísto acetylcholinu acetylthiocholin, který hydrolyzou poskytuje thiocholin a kyselinu octovou. Thiocholin následně spontánně reaguje s kyselinou 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoovou (DTNB). Reakcí vzniká intenzivně žlutá kyselina 5-thio-2-nitrobenzoová, jejíž absorpční lze změřit pomocí spektrofotometrie při vlnové délce 412 nm (7).

2. Mikrokrystalická celuloza

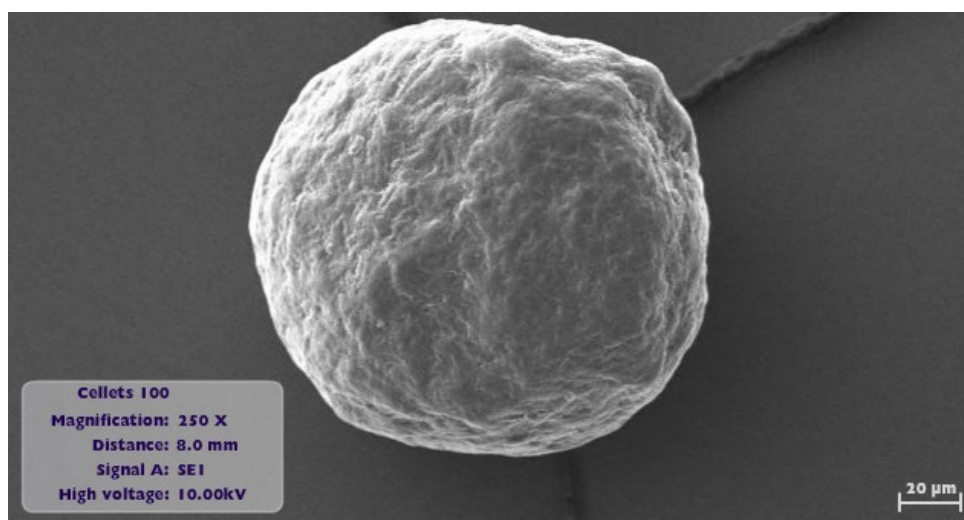
Nosiči imobilizovaných enzymů jsou často rozmanité biopolymery. Například nerozpustné polysacharidy – celuloza, škrob, agarosa a chitosan či biopolymery proteinové struktury – želatina, albumin.

Čím menší je velikost částic nosiče, tím větší je povrch pro imobilizaci enzymu. Byla testována již řada nanočástic a nanovláken s vysokou stabilitou (14).

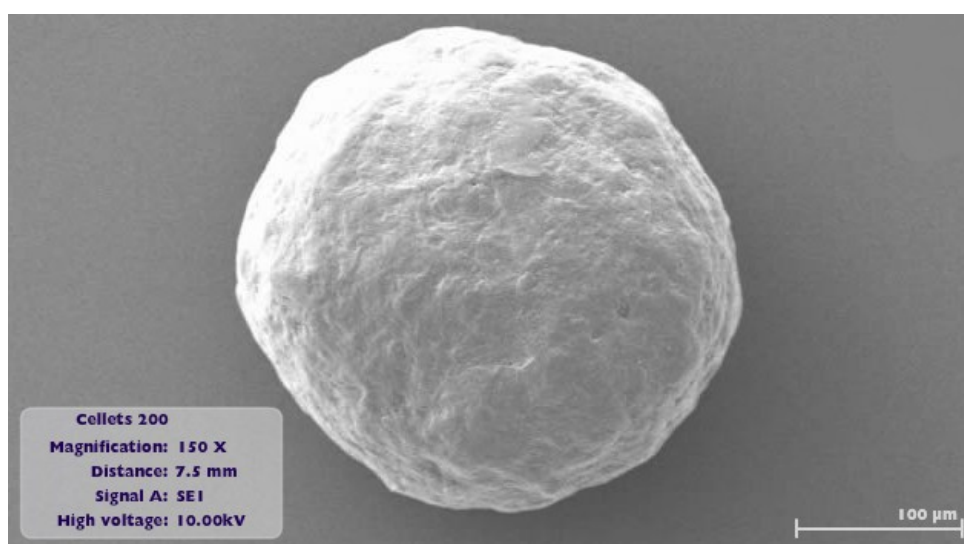
Celety neboli pelety z mikrokrystalické celulosy použité v experimentální části práce jsou vyráběny pouze z mikrokrystalické celulosy dle Ph.Eur./USP a čištěné vody bez dalších pomocných látek. Uplatnění nacházejí především jako universální jádra pro vícečásticové lékové formy (15).

2.1 Vlastnosti MCC a její význam v klinické praxi

Celety jsou dokonale kulovité, inertní částice s nízkou drobivostí a úzkou distribucí velikosti částic, což zajišťuje jejich extrémní stabilitu. Jsou bez chuti a bez zápachu. Nerozpustné ve vodě, etanolu, acetonu, toluenu, zředěných kyselinách a roztocích hydroxidu sodného (50 g/l). Velikost částic celet 100 se pohybuje v rozmezí mezi 100-200 μm a celet 200 mezi 200-355 μm . Vzhledem ke svým vlastnostem jsou celety vysoce snášitelné a bezpečné pro pacienty. Používají se především do tablet ve funkci plniva (15).



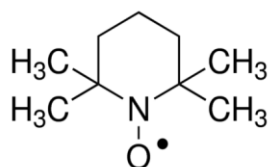
Obrázek 7 Celety 100 (15)



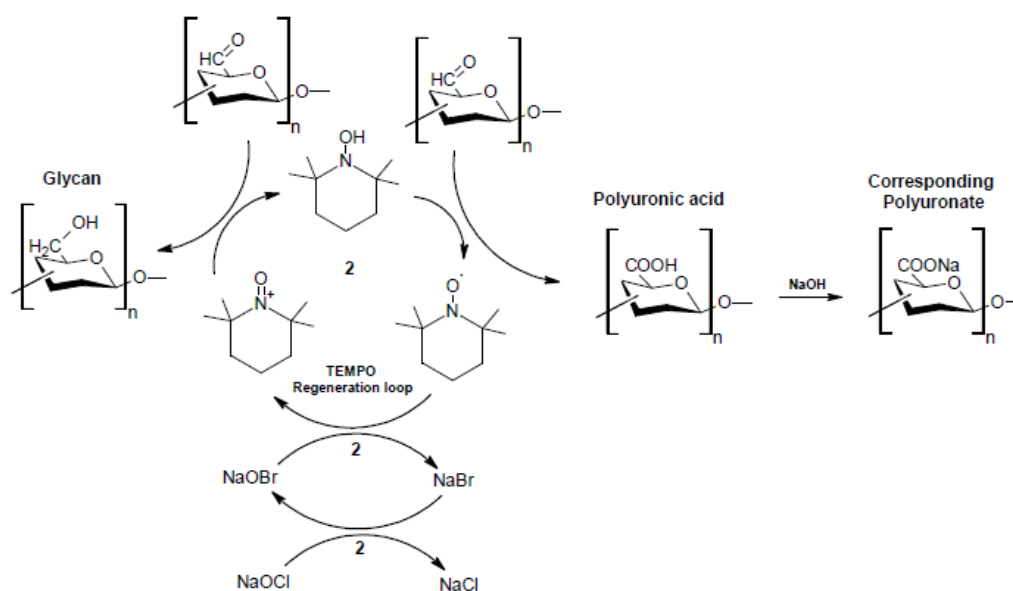
Obrázek 8 Celety 200 (15)

2.2 Oxidace MCC pomocí TEMPO

Chemicky je TEMPO 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-1-oxy, přičemž nespárovaný elektron je delokalizován mezi atomy dusíku a kyslíku. Oxidace polysacharidů pomocí TEMPO je vysoce selektivní a probíhá i za mírných a snadno kontrolovatelných reakčních podmínek. V dřívějších letech byly polysacharidy oxidovány NO_2 respektive N_2O_4 , což vedlo k nízké účinnosti a specifičnosti reakce. Docházelo také k depolymerizaci sacharidů a vzniku nechtěných vedlejších reakcí. TEMPO katalyzuje regioselektivní oxidaci primární alkoholové skupiny oxoamoniovým kationtem vznikajícím během reakce. Pro regeneraci TEMPO in situ se jako vhodný oxidant ukázal NaOCl v kombinaci s katalytickým množstvím NaBr. Reakce probíhá při nízkých teplotách 0-4 °C v bazickém prostředí při pH 9-12. Takto modulovaná struktura celulosy vykazuje zlepšené fyzikálně chemické vlastnosti, proto i v experimentální části této práce byla oxidace pomocí TEMPO využita (16).



Obrázek 9 Struktura TEMPO (17)



Obrázek 10 Oxidace polysacharidů zprostředkovaná TEMPO poskytující odpovídající polyuronové kyseliny (16)

3. Imobilizační techniky

Enzymy mají řadu výhodných vlastností, jakými jsou vysoká stabilita, selektivita a specifita, avšak jejich široké využití v průmyslu nese řadu omezení. V dnešní době je již mnoho dostupných technik poskytujících zlepšení vybraných enzymových funkcí. Imobilizace řeší řadu problémů stability a selektivity, obnovu aktivity a opětovné použití enzymů či redukci inhibice způsobené meziprodukty a produkty syntézy (18).

3.1 Výhody a nedostatky imobilizovaných enzymů

Imobilizace je rychlým procesem probíhajícím za mírných reakčních podmínek – fyziologické pH a teplota s použitím biodegradabilního, vysoce aktivního a selektivního biokatalyzátoru v prostředí rozpouštědel šetrných k životnímu prostředí. Neexistuje však žádná univerzální metoda vhodná pro všechny chemické reakce a enzymy. Velmi slibnou strategií se jeví kombinace imobilizačních technik a proteinového inženýrství (19,20).

Průmyslová aplikace enzymů je často omežována nedostatkem dlouhodobé operační stability a možností opětovného použití. Zde jsou zcela patrné důvody k využití imobilizovaného enzymu. Pohodlnější manipulace poskytující snadnou separaci z produktu, čímž je minimalizována či úplně eliminována proteinová kontaminace produktu. Další výhodou je účinná reaktivace drahých enzymů a často zlepšená stabilita během skladování i vlastní operace. Nedochozí k denaturaci vlivem vysokých teplot, organických rozpouštědel či autolýzy. Stabilizace zabraňuje intermolekulárním interakcím, vytváří příznivé mikroprostředí v okolí enzymu a chrání před disociací podjednotek enzymu. To vše umožňuje vyšší produktivitu reakce. Imobilizace nabízí také lepší přístupnost enzymu k molekulám substrátu. Díky rekombinantním DNA technologiím je v principu možné produkovat většinu enzymů za komerčně dostupné ceny (19,21).

Je ovšem třeba zdůraznit, že imobilizace může indukovat konformační změny, které mohou způsobit částečnou nebo úplnou ztrátu aktivity. Imobilizovaný enzym, tak může být méně stabilní než samotný enzym, není-li imobilizační protokol sestaven správně. Při volbě vhodného postupu je také nutné zohlednit náročnost a nákladnost celého procesu (7,21).

3.2 Typy imobilizace

V podstatě můžeme rozlišovat tři základní metody imobilizace, kterými jsou vazba na nosič pomocí fyzikální adsorpce, iontové nebo kovalentní vazby, zachycení enzymu a zesílení tzv. crosslink.

3.2.1 Zachycení – zapouzdření enzymu

Zachycení je definováno jako zařazení enzymu do polymerní sítě – gelové organické či anorganické mřížky, membrány či mikrokapslí. Syntéza této polymerní sítě musí probíhat již v přítomnosti enzymu (19,21). Vzhledem k slabé síle této vazby, která může způsobit unikání enzymu, je často požadováno přidané kovalentní připojení. Rozdíl mezi zachycením a vazbou na nosič, která bude vysvětlena níže, není zcela zřejmý. V této diplomové práci, obdobně jako v předlohových článcích, bude definována vazba na nosič jako vazba na předem aktivovaný nosič nehledě na to, zda je enzym vázán vně nebo uvnitř svého nosiče. Technika zachycení je obvykle užívána při reakci s celými buňkami, spíše než s volnými enzymy (22). Bývá aplikována především u nosičů z řad přírodních polymerů, jakými jsou kolagen, chitosan a celulóza vzhledem k jejich biodegradabilitě, biokompatibilitě a neantigenní povaze. Jedná se o poměrně jednoduchou operaci, která nezpůsobuje modifikace struktury enzymu a zabraňuje některým nechtěným interakcím tím, že brání přímému kontaktu enzymu s prostředím. Například interakcím s plynovými bublinkami či s hydrofobními rozpouštědly (19,21).

Mezi nevýhody patří někdy veliká velikost pórů, která může způsobit unikání enzymu do okolí nebo naopak malá velikost pórů, která zabraňuje difuzi velkých molekul substrátu do gelu. Podmínky během imobilizace pak mohou vést k destrukci enzymu či je koncentrace enzymu příliš nízká pro dosažení optimální aktivity (21).

3.2.2 Vazba na nosič

Vazba na nosič může být fyzikální, iontová nebo kovalentní. V závislosti na imobilizačním protokolu je enzym imobilizován uvnitř porózního nosiče či vně na pevném povrchu. Je tedy zabráněno některým inaktivacím jmenovaným výše a není možná ani autolýza a proteolýza enzymu. Další výhodou této imobilizační metody je stabilita, která dovoluje využití biokatalyzátorů v různých reaktorech. Nicméně však dochází k výraznému poklesu aktivity enzymu, jelikož nosič zaujímá na 90-99 % celkového objemu katalyzátoru, což ve výsledku znamená nižší produktivitu reakce (19,21).

Fyzikální adsorpce je nejjednodušší, nejrychlejší a nejlevnější metodou k přípravě imobilizovaného enzymu. Biokatalyzátor je v tomto případě tvořen enzymem adsorbovaným na pevném nosiči především pomocí slabých vazebných interakcí, jakými jsou van der Waalovy vazby, elektrostatické a hydrofobní vazby. Metoda navíc dovoluje opětovné použití cenově nákladných nosičů i po inaktivaci imobilizovaného enzymu. Fyzikální síly však nejsou příliš silné a některé z imobilizovaných proteinů mohou být desorbovány z povrchu nosiče během reakce. Mezi nosiče používané k adsorpci patří obnovitelné membrány z celulosy, pektin a chitosanové částice (23).

Kovalentní připojení je jednou z nejvíce používaných technik imobilizace. Vazba mezi enzymem a nosičem je dostatečně stabilní, což zabraňuje uvolňování enzymu do okolního prostředí. Chitosan, agarosa, želatina a pektin mohou být použity ve funkci nosiče. Nejvíce zajímavou a slibnou strategií je pak vícebodová kovalentní imobilizace na preaktivované nosiče (21). Úspěšně byla použita u akrylových a methakrylových pryskyřic (22,27). Například penicilinová amidasa imobilizovaná na Eupergit C zachovává 60 % její počáteční aktivity (22).

K dosažení stabilizace je třeba řádná volba nosiče, reaktivní skupiny i imobilizačních podmínek. Optimální výsledky poskytují aminoskupiny aktivované glutaraldehydem, epoxid a glyoxyl nosiče. Je třeba zdůraznit, že užití průmyslově vyráběných nosičů umožňuje výběr žádoucích vlastností daného nosiče. K významným charakteristikám patří výskyt, distribuce a hustota funkčních skupin, inertnost, vysoká porozita a velký povrch, fyzikální síla, stabilita, rezistence k mikrobiální kontaminaci a schopnost zvyšovat enzymovou stabilitu, specifitu a aktivitu a minimalizovat inhibici vyvolanou produktem reakce. Nosiče mohou být klasifikovány jako anorganické a organické, které jsou dále rozděleny na přírodní (agarosa, chitosan, dextran, karagen, celuloza, pektin) a syntetické (polyamidy, polystyren, polyakrylamid) (21).

3.2.3 Zesítnění tzv. crosslink

Další strategií, která si v posledních letech získala pozornost je imobilizace skrze tzv. crosslink neboli zesítnění enzymových molekul. Dochází tomu tak například extenzivním zesítněním aminoskupin na povrchu enzymu s bifunkčním činidlem. Biokatalyzátor je tak velmi stabilní s vysokou enzymovou aktivitou. Některé metody studují přípravu imobilizovaných enzymů bez nosiče tzv. zesítněných krystalizovaných enzymů – crosslinked enzyme crystals (CLECs) a zesítněných agregátů enzymů – crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). Nevýhodou CLECs je potřeba krystalizace enzymu, která vyžaduje enzym o vysoké čistotě. Na druhou stranu CLEAs mohou být jednoduše připraveny ve dvou krocích, z nichž prvním je precipitace proteinových molekul a následně stabilizace agregátů pomocí síťování obvykle s glutaraldehydem. Glutaraldehyd je navíc levnou a snadno komerčně dostupnou surovinou (21).

Crosslinked enzyme crystals (CLECs)

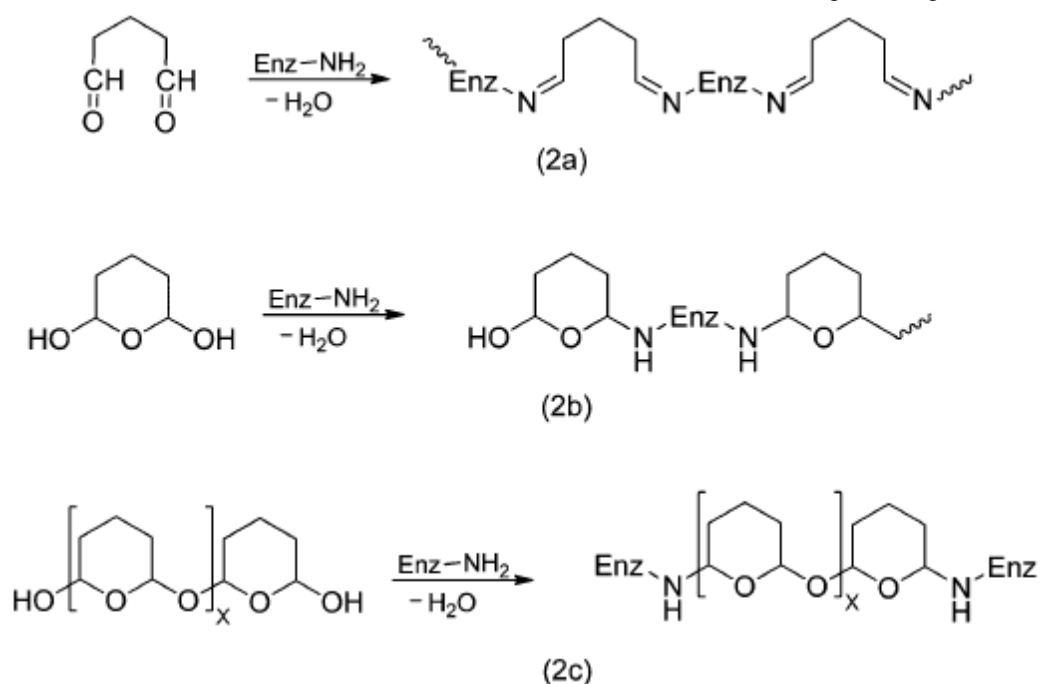
Enzym krystalizuje z vodného roztoku při optimálním pH a následným přidáním činidla – obvykle glutaraldehydu dojde k zesítnění krystalů. CLECs mají velikost od 1 po 100 μm v závislosti na použitém enzymu. Pro svou odolnost vůči denaturaci vyvolané teplem, organickým rozpouštědlem či proteolýzou se zdají vhodnými pro průmyslové využití, avšak již zmíněný požadavek vysoké čistoty enzymu znamená nepřiměřeně vysoké náklady (22).

Crosslinked enzyme aggregates (CLEAs)

Jednodušší a levnější variantou krystalizace je právě precipitace. Penicilin G amidasa, která je nezbytná pro syntézu semisyntetických penicilinových a cefalosporinových antibiotik, vykazuje nízkou teplotní stabilitu a toleranci vůči organickým rozpouštědlům. Úspěšně konstruované CLEAs penicilin G amidasy potvrzují účinnost této katalýzy. V případě CLEAs není zapotřebí vysoká čistota enzymu a velikost jejich částic se pohybuje v rozmezí 5 až 50 μm (22).

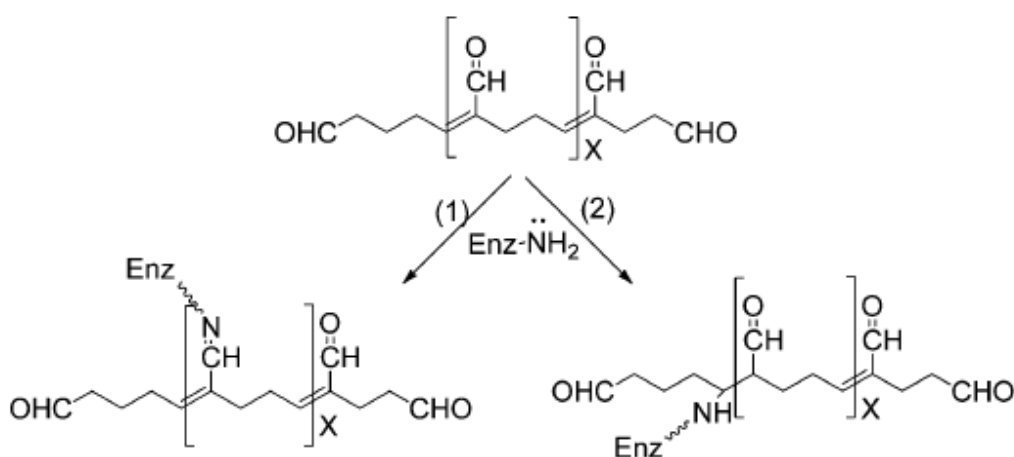
Využití glutaraldehydu a bovinního sérového albuminu (BSA)

Glutaraldehyd je jedním z nejrozšířenějších univerzálních reaktantů v oblasti enzymové technologie. Využíván je pro přípravu CLEAs, pro inter – a intramolekulární zesítnění enzymů, které zabraňuje jejich unikání z povrchu nosiče a zvyšuje jejich stabilitu a dále k preaktivaci nosičů nesoucích aminoskupiny. Jedná se o bifunkční činidlo se schopností polymerizace (23-25). Převažují reakce s primárními aminoskupinami proteinů, avšak může reagovat i s thioley, fenoly či imidazoly. Jelikož se glutaraldehyd vyskytuje jak v monomerním tak polymerním uspořádání, probíhají reakce různými mechanismy. V kyselém a neutrálním prostředí dochází ke vzniku Schiffovy báze nukleofilním atakem na ϵ -aminoskupinu Lys. Báze je ovšem nestabilní, proto je nutná redukce NaBH_4 nebo NaBCNH_3 na sekundární amin či inkubace v HCl 6 M při 110 $^\circ\text{C}$ po dobu 24 hodin. Monomer i polymer glutaraldehydu může také vytvářet poloacetal, který nukleofilní substitucí hydroxyskupin reaguje s aminoskupinami Lys (24).



Obrázek 11 Reakce glutaraldehydu s enzymem v neutrálním a kyselém prostředí (24)

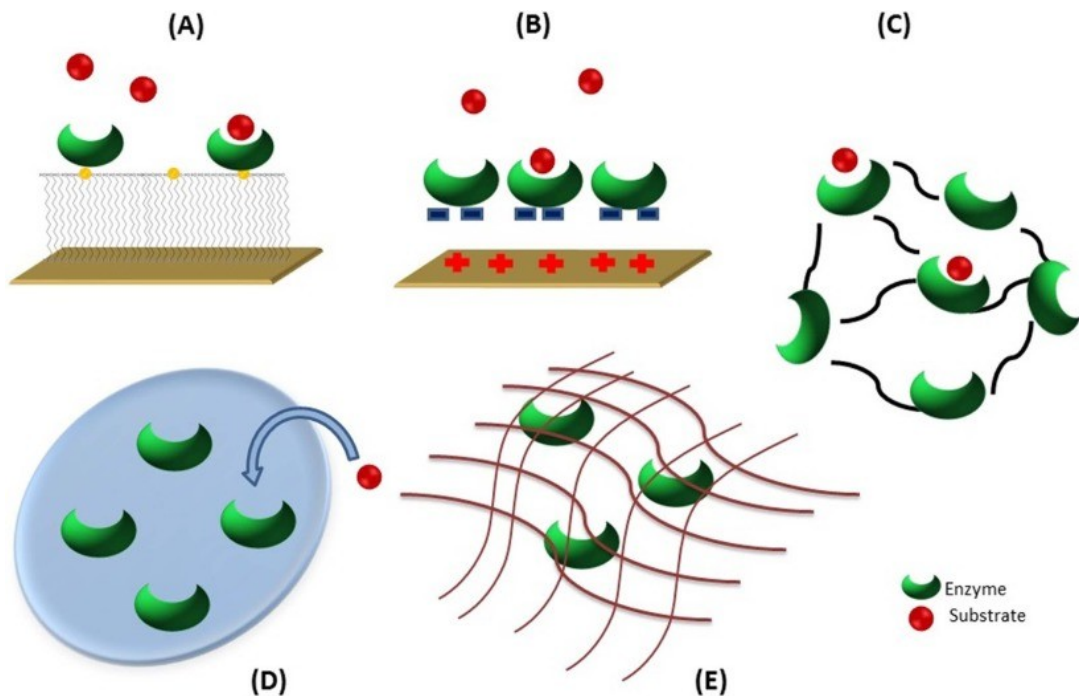
V bazickém prostředí dochází k intramolekulární aldolové kondenzaci glutaraldehydu tvořící jeho polymerní formu. Ta následně reaguje s aminoskupinami dvěma způsoby. Tvorbou Schiffovy báze, která je díky rezonanci struktury stabilnější či Michaelovou adicí. Následkem vysoké kapacity zesítění reaguje glutaraldehyd i s dalšími molekulami glutaraldehydu a s již modifikovanými aminoskupinami, proto na jednu aminoskupinu vystačí jedna až dvě molekuly glutaraldehydu (24).



Obrázek 12 Tvorba Schiffovy báze (1) a Michaelova adice (2) v bazickém prostředí (24)

V případě nedostatku Lys na povrchu enzymu, lze precipitovat enzym s polymerem obsahující větší množství volných aminoskupin jako například poly-L-lysin, polyethylenimin nebo s dalším proteinem, který nese zbytky Lys jako například hovězí sérový albumin (BSA) (22).

Výběr biokatalyzátoru pro průmyslové použití by měl být skutečně konkurence schopný. Imobilizovaný enzym by měl být vyráběn za rozumné náklady, proto se z ekonomického hlediska jeví přírodní biopolymery jako vhodná alternativa syntetických materiálů. Pro každou aplikaci imobilizovaného enzymu je nezbytný výběr nejjednoduššího a nejlevnějšího imobilizačního protokolu, jehož výsledkem je vysoká aktivita a operační stabilita enzymu (21).



Obrázek 13 Metody imobilizace: (A) kovalentní připojení, (B) adsorpce enzymu, (C) zesítění tzv. crosslink, (D) enkapsulace, (E) zachycení (28)

4. Terminologie užívaná pro imobilizaci enzymů

Vyskytují se tři nejčastěji používaná kritéria pro hodnocení úspěšnosti imobilizačního postupu.

4.1 Výtěžek imobilizace

Výtěžek imobilizace popisuje procento celkové aktivity enzymu z volného roztoku enzymu, který je imobilizován. Aktivita po imobilizaci je měřena jako zbytková aktivita enzymu, která zůstává v roztoku po imobilizaci, jež je následně odečtena od celkové počáteční aktivity. V některých případech je vhodné využít blank ke kompenzaci deaktivace volného enzymu vlivem imobilizačních podmínek (22).

$$\text{Výtěžek (\%)} = 100 \times (\text{aktivita enzymu po imobilizaci/počáteční aktivita}) \quad (22)$$

4.2 Účinnost imobilizace

Tato charakteristika popisuje procento vázané enzymové aktivity, která je pozorována v imobilizátu. Teoreticky může být tedy účinnost imobilizace 0%, přestože je její výtěžek 100%, jestliže je všechn enzym v roztoku imobilizován, ale během reakce dojde k jeho deaktivaci či se stane nepřístupným pro katalýzu (22).

$$\text{Účinnost (\%)} = (\text{pozorovaná aktivita/imobilizovaná aktivita}) \quad (22)$$

4.3 Obnova aktivity enzymu

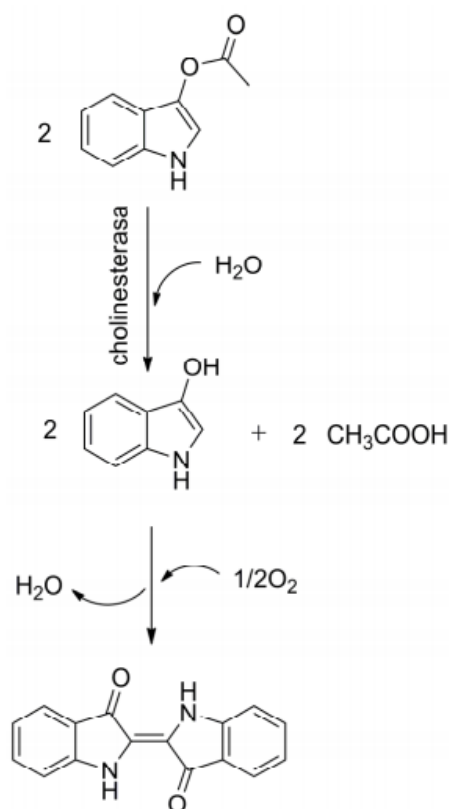
Zotavení enzymu je vyjádřeno jako výtěžek imobilizace vynásobený její účinností. Tím pádem dává toto kritérium jasnou představu o úspěšnosti celého imobilizačního procesu. Za aktivitu enzymu se vždy považuje jeho celková aktivita (v jednotkách například $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) nikoliv specifická aktivita (například $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ či $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). K určení všech charakteristik enzymu by pak měly být během reakce dodrženy vždy stejné reakční podmínky (22).

$$\text{Obnova aktivity (\%)} = (\text{pozorovaná aktivita/počáteční aktivita enzymu}) \quad (22)$$

5. Imobilizovaný enzym ve funkci biosenzoru

Význam biosenzoru s navázaným imobilizovaným enzymem spočívá v rychlé, levné a průkazné analýze celé řady látek. Jsou doplňkem klasických analytických metod, jakými je kapalinová chromatografie (23). Tato práce pojednává o imobilizaci AChE, jejíž biosenzory již byly úspěšně konstruovány.

Například komerčně dostupný biosenzor Agri – Screen Ticket (Neogen Corporation, Lansing, Michigan, USA) založený na indoxylacetátu a imobilizované AChE. AChE hydrolyticky rozkládá molekulu indoxylacetátu a následně dochází k oxidaci na modře zbarvené indigo (7).



Obrázek 14 Hydrolyza indoxylacetátu a oxidace na indigo (7)

5.1 Biosenzory acetylcholinesterasy

Cholinesterasy jsou velmi citlivé na působení široké skupiny neurotoxických látek jako jsou nervově paralytické látky využívané ve vojenství, pesticidy a léčiva různé chemické povahy. Inhibice AChE těmito látkami je využívána k diagnostice otrav a enzym tak funguje jako průkazný marker. Inhibitory se váží do některé z důležitých částí enzymu a zablokují tím jeho funkci. Ireverzibilní do estratické části aktivního centra esterovou vazbou na hydroxylovou skupinu Ser – organofosforové inhibitory či pseudoireverzibilní karbamátové inhibitory u nichž dochází ke spontánní hydrolyze karbamoylu a k obnově funkčnosti enzymu. V případě biosenzorů založených na cholinesterasach není zapotřebí dlouhodobá stabilita a možnost opakovaného měření analytu, jelikož jsou přednostně využívány ve funkci jednorázových průkazníků, které stanovují některé inhibitory, zejména ty organofosforové, které enzym inhibují trvale. Při volbě vhodného imobilizačního postupu je třeba zohlednit náročnost a ekonomickou nákladnost celého procesu. Nejdražší komponentou bývá obvykle samotný enzym, proto je nutné, aby byla imobilizace co nejšetrnější. Nejjednodušší metody bývají zpravidla i těmi nejvhodnějšími a to i z hlediska limitu detekce analyzovaných látek (7).

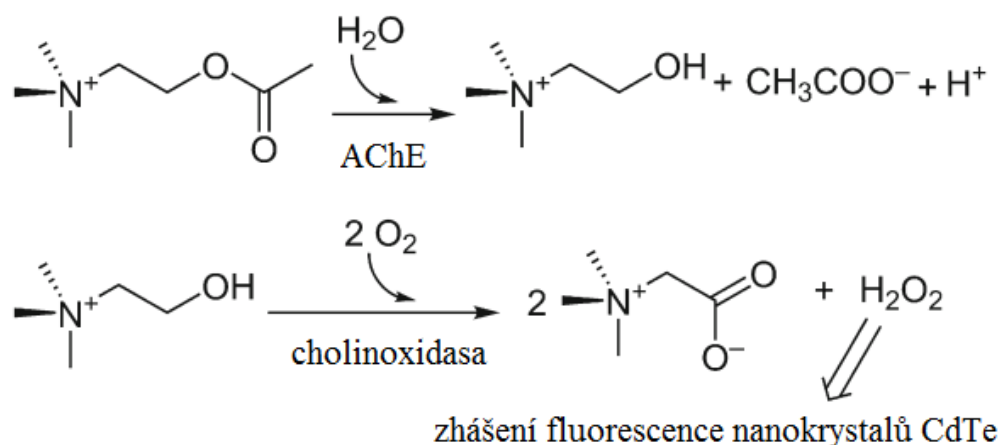
Aplikace biosenzorů je zejména v oblasti testování toxických forem pesticidů. Jejich využití pro analýzu nervově paralytických látek, léčiv a pro průkaz přítomnosti pesticidů v životním prostředí, nese řadu úskalí. Nadále probíhá další vylepšování a výzkum v oblasti přípravy a využití těchto biosenzorů (7).

5.2 Optické biosenzory

Předností optických biosenzorů oproti například elektrochemickým je možnost hodnotit průběh reakce i pouhým okem. K využívaným metodám měření patří spektrofotometrie, kolorimetrie a fluorimetrie. Dobře známou spektrofotometrickou metodou měření aktivity AChE je Ellmanova metoda. Jak již bylo zmíněno výše, tato metoda pracuje s acetylthiocholinem pro reakci s AChE či s butyrylthiocholinem pro BChE, které reakcí s DTNB v přítomnosti enzymu poskytují žluté zbarvení. Jelikož DTNB není stabilní sloučeninou, metoda je značně citlivá k interferencím s nízko i vysoko molekulárními thioley a oximy. Falešně negativní výsledek tak může být fatální, jestliže je přítomna některá z nervově paralytických látek – sarin, soman, tabun (7,26).

Aktivita obou cholinesteras může být obecně detekována všemi zmíněnými metodami s užitím indoxylacetátu a jeho derivátů. Jedná se o dvou krokovou reakci, při níž spontánně vzniká modré zbarvení – indigo. Několikanásobně vyšší stabilita indoxylacetátu a dalších sloučenin tvořících indigo je hlavní výhodou jejich použití oproti Ellmanově metodě (7,26).

Nanokrystaly vyrobené z polovodičových materiálů tzv. quantum dots jsou v posledních letech využívány jako perspektivní převodníky vhodné ke konstrukci biosenzorů AChE založené na fluorescenci. Pro své unikátní vlastnosti jsou vhodné jak v moderních technologiích, tak v medicíně i analytické chemii. Byly vyrobeny biosenzory konstruované s nanokrystaly z kadmia a telluru – CdTe quantum dots a s navázanou AChE a cholinoxidasou. Biosenzor funguje na jednoduchém principu. AChE hydrolyzuje ACh na kyselinu octovou a cholin, který je následně transformován na betain a peroxid vodíku pomocí cholinoxidasy. Peroxid vodíku zhasí fluorescenci vyvolanou nanokrystaly CdTe (26).



Obrázek 15 Princip fluorimetrického biosenzoru s navázanou AChE, cholinoxidasou a nanokrystaly CdTe (26)

5.3 Elektrochemické biosenzory

Mezi elektrochemické metody se řadí potenciometrie a voltametrie (amperometrie). Využívanými jsou v potenciometrii pH – senzitivní elektrody, které jsou schopné měřit aciditu – bazicitu roztoku. Obdobně je tomu u imobilizované AChE na potenciometrický biosenzor, kdy během rozkladu ACh dochází ke vzniku kyseliny octové, která následně způsobuje acidifikaci celého roztoku. Reakce jsou prováděny s tranzistory řízenými elektrickým polem tzv. field effect transistor (FET), které jsou vysoce citlivé k vyvolaným změnám pH. Cholinoxidas není vhodná pouze ke konstrukci optických biosenzorů, ale může být využita i během voltametrie. Peroxid vodíku vznikající při oxidaci cholinu, může být snadno rozložen a následně měřen (26).

Biosenzory s navázanými cholinesterasami fungují obvykle pouze jako modelové struktury sloužící k rozvoji nových biosenzorů, nanotechnologií a imobilizačních technik.

Experimentální část

6. Materiál a použité metody

Za modelovou strukturu proteinové makromolekuly byla pro své vlastnosti zvolena molekula enzymu AChE a funkci polymerního nosiče pak zastávaly pelety z mikrokrystalické celulosy. K měření aktivity enzymu byla vybrána tradiční a jednoduchá Ellmanova metoda.

6.1 Chemikálie a přístroje

Všechny chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma – Aldrich. Fosfátový pufr (PBS) byl připraven na pracovišti Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové a byl kalibrován na patřičné pH pomocí potenciometrické titrace. Pro měření absorbance byl použit spektrofotometr Helios Zeta UV – VIS (Fisher Scientific, Loughborough, Spojené Království).

6.2 Metody měření

6.2.1 Mikroskopie

Pomocí analytických vah a mikroskopie byla testována stabilita celet ve vodném prostředí po dobu 24 hodin. Na vahách bylo naváženo pět vzorků celet 100 a pět vzorků celet 200 o přibližně přesné hmotnosti 2 g. Tyto navážky byly následně suspendovány v 10 ml destilované vody a inkubovány po dobu 0,5, 1, 2, 6 a 24 hodin. Po uplynutí požadované doby inkubace celet, byla přebytečná destilovaná voda slita a vzorek byl sušen při 60 °C po dobu 30 minut a následně mikroskopován při zvětšení okuláru i objektivu 10.

6.2.2 Ověření aktivity AChE při různém pH

Prováděno bylo měření aktivity enzymu při fyziologickém pH 7,4 a rovněž při pH kyselejších 6,6 a zásaditějším 8,0 v prostředí fosfátového pufru (PBS). Do kyvety bylo napipetováno 400 μl DTNB, 25 μl AChE, 475 μl PBS a 100 μl acetylthiocholinu (ATChCl) o různé koncentraci. Po uplynutí doby inkubace bylo provedeno měření absorbance při 412 nm. Spektrofotometr byl kalibrován na blank obsahující místo AChE 25 μl PBS. Z naměřených hodnot absorbancí byly, po dosazení do následujícího vzorce, vypočteny celkové aktivity enzymu za různých podmínek. Aktivita je v celé této práci uváděna v katalech.

Výpočet aktivity enzymu:

$$a = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot 60000}$$

$$\varepsilon = 14150 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

6.2.3 Měření aktivity AChE po inhibici takrinem

Pro zjištění vlivu inhibitoru takrinu na aktivitu AChE byla zvolena koncentrace vodného roztoku substrátu ATChCl 1 mM. Postup práce byl téměř totožný s předchozím měřením. Do kyvety bylo odpipetováno 400 μl DTNB, 25 μl AChE, 25 μl takrinu o koncentraci 0,025 μM až 50 μM , 450 μl PBS a 100 μl ATChCl. Byl připraven i kontrolní vzorek bez použití inhibitoru. Absorbance byla měřena při 412 nm.

6.2.4 Měření aktivity AChE v prostředí etanolu

Aktivita enzymu byla též hodnocena v prostředí etanolu. Část PBS byla nahrazena koncentrovaným roztokem etanolu o objemu 400, 200, 100 a 50 μl . Připraven byl kontrolní vzorek obsahující pouze 475 μl PBS.

6.2.5 Test imobilizace BSA

BSA je protein nesoucí na svém povrchu zbytky Lys, které mohou vytvářet fyzikální vazby. BSA se běžně používá jako stabilizační agens pro fyzikální sorpci proteinů. Byly použity roztoky o koncentraci 0,1, 0,5 a 1 %. Po navážení přibližně 2 g celet 100 a 200 pro každou koncentraci BSA byly vzorky suspendovány ve 4 ml daného roztoku BSA. Následně byly 24 hodin inkubovány, propláchnuty destilovanou vodou a sušeny při 37 °C. Na analytických vahách byl zjištěn přírůstek nebo úbytek hmotnosti vzorků.

6.2.6 Měření aktivity AChE po imobilizaci metodou prosté sorpce

Byly naváženy 3 vzorky celet 100 a 200 o přibližné hmotnosti 15 mg s imobilizovanou AChE odpovídající 25 µl AChE. Imobilizace enzymu byla provedena převrstvením celet AChE a následnou 24 hodinovou inkubací, po jejímž ukončení byly celety promyty destilovanou vodou k odstranění nenavázaného enzymu a vysušeny dosucha při teplotě 37 °C. Absorbance vzorků byla měřena při koncentraci ATChCl 1 mM a při vlnové délce 412 nm. Opakovaně byla absorbance proměřena po 10 minutách, kdy došlo k ustálení zbarvení roztoku v kyvetě. Následně byla vypočtena hodnota ΔA a přepočtena aktivita dle následujícího vzorce.

Přepočet aktivity imobilizovaného enzymu:

$$a = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot 60000 \cdot 10}$$

Vzorky byly uloženy do lednice a měření bylo znovu opakováno po 24 hodinách a poté po 5 dnech.

6.2.7 Měření aktivity imobilizované AChE spolu s glutaraldehydem (GA)

Nejprve bylo naváženo od obou velikostí celet 5 vzorků s přibližnou hmotností 1,2 g a ředěním destilovanou vodou byly připraveny 12,5, 5, 2 a 0,5 % koncentrace GA ze zásobního 25 % roztoku. Celety byly inkubovány s roztoky GA, čímž se funkcionalizoval jejich povrch. Následně byla navázána AChE mechanismem zesítění pomocí bifunkčního GA. Absorbance byla opět měřena Ellmanovou metodou při 412 nm. Aktivita AChE byla vypočtena podle vzorce uvedeného výše u imobilizace metodou prosté sorpce.

6.2.8 Měření aktivity AChE imobilizované na oxidované celety pomocí TEMPO

Na závěr experimentu proběhla oxidace enzymu pod vlivem 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-1-oxy tzv. TEMPO. 1,2 g celet bylo suspendováno ve vodném roztoku obsahujícím TEMPO (0,16 g/l) a NaBr (1 g/l). Oxidace byla iniciována přidávkem 0,27 g NaClO v množství odpovídajícím 3 mmol/g celulosy (obr. 10). pH roztoku bylo udržováno na hodnotě 9 pomocí borátového pufru. Po dvaceti minutách byly oxidované celety promyty destilovanou vodou.

Oxidovaná celuloza byla poté aktivována pomocí 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC). Reakce probíhala ve fosfátovém pufru za přítomnosti katalyzátoru N-hydroxysuccinimidu (NHS) podporující stabilitu vzniklého intermediátu O-acylisourey, která reaguje s aminy za vzniku amidu kovalentně spojujícího celulosový nosič a proteinovou makromolekulu.

7. Výsledky

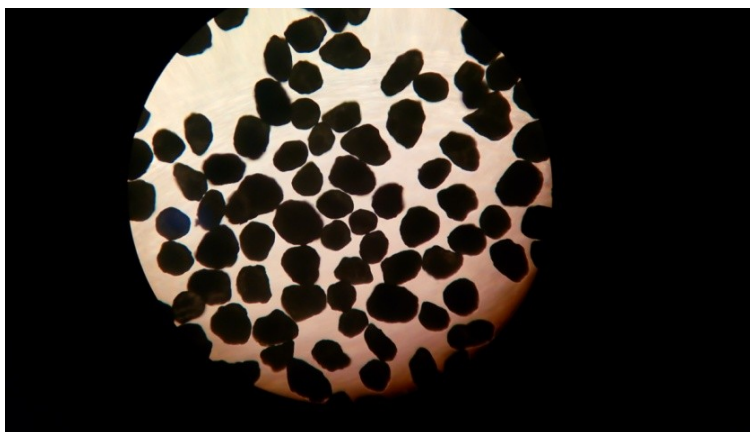
Stabilita celet

Tabulka 1 Stabilita celet 100

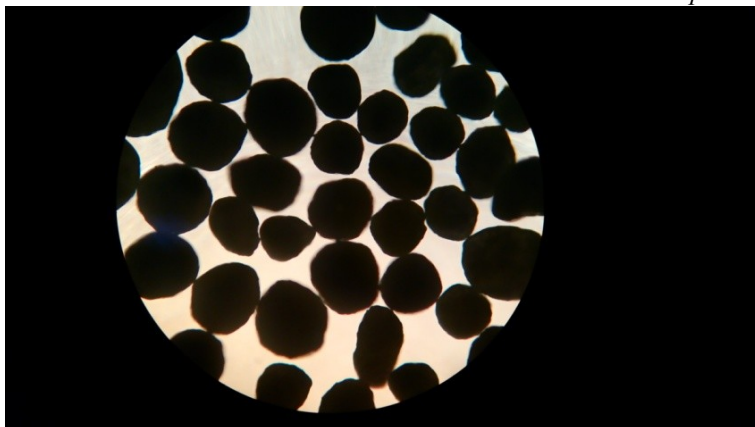
doba inkubace (hod)	navážka vzorku (g)	úbytek hmotnosti (g)
0,5	2,0086	0,0914
1	2,0087	0,0809
2	2,0075	0,0789
6	2,0091	0,0758
24	2,0084	0,0305

Tabulka 2 Stabilita celet 200

doba inkubace (hod)	navážka vzorku (g)	úbytek hmotnosti (g)
0,5	2,0096	0,0831
1	2,0023	0,0842
2	2,0012	0,0813
6	2,0077	0,0795
24	2,0049	0,0305



Obrázek 16 Celety 100 při zvětšení objektivu a okuláru 10

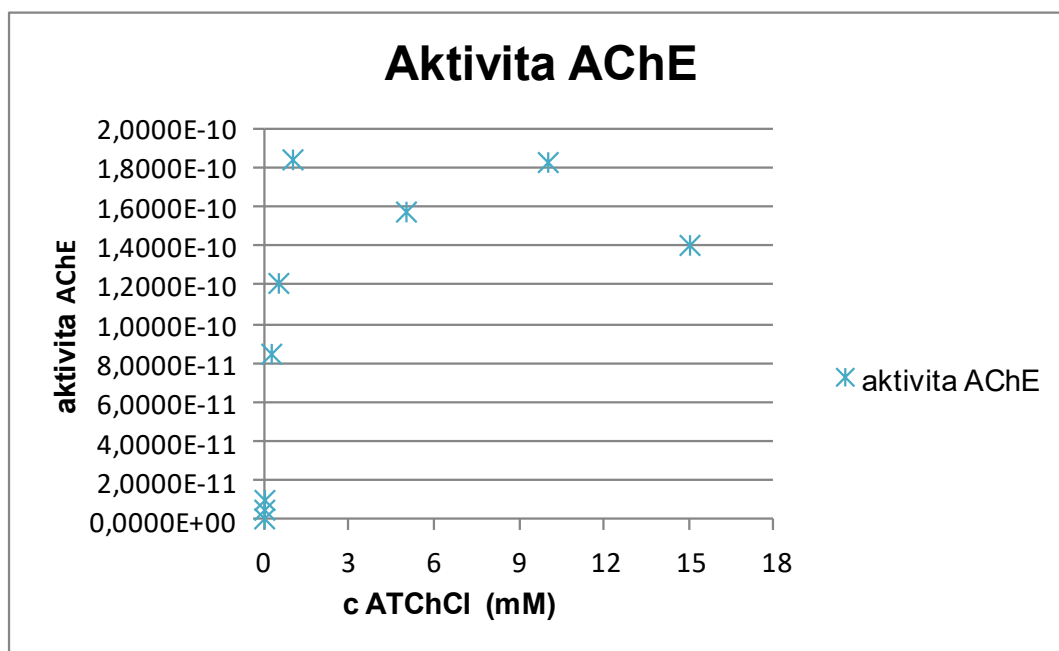


Obrázek 17 Celety 200 při zvětšení objektivu a okuláru 10

Aktivita AChE při pH 7,4

Tabulka 3 Měřené absorbance roztoků a výpočet aktivity AChE při pH 7,4

c ATChCl(mM)	A	A po 1min	ΔA	průměr ΔA	aktivita AChE
15	0,546	0,705	0,159	0,120	1,4075E-10
	0,618	0,734	0,116		
	0,578	0,688	0,110		
	0,560	0,653	0,093		
10	0,624	0,769	0,145	0,156	1,8316E-10
	0,592	0,724	0,132		
	0,783	0,959	0,176		
	0,785	0,954	0,169		
5	0,999	1,144	0,145	0,134	1,5783E-10
	0,972	1,105	0,133		
	0,974	1,102	0,128		
	0,948	1,078	0,130		
1	0,887	1,043	0,156	0,157	1,8453E-10
	0,991	1,181	0,190		
	0,768	0,892	0,124		
0,5	0,995	1,130	0,135	0,103	1,2132E-10
	0,713	0,798	0,085		
	0,736	0,825	0,089		
0,25	0,617	0,691	0,074	0,072	8,5100E-11
	0,538	0,602	0,064		
	0,612	0,679	0,067		
	0,609	0,693	0,084		
0,01	0,073	0,083	0,010	0,009	1,0306E-11
	0,085	0,094	0,009		
	0,082	0,092	0,010		
	0,084	0,090	0,006		
0,005	0,036	0,040	0,004	0,005	5,3004E-12
	0,043	0,049	0,006		
	0,042	0,046	0,004		
	0,040	0,044	0,004		
0,001	0,020	0,021	0,001	0,001	8,8339E-13
	0,016	0,017	0,001		
	0,016	0,016	0,000		
	0,022	0,023	0,001		

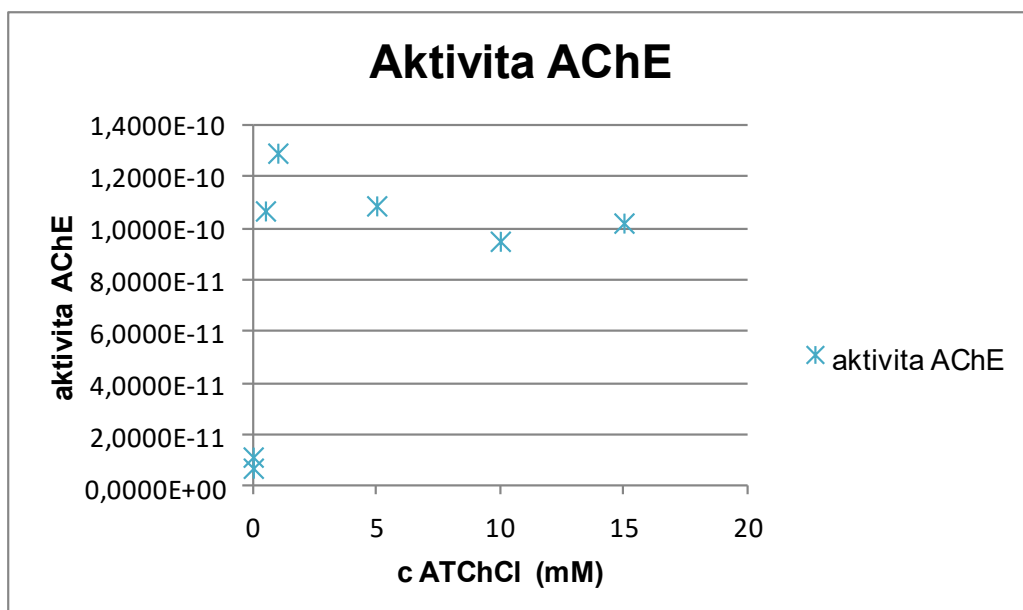


Graf 1 Aktivita AChE při pH 7,4

Aktivita AChE při pH 6,6

Tabulka 4 Měřené absorbance roztoků a výpočet aktivity AChE při pH 6,6

c ATChCl (mM)	A	A po 1min	ΔA	průměr ΔA	aktivita AChE
15	0,335	0,415	0,080	0,087	1,0208E-10
	0,355	0,449	0,094		
	0,373	0,459	0,086		
10	0,274	0,335	0,061	0,081	9,5014E-11
	0,381	0,475	0,094		
	0,384	0,471	0,087		
5	0,407	0,514	0,107	0,092	1,0876E-10
	0,406	0,496	0,090		
	0,391	0,471	0,080		
1	0,389	0,499	0,110	0,110	1,2917E-10
	0,397	0,537	0,140		
	0,319	0,398	0,079		
0,5	0,403	0,502	0,099	0,091	1,0679E-10
	0,339	0,409	0,070		
	0,385	0,488	0,103		
0,25	0,301	0,381	0,080	0,087	1,0247E-10
	0,360	0,454	0,094		
0,01	0,085	0,092	0,007	0,006	7,0671E-12
	0,077	0,081	0,004		
	0,097	0,104	0,007		
0,005	0,037	0,045	0,008	0,010	1,1386E-11
	0,049	0,053	0,004		
	0,030	0,047	0,017		
0,001	0,008	0,009	0,001	0,001	1,1779E-12
	0,007	0,008	0,001		

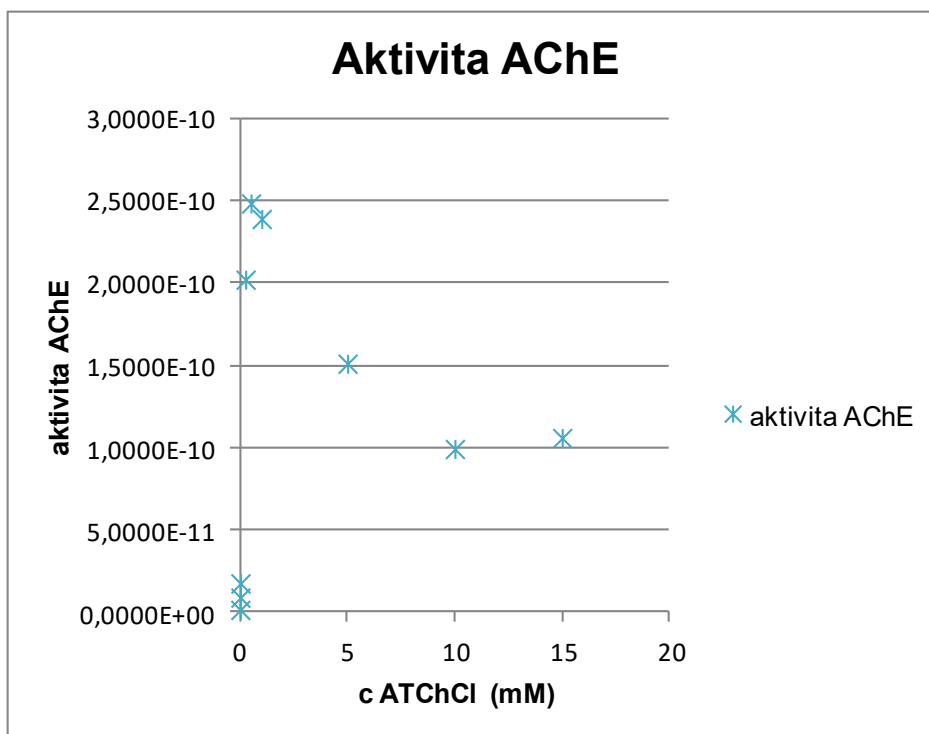


Graf 2 Aktivita AChE při pH 6,6

Aktivita AChE při pH 8,0

Tabulka 5 Měření absorbance roztoků a výpočet aktivity AChE při pH 8,0

c ATChCl (mM)	A	A po 1min	ΔA	průměr ΔA	aktivita AChE
15	0,290	0,374	0,084	0,090	1,0601E-10
	0,335	0,421	0,086		
	0,360	0,460	0,100		
10	0,274	0,342	0,068	0,084	9,9333E-11
	0,356	0,449	0,093		
	0,322	0,414	0,092		
5	0,414	0,528	0,114	0,128	1,5116E-10
	0,310	0,395	0,085		
	0,681	0,867	0,186		
1	0,695	0,885	0,190	0,203	2,3910E-10
	0,738	0,937	0,199		
	0,850	1,070	0,220		
0,5	0,792	1,009	0,217	0,211	2,4853E-10
	0,639	0,816	0,177		
	0,908	1,147	0,239		
0,25	0,654	0,825	0,171	0,172	2,0220E-10
	0,643	0,806	0,163		
	0,726	0,907	0,181		
0,01	0,088	0,103	0,015	0,015	1,7668E-11
	0,075	0,091	0,016		
	0,077	0,091	0,014		
0,005	0,055	0,063	0,008	0,008	9,0302E-12
	0,052	0,059	0,007		
	0,043	0,051	0,008		
0,001	0,023	0,024	0,001	0,001	1,5705E-12
	0,016	0,018	0,002		
	0,014	0,015	0,001		

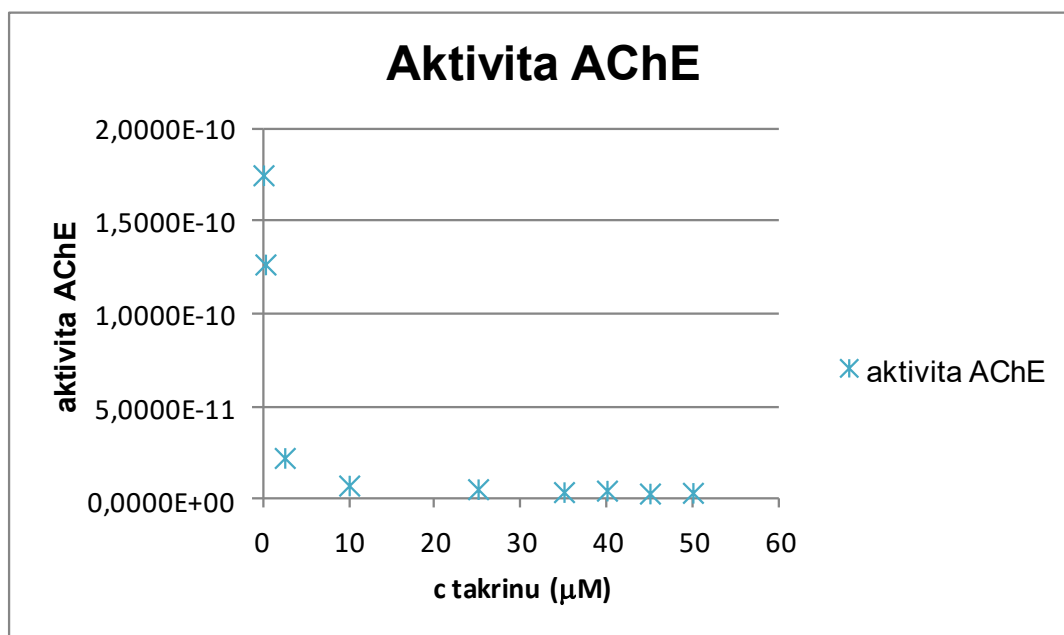


Graf 3 Aktivita AChE při pH 8,0

Aktivita AChE po inhibici takrinem

Tabulka 6 Měřené hodnoty absorbance roztoků a výpočet aktivity AChE po inhibici takrinem

c takrinu (μM)	A	A po 1 min	ΔA	průměr ΔA	aktivita AChE
0	0,524	0,665	0,141	0,165	1,9474E-10
	0,634	0,801	0,167		
	0,703	0,891	0,188		
50	0,017	0,020	0,003	0,003	3,5336E-12
	0,016	0,019	0,003		
	0,014	0,017	0,003		
45	0,019	0,022	0,003	0,003	3,1410E-12
	0,014	0,016	0,002		
	0,018	0,021	0,003		
40	0,022	0,026	0,004	0,004	4,7114E-12
	0,026	0,030	0,004		
	0,023	0,027	0,004		
35	0,022	0,026	0,004	0,003	3,9262E-12
	0,030	0,033	0,003		
	0,034	0,037	0,003		
25	0,039	0,045	0,006	0,005	5,4967E-12
	0,032	0,036	0,004		
	0,031	0,035	0,004		
10	0,048	0,055	0,007	0,006	7,4598E-12
	0,046	0,052	0,006		
	0,055	0,061	0,006		
2,5	0,106	0,127	0,021	0,019	2,2379E-11
	0,084	0,104	0,020		
	0,074	0,090	0,016		
0,25	0,314	0,391	0,077	0,108	1,2691E-10
	0,341	0,423	0,082		
	0,354	0,441	0,087		
0,025	0,706	0,891	0,185	0,149	1,7511E-10
	0,591	0,740	0,149		
	0,461	0,573	0,112		



Graf 4 Aktivita AChE po inhibici takrinem

Aktivita AChE v prostředí etanolu při pH 7,4

Tabulka 7 Měřené hodnoty absorbance roztoků a výpočet aktivity AChE v prostředí etanolu

c EtOH (% v/v)	A	A po 1 min	ΔA	průměr ΔA	aktivita AChE
0	0,445	0,552	0,107	0,111	1,3074E-10
	0,502	0,619	0,117		
	0,490	0,599	0,109		
40	0,095	0,099	0,004	0,009	1,0601E-11
	0,090	0,104	0,014		
	0,054	0,063	0,009		
20	0,150	0,180	0,030	0,031	3,6121E-11
	0,173	0,213	0,040		
	0,097	0,119	0,022		
10	0,393	0,496	0,103	0,109	1,2878E-10
	0,408	0,512	0,104		
	0,479	0,600	0,121		
5	0,444	0,558	0,114	0,116	1,3663E-10
	0,475	0,593	0,118		
	0,451	0,567	0,116		

Účinnost imobilizace BSA na celety MCC

Tabulka 8 Úbytek hmotnosti celet 100

c BSA (%)	počáteční hmotnost vzorku (g)	hmotnost vzorku po imobilizaci BSA (g)	celkový úbytek hmotnosti (g)
0,1	20,0552	20,0027	0,0525
0,5	17,4227	17,3932	0,0295
1	19,3386	19,3200	0,0186

Tabulka 9 Úbytek hmotnosti celet 200

c BSA (%)	počáteční hmotnost vzorku (g)	hmotnost vzorku po imobilizaci BSA (g)	celkový úbytek hmotnosti (g)
0,1	20,9323	20,9030	0,0293
0,5	19,9434	19,9160	0,0274
1	18,7477	18,7291	0,0186

Aktivita AChE po imobilizaci metodou prosté sorpce

Celety 100

Tabulka 10 Aktivita imobilizované AChE

vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 10 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,04	0,347	0,525	0,178	2,0966E-11
2	15,30	0,431	0,583	0,152	1,7903E-11
3	15,68	0,433	0,558	0,125	1,4723E-11

Tabulka 11 Aktivita imobilizované AChE po 24 hodinách

vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 10 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,38	0,056	0,188	0,132	1,5548E-11
2	15,12	0,052	0,175	0,123	1,4488E-11
3	15,23	0,060	0,183	0,123	1,4488E-11

Tabulka 12 Aktivita imobilizované AChE po 5 dnech

vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 10 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,00	0,056	0,110	0,054	6,3604E-12
2	15,58	0,070	0,133	0,063	7,4205E-12
3	15,28	0,074	0,141	0,067	7,8916E-12

Celety 200

Tabulka 13 Aktivita imobilizované AChE

vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 10 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,07	0,477	0,535	0,058	6,8316E-12
2	15,18	0,491	0,543	0,052	6,1249E-12
3	14,92	0,463	0,526	0,063	7,4205E-12

Tabulka 14 Aktivita imobilizované AChE po 24 hodinách

vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 10 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,58	0,017	0,175	0,158	1,8610E-11
2	15,46	0,027	0,188	0,161	1,8963E-11
3	15,48	0,056	0,201	0,145	1,7079E-11

Tabulka 15 Aktivita imobilizované AChE po 5 dnech

vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 10 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,53	0,099	0,136	0,037	4,3581E-12
2	15,09	0,079	0,120	0,041	4,8292E-12
3	15,28	0,087	0,136	0,049	5,7715E-12

Aktivita imobilizované AChE po aktivaci glutaraldehydem

Tabulka 16 Aktivita imobilizované AChE, celety 100

c GA (%)	A	A po 10 min	ΔA	průměr ΔA	aktivita AChE
25	0,028	0,057	0,029	0,033	3,8869E-12
	0,025	0,062	0,037		
12,5	0,038	0,082	0,044	0,046	5,4181E-12
	0,054	0,102	0,048		
5	0,135	0,153	0,018	0,029	3,4158E-12
	0,125	0,165	0,040		
2	0,172	0,188	0,016	0,016	1,8846E-12
	0,142	0,158	0,016		
0,5	0,158	0,174	0,016	0,016	1,8846E-12
	0,146	0,162	0,016		

Tabulka 17 Aktivita imobilizované AChE, celety 200

c GA (%)	A	A po 10 min	ΔA	průměr ΔA	aktivita AChE
25	0,025	0,055	0,030	0,029	3,3569E-12
	0,038	0,065	0,027		
12,5	0,055	0,068	0,013	0,020	2,2968E-12
	0,048	0,074	0,026		
5	0,107	0,140	0,033	0,032	3,7102E-12
	0,116	0,146	0,030		
2	0,124	0,156	0,032	0,034	3,9458E-12
	0,111	0,146	0,035		
0,5	0,123	0,154	0,031	0,031	3,6514E-12
	0,131	0,162	0,031		

Aktivita AChE po imobilizaci metodou aktivovaného karboxylu**Celety 100**

Tabulka 18 Aktivita imobilizované AChE

Vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 5 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,32	0,230	0,483	0,253	5,888E-11
2	15,08	0,186	0,406	0,220	5,181E-11
3	14,90	0,199	0,440	0,241	5,676E-11

Tabulka 19 Aktivita imobilizované AChE po 24 hodinách

Vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 5 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,68	0,313	0,533	0,220	2,591E-11
2	15,39	0,380	0,578	0,198	2,332E-11
3	14,21	0,367	0,547	0,180	2,120E-11

Tabulka 20 Aktivita imobilizované AChE po 5 dnech

Vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 5 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,77	0,350	0,519	0,169	1,990E-11
2	15,09	0,369	0,562	0,193	2,273E-11
3	14,56	0,377	0,552	0,175	2,061E-11

Celety 200

Tabulka 21 Aktivita imobilizované AChE

Vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 5 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,35	0,098	0,392	0,294	6,924E-11
2	15,26	0,084	0,349	0,265	6,242E-11
3	14,71	0,103	0,411	0,308	7,254E-11

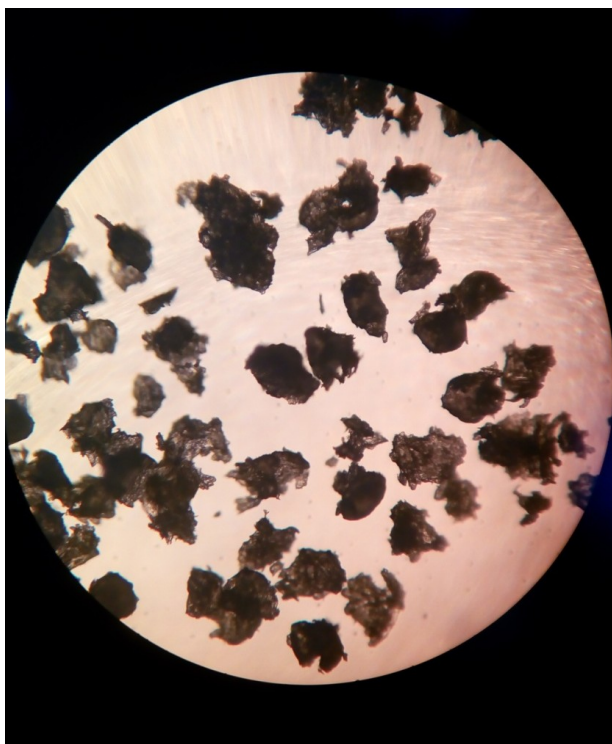
Tabulka 22 Aktivita imobilizované AChE po 24 hodinách

Vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 5 min	ΔA	aktivita AChE
1	14,88	0,250	0,495	0,245	5,771E-11
2	15,08	0,239	0,457	0,218	5,131E-11
3	15,33	0,222	0,443	0,221	5,205E-11

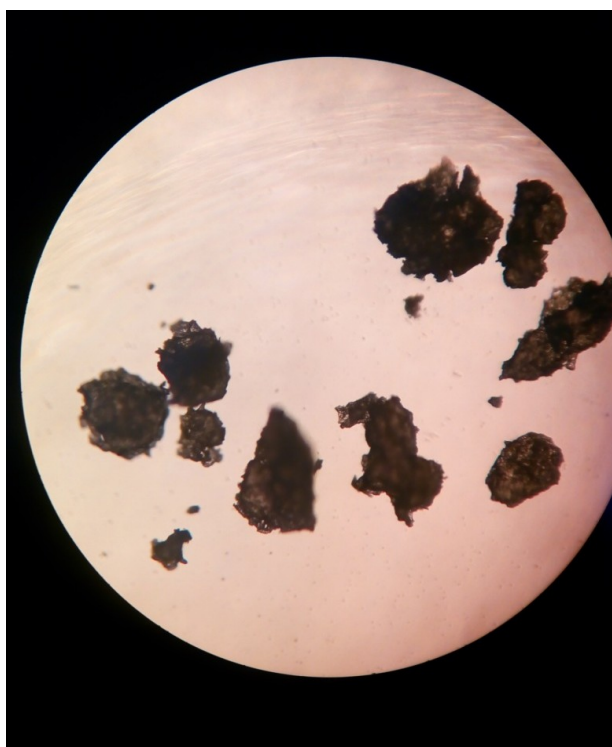
Tabulka 23 Aktivita imobilizované AChE po 5 dnech

Vzorek č.	navážka (mg)	A	A po 5 min	ΔA	aktivita AChE
1	15,05	0,261	0,497	0,236	5,588E-11
2	15,09	0,302	0,549	0,247	5,817E-11
3	14,14	0,294	0,505	0,211	4,970E-11

Oxidace MCC pomocí TEMPO



Obrázek 18 Celety 100 po oxidaci TEMPO



Obrázek 19 Celety 200 po oxidaci TEMPO

8. Diskuse

Během testování stability celet ve vodném prostředí nedošlo k žádným pozorovatelným změnám. Velikost a tvar celet 100 i 200 byla nadále dokonale sférická s úzkou distribucí velikosti částic. Úbytek hmotnosti celet 100 byl v průměru 0,0715 g a celet 200 0,0717 g. Tyto výsledky potvrzují stabilitu a nerozpustnost celet ve vodě, což z nich činí ideální materiál pro imobilizaci biomolekul. Měřitelný úbytek hmotnosti byl pravděpodobně způsoben pouze nedokonalým slitím destilované vody, kdy došlo k nechtěnému odstranění částic celet. Jako další případné vysvětlení se nabízí zbavení naadsorbované vzdušné vlhkosti sušením.

Výsledky měření enzymatické aktivity volného i imobilizovaného enzymu jsou shrnuty v tabulkách 3-23.

Nejvyšší měřitelná aktivita AChE při fyziologickém pH 7,4 byla zjištěna při koncentraci ATChCl 1 mM. Tato koncentrace byla proto vybrána i pro následující měření. Při kyseljším pH 6,6 byla aktivita enzymu nižší než při pH 7,4, výjimku tvořili koncentrace ATChCl 0,25, 0,005 a 0,001 mM, kde byla zjištěná aktivita nepatrně vyšší. Naopak při zásaditějším pH 8,0 byla aktivita enzymu od koncentrace 1 mM ATChCl vyšší. Aktivita při nefyziologickém pH byla měřena jako referenční hodnota s ohledem na skutečnost, že při imobilizačních procesech dochází k výkyvům pH.

Prostředí různých koncentrací etanolu namísto fosfátového pufru se ukázalo jako nevýhodné, jelikož aktivita AChE poklesla o jeden řád, nicméně imobilizované enzymy bývají často využity i pro katalýzu reakcí v organických rozpouštědlech. Fyziologická funkce AChE byla ověřena pomocí inhibice takrinem. Porovnání těchto parametrů pro volný a imobilizovaný enzym bylo z časových důvodů z harmonogramu experimentů vyřazeno a bude předmětem dalších experimentů.

Imobilizace AChE pomocí stabilizace BSA na povrch celet MCC byla zcela neúspěšná. Nepodařilo se zachytit a navázat ani minimální množství BSA. Nebyl pozorován přírůstek hmotnosti, ale naopak úbytek, který byl způsoben zřejmě nedokonalým proplachem a následným slitím destilované vody, kdy došlo k odstranění nenavázaného BSA i částic celet. Vysvětlení je třeba hledat ve velmi omezených interakcích hydrofilního BSA s ve vodě zcela nerozpustnou celulosou.

Imobilizace AChE pomocí metody prosté sorpce byla úspěšná. Bylo naměřeno **9,68 %** původní aktivity AChE při pH 7,4 na povrchu celet 100 a **3,68 %** celet 200. Oproti aktivitě AChE při pH 6,6 **13,83 %** pro celety 100 a **5,26 %** pro celety 200. Při pH 8,0 bylo procento zachované aktivity nižší, jelikož volná AChE vykazovala při tomto pH aktivitu vyšší. Pro celety 100 bylo měřeno **7,47 %** původní aktivity AChE a pro celety 200 **2,84 %**. Celety 100 díky své menší velikosti, která se pohybuje v rozmezí 100–200 μm a dokonalému sférickému tvaru zachytili vyšší procento aktivity AChE oproti celetám 200. Vysvětlením je větší efektivní povrch celet 100. Stabilita enzymu klesá v čase, jak se je u podobných protokolů obvyklé (19). Vyšší aktivita celet 200 po 24 hodinách od prvního měření byla zřejmě způsobena chybou měření.

Funkcionalizace povrchu celet pomocí GA a následná imobilizace AChE mechanismem zesítnění se nezdařila. Aktivita enzymu klesla o celé dva řády oproti aktivitě volného enzymu. GA jako agens síťující preferenčně pomocí aminoskupiny se ukázal jako nevhodná volba, přestože existují studie využívající GA jako síťovadlo pomocí primární alkoholické skupiny. Za selháním tohoto experimentu byla s velkou pravděpodobností inertnost celulosy.

Imobilizace AChE metodou aktivovaného karboxylu se ukázala jako nejvhodnější. Byl proveden experiment (data nejsou uvedena) s cílem imobilizovat AChE pomocí funkcionalizace karboxylem bez mezikroku s EDH a NHS nicméně reaktivita takového karboxylu se ukázala jako velmi nízká a aktivita imobilizovaného enzymu byla pod hladinou statistické významnosti. Aktivace karboxylu na *O*-acylisoureu vedla ke značnému zvýšení aktivity. Pro celety 100 byla aktivita imobilizovaného enzymu **30,32 %** původní aktivity při pH 7,4, **43,27 %** aktivity při kyseljším pH 6,6 a **22,38 %** aktivity při pH 8. Pro celety 200 byla hodnota zachované aktivity volného enzymu při pH 7,4 **36,82 %**. Pro pH 6,6 a 8 byly hodnoty **52,54 %** respektive **27,53 %**. Lepší hodnoty pro celety 200 jsou vysvětlitelné nižším stupněm desintegrace celet při procesu oxidace. Časová stabilita je u tohoto typu imobilizace velmi dobrá, **10,47 %** po pěti dnech skladování pro celety 100 a dokonce **29,47 %** pro celety 200 je velkým příslibem do budoucna.

9. Závěr

V práci byla připomenuta struktura a význam funkce enzymu acetylcholinesterasy. Byly vysvětleny jednotlivé imobilizační techniky a zdůrazněny výhody i nevýhody, které přinášejí. Imobilizované enzymy nacházejí široké uplatnění v průmyslu. Pojednáno bylo o jejich možném využití ve funkci biosenzoru.

V experimentální části práce byla provedena vlastní imobilizace acetylcholinesterasy na povrch celet z celulosy. Jako nejšetrnější metoda se ukázala imobilizace pomocí prosté sorpce. Při fyziologickém pH 7,4 bylo zaznamenáno 9,68 % původní aktivity enzymu na povrchu celet 100 a 3,68 % celet 200. Hodnoty aktivity imobilizovaného enzymu metodou aktivovaného karboxylu byly řádově vyšší. Uspokojivá byla i stabilita během skladování. Nicméně toho bylo dosaženo za cenu jistého stupně desintegrace nosiče. Hodnocení dalších parametrů enzymové aktivity a sestavení imobilizačního protokolu nebylo vlivem nízké aktivity imobilizované AChE možné. V následujících letech je zapotřebí dalších experimentů a studií imobilizačních technik pro plné využití unikátních vlastností enzymů.

10. Seznam literatury

(1) 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 [cit. 2017-01-28]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013. ISBN 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022904001231>

(2) TALBERT, Joey N. a Julie M. GODDARD. Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2012, 93, 8-19 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.01.003. ISBN 10.1016/j.colsurfb.2012.01.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776512000288>

(3) KRASŇAN, Vladimír, Radek STLOUKAL, Michal ROSENBERG a Martin REBROŠ. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, 100(6), 2535-2553 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1007/s00253-016-7283-4. ISBN 10.1007/s00253-016-7283-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7283-4>

(4) POHANKA, Miroslav. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers* [online]. 2011, 155(3), 213-230 [cit. 2017-02-12]. DOI: 10.5507/bp.2011.036. ISBN 10.5507/bp.2011.036. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2011.036.html>

(5) Cholinomimetika. DOLEŽAL, Martin a . *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Praha: Karolinum, 2009, s. 52-68. ISBN 978-80-246-1633-9.

(6) Vegetativní nervový systém. LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, s. 79-93. ISBN 80-247-0836-1.

(7) POHANKA, Miroslav. Biosenzory založené na cholinesterasach. *Chemické listy* [online]. 2013, 107(2), 120-124 [cit. 2017-01-08]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_02_121-125.pdf

- (8) File:Acetylcholinesterase TC 1EA5.png. In: *WikiVisually* [online]. c2009 [cit. 2017-04-06]. Dostupné z: http://wikivisually.com/wiki/File:Acetylcholinesterase_TC_1EA5.png
- (9) Acetylcholinesterase and Reactivation. *National Centre for Biomolecular Research* [online]. Brno, 2007 [cit. 2017-02-05]. Dostupné z: <http://www.ncbr.muni.cz/group/lcc/acetylcholinesterase.html>
- (10) LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009, s. 33-55. ISBN 978-80-246-1416-8.
- (11) Enzymy. POHANKA, Miroslav. *Přehled biochemie: učební text pro vysokoškolskou výuku*. V Hradci Králové: [Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany], 2015, s. 31-36. ISBN 978-80-7231-358-7.
- (12) POHANKA, Miroslav. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 – present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. 2012, 22(8), 871-886 [cit. 2017-03-06]. DOI: 10.1517/13543776.2012.701620. ISBN 10.1517/13543776.2012.701620. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543776.2012.701620>
- (13) ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ, Jana, Kamil KUČA, Daniel JUN a Jiří BAJGAR. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholin-esteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chemické listy* [online]. 2010, 104(1), 46-50 [cit. 2017-02-05]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_01_46-50.pdf
- (14) KIM, Jungbae, Jay W. GRATE a Ping WANG. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science* [online]. 2006, 61(3), 1017-1026 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1016/j.ces.2005.05.067. ISBN 10.1016/j.ces.2005.05.067. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009250905004999>
- (15) Cellets: Pellets from microcrystalline cellulose. *Cellets: The versatile cores* [online]. Dagama, 2012 [cit. 2017-01-09]. Dostupné z: http://cellets.com/download/cellets_english.pdf

(16) PIERRE, Guillaume, Carlo PUNTA, Cédric DELATTRE, et al. TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: An ongoing story. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, 165, 71-85 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.02.028. ISBN 10.1016/j.carbpol.2017.02.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717301480>

(17) TEMPO 98%. In: *Sigma-Aldrich: A Part of Merck* [online]. c2017 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/214000?lang=en®ion=CZ>

(18) MATEO, Cesar, Jose M. PALOMO, Gloria FERNANDEZ-LORENTE, Jose M. GUIBAN a Roberto FERNANDEZ-LAFUENTE. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2007, 40(6), 1451-1463 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018. ISBN 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022907000506>

(19) SHELDON, Roger A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* [online]. 2007, 349(8-9), 1289-1307 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1002/adsc.200700082. ISBN 10.1002/adsc.200700082. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adsc.200700082>

(20) SINGH, Raushan, Manish TIWARI, Ranjitha SINGH a Jung-Kul LEE. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, 14(1), 1232-1277 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.3390/ijms14011232. ISBN 10.3390/ijms14011232. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/1/1232/>

(21) 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 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1002/app.42125. ISBN 10.1002/app.42125. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.42125>

(22) SHELDON, Roger A. a Sander VAN PELT. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews* [online]. 2013, 42(15), 6223-6235 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1039/c3cs60075k. ISBN 10.1039/C3CS60075K. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3CS60075K>

(23) SASSOLAS, Audrey, Loïc J. BLUM a Béatrice D. LECA-BOUVIER. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* [online]. 2012, 30(3), 489-511 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003. ISBN 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497501100156X>

(24) BARBOSA, Oveimar, Claudia ORTIZ, Ángel BERENGUER-MURCIA, Rodrigo TORRES, Rafael C. RODRIGUES a Roberto FERNANDEZ-LAFUENTE. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances* [online]. 2014, (4), 1583-1600 [cit. 2017-03-06]. DOI: 10.1039/c3ra45991h. ISBN 10.1039/C3RA45991H. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3RA45991H>

(25) Polyacrylonitrile enzyme ultrafiltration membranes prepared by adsorption, cross-linking, and covalent binding. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1997, 20(1), 61-68 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/S0141-0229(96)00085-3. ISBN 10.1016/S0141-0229(96)00085-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022996000853>

(26) POHANKA, Miroslav. Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds. *Chemical Papers* [online]. 2015, 69(1), 4-16 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.2478/s11696-014-0542-x. ISBN 10.2478/s11696-014-0542-x. ISSN 1336-9075. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/chempap.2015.69.issue-1/s11696-014-0542-x/s11696-014-0542-x.xml>

(27) SARDAR, M., R. AGARWAL, A. KUMAR a M.N. GUPTA. Noncovalent immobilization of enzymes on an enteric polymer Eudragit S-100. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1997, 20(5), 361-367 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/S0141-0229(96)00152-4. ISBN 10.1016/S0141-0229(96)00152-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022996001524>

(28) Common methods of immobilization used in biosensing.
In: *ResearchGate* [online]. c2008-2017 [cit. 2017-04-06]. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/figure/283873093_fig3_Common-methods-of-immobilization-used-in-biosensing-A-covalent-binding-B