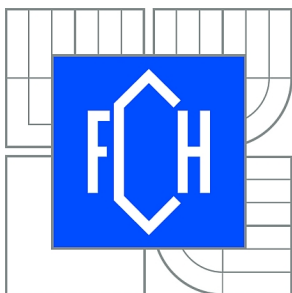




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IMOBILIZACE VYBRANÝCH GLYKANOHYDROLÁZ

IMMOBILIZATION OF SELECTED GLYCANOHYDROLASES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MAREK REICHSTÄDTER

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0912/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Marek Reichstädter	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Imobilizace vybraných glykanohydroláz

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Marek Reichstädter
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Teoretická část této diplomové práce pojednává o celulolytických enzymech, jejich mikrobiálních producentech, možnostech využití takových enzymů v průmyslu a jak lze enzymy - nejen celulolytické - imobilizovat.

Experimentální část se zabývá zkoumáním preparátů připravených imobilizací různých množství celulolytického komplexu komerčního preparátu Cellulast 1.5L na syntetické nosiče z polyethylentereftalátu - komerční Sorsilen, PET nosič a glutaraldehydem aktivovaný PET nosič. Aktivita enzymových preparátů byla sledována Somogyiho metodou spektrometricky. U imobilizovaného preparátu s nejvyšší aktivitou bylo stanoveno teplotní a pH optimum. Také byla sledována změna účinku mezi volným a imobilizovaným enzymem metodou měření poklesu viskozity substrátu v závislosti na degradaci jeho glykosidických vazeb.

ABSTRACT

The theoretical part of this thesis deals with cellulolytic enzymes, their microbial producers, the possibilities of using such enzymes in the industry and how can be enzymes - not only cellulolytic - immobilized.

Experimental part examines the preparations created by immobilizing various amounts of the commercially used cellulolytic complex Cellulast 1.5L onto various synthetic carriers made of polyethylene terephthalate - commercially used Sorsilen, PET carrier and glutaraldehyde-treated PET carrier. Enzyme activity of these preparations was determined by Somogyi - Nelson method by spectrophotometry. For the highest activity immobilized preparation was determined the temperature- and the pH-optimum. The difference in effects change between the free and immobilized enzyme by measuring viscosity decrease of the substrate depending on the degradation of glycosidic bonds was also studied.

KLÍČOVÁ SLOVA

Celulóza, celulázy, celulolytické enzymy, karboxymethylcelulóza, imobilizace enzymů, hydrolýza

KEYWORDS

Cellulose, cellulase, cellulolytic enzymes, carboxymethylcellulose, enzyme immobilization, hydrolysis

REICHSTÄDTER, M. Imobilizace vybraných glykanohydroláz. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 53 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval především doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. za nekonečnou ochotu, trpělivost, cenné rady, konzultace a čas, který mi věnovala při vypracovávání této diplomové práce.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Cíl práce	8
3	Teoretická část	9
3.1	Celulóza	9
3.2	Celulolytické enzymy	9
3.2.1	Endoceluláza	10
3.2.2	Exoceluláza	10
3.2.3	β -glukosidáza	10
3.2.4	Produkce celulolytických enzymů	11
3.2.5	Využití celuláz	11
3.2.5.1	Textilní průmysl.....	12
3.2.5.2	Prací prostředky	12
3.2.5.3	Potravinářský průmysl	12
3.2.5.4	Papírenský průmysl.....	12
3.2.5.5	Biopaliva	13
3.3	Imobilizované enzymy.....	13
3.3.1	Vlastnosti imobilizovaných enzymů.....	13
3.3.1.1	Specifická aktivita.....	14
3.3.1.2	Vliv pH na aktivitu.....	14
3.3.1.3	Teplotní optimum.....	14
3.3.1.4	Tepelná stabilita	14
3.3.2	Způsoby imobilizace enzymů	15
3.3.2.1	Enzymy zabudované	15
3.3.2.2	Imobilizace zesíťováním (cross-linking)	16
3.3.2.3	Enzymy vázané na nosič	17
4	Experimentální část.....	19
4.1	Materiál a přístroje	19
4.1.1	Přístroje a pomůcky	19
4.1.2	Použitý celulolytický enzymový preparát.....	19
4.1.3	Použité nosiče	19
4.1.4	Použitý substrát	19
4.1.5	Chemikálie	19
4.2	Příprava nosiče z odpadních PET lahví	20
4.3	Příprava roztoku 0,2M roztoku octanu sodného	20
4.4	Příprava 0,1M roztoku octanového pufru pH 4,8	20
4.5	Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 3,6	20
4.6	Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 4,0	20
4.7	Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 4,4	20
4.8	Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 4,8	20
4.9	Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 5,2	21
4.10	Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 5,6	21
4.11	Příprava roztoku enzymu	21
4.12	Stanovení aktivity enzymu metodou přírůstku redukujících skupin dle Somogyiho a Nelsona spektrometricky	21
4.12.1	Příprava činidel	22

4.12.1.1	Somogyiho činidlo I.....	22
4.12.1.2	Somogyiho činidlo II	22
4.12.1.3	Nelsonovo činidlo	22
4.12.1.4	Směs Somogyiho činidel.....	22
4.13	Stanovení přepočítávacího faktoru redukujících skupin a absorbancí.....	22
4.13.1	Příprava základní řady roztoků glukózy	22
4.13.2	Stanovení kalibrační křivky glukózy	23
4.14	Stanovení aktivity volného enzymu.....	24
4.15	Imobilizace enzymu na PET nosič.....	25
4.16	Imobilizace enzymu na nosič Sorsilen.....	26
4.17	Úprava PET nosiče glutaraldehydem.....	27
4.18	Imobilizace enzymu na PET nosič aktivovaný glutaraldehydem	27
4.19	Stanovení aktivity imobilizovaných enzymů.....	27
4.20	Stanovení zbytkové aktivity v roztocích po imobilizaci.....	28
4.21	Stanovení operační stability imobilizovaného enzymu	28
4.22	Stanovení pH optima imobilizovaného enzymu	28
4.23	Stanovení teplotního optima imobilizovaného enzymu.....	29
4.24	Stanovení tepelné stability	29
4.25	Stanovení změny účinku	30
5	Výsledky a diskuze	31
5.1	Imobilizace celulózy na PET nosič připravený z drti odpadního materiálu z PET lahví.....	31
5.1.1	Imobilizace celulózy na nosič Sorsilen	32
5.2	Imobilizace celulózy na PET nosič aktivovaný glutaraldehydem..	33
5.2.1	Imobilizace na PET nosič aktivovaný 1% glutaraldehydem	33
5.2.2	Imobilizace na PET nosič aktivovaný 2% glutaraldehydem	35
5.2.3	Imobilizace na PET nosič aktivovaný 3,75% glutaraldehydem	36
5.2.4	Imobilizace na PET nosič aktivovaný 7,5% glutaraldehydem	37
5.3	Srovnání aktivit jednotlivých imobilizátů na všech použitých nosičích.....	38
5.4	Operační stabilita enzymu imobilizovaného na PET nosiči	39
5.5	pH optimum enzymu imobilizovaného na PET nosiči	41
5.6	Teplotní optimum optimalizovaného imobilizovaného preparátu	42
5.7	Tepelná stabilita enzymu	43
5.8	Změna účinku.....	44
6	Závěr	45
7	Seznam použitých zdrojů	46
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	50
9	Seznam příloh	51
10	Přílohy	52

1 ÚVOD

Celulóza je nejrozšířenější polysacharid na Zemi, nachází se buněčné stěně rostlin a jedná se o molekuly glukózy spojené $\beta(1\rightarrow4)$ vazbou. Protože jsou rostliny různými způsoby využívány v potravinářském, dřevozpracujícím či textilním průmyslu, vzniká při jejich zpracování a následném použití průmyslových výrobků velké množství celulózového odpadu. [1,2,3]

Celulázy jsou enzymy, které katalyzují štěpení a degradaci celulózy na kratší polymery a případně až na glukózu. Ty mají také široké využití v průmyslu, avšak možnosti použití celulózového odpadu pro degradaci až na glukózu, která je dále zkvasitelná na ethanol, ještě není dostatečně efektivní pro zavedení pro ekonomickou průmyslovou výrobu, protože dochází k rychlé inhibici celulolytického komplexu vznikajícím produktem. [3]

Imobilizace enzymů nabízí možnosti, které by mohly takové nevýhody potlačit opětovným použitím enzymového preparátu, proto se jeví imobilizace celulolytického komplexu jako potenciální cesta ke změně technologického procesu výroby ethanolu z celulózového odpadu jako biopaliva. [4]

2 CÍL PRÁCE

1. Vypracovat literární přehled k dané problematice
2. Popsat použité metody hodnocení
3. Zpracovat naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnotit získané výsledky formou diskuse

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Celulóza

Celulóza je vysokomolekulární polysacharid, ve kterém je základní jednotkou β -glukóza. Jednotlivé molekuly v řetězci jsou spojeny glykosidovou $\beta(1\rightarrow4)$ vazbou. Na rozdíl od jiných v přírodě rozšířených polysacharidů, jako například škrob, nemá ve své struktuře α -glykosidické vazby a tvoří tak dlouhé rovné řetězce bez větvení. Jednotlivé řetězce se mezi sebou mohou vázat vodíkovými můstky mezi vodíky molekuly glukózy a kyslíky sousedního vlákna. Poté tvoří mikrofibrily, které drží pevně u sebe a zvyšují tak celkovou pevnost. [5,6]

Celulóza je zcela nerozpustná ve vodě, tvoří základní součást primárních buněčných stěn rostlin a spolu s hemicelulózou a ligninem i sekundárních, čímž se řadí mezi nejrozšířenější polysacharidy nebo polymery obecně na zemi. [5,6]

Její snadná dostupnost a relativně nízká pořizovací hodnota, ať už v čisté podobě ve formě rostlinné hmoty nebo v recyklované formě odpadního papíru, jí dává široký potenciál uplatnění nejen jako nenáročný zdroj sacharidů pro produkci biopaliv. [5,6]

V takovém případě je nejdříve celulóza chemicky nebo enzymaticky přeměněna na glukózu, která je následně fermentována kvasinkami na ethanol. Přesto, že cena chemické přeměny je v porovnání s cenou enzymatického preparátu nižší, dává enzymová přeměna čistší produkty. Následnou úpravou mechanismu a technologie enzymové přeměny lze dosáhnout nižší ceny než v případě chemické přeměny. [5,6,7]

3.2 Celulolytické enzymy

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly s katalytickou funkcí (biokatalyzátory) umožňující mnohé biochemické procesy v živých organismech.

Jsou velice selektivní, a to jednak na substrát, jehož přeměnu na produkt katalyzují, ale také na prostředí, ve kterém jsou schopny účinkovat.

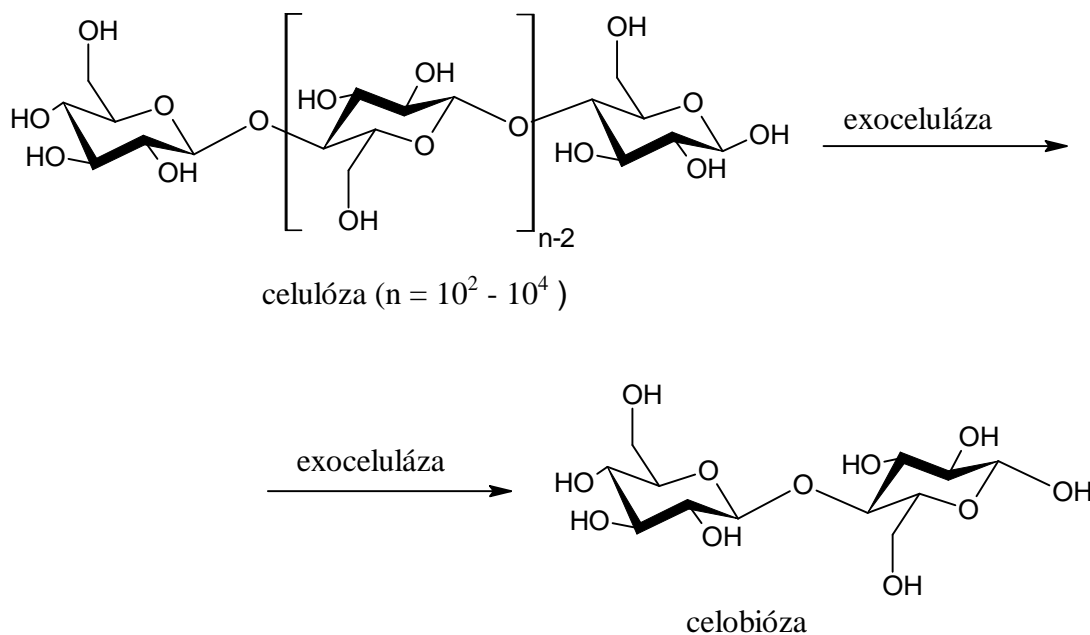
Označení celulolytické enzymy se používá pro enzymatický komplex, který se skládá ze tří enzymů, které jsou zodpovědné za přeměnu celulózy na rozpustné sacharidy s kratšími řetězci. Tento komplex má široké průmyslové využití, ať už v potravinářství při pivovarnictví, vinařství a zpracování ovocných šťáv nebo v papírenství. [1,5,6]

3.2.1 Endoceluláza

Endoceluláza katalyzuje reakci, při které dochází k rozpadu celulózy štěpením náhodných glykosidových vazeb. Tvoří se tak kratší řetězce - oligosacharidy, které jsou přístupné dalšímu štěpení. [1,7,8,9,10,11]

3.2.2 Exoceluláza

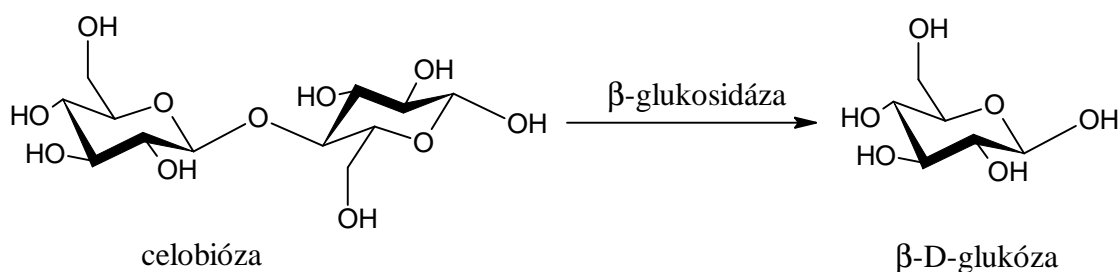
Exoceluláza je enzym, který katalyzuje degradaci dlouhého vlákna molekul celulózy. Štěpením z neredukujícího i redukujícího konce vznikají účinkem enzymu na substrát molekuly celobiózy. [1,9,10,11]



Obrázek č. 1 - Schéma funkce exocelulázy [7,8,10,11]

3.2.3 β -glukosidáza

β -glukosidáza je enzym, který katalyzuje rozklad celobiózy - dimeru glukózy, kdy jsou jednotky spojené $\beta(1 \rightarrow 4)$ vazbou, za vzniku dvou molekul β -D-glukózy. [1,7,9,10,11]



Obrázek č. 2 - Schéma funkce β -glukosidázy [7,8,10,11]

3.2.4 Produkce celulolytických enzymů

S rostoucími obavami okolo vyčerpávání zásob fosilních paliv, produkcí skleníkových plynů a znečištění ovzduší jejich nedokonalým spalováním se rovněž zvyšuje poptávka po produkci bioethanolu, který lze připravit z lignocelulóзовých materiálů a zvláště možnost využití celuláz k enzymatické hydrolýze takových materiálů. [12,13]

Produkce takového bioethanolu je nicméně finančně velmi nákladná, především kvůli vysoké ceně enzymových preparátů. Proto je nutné pro proces výroby bioethanolu celulolytickým štěpením upravit, aby byl ekonomicky využitelný. [12,13]

Celulázy jsou indukovatelné enzymy, což znamená, že jejich produkce mikroorganismy je vyvolána přítomností určité látky, tzv. induktoru, v prostředí. Při komerční produkci celuláz se takto využívá pevná celulóza, na které mikroorganismy přímo rostou nebo se získávají kultivací v přítomnosti jiného induktoru. V průmyslovém měřítku jsou však obě metody ekonomicky náročné. Při nízké koncentraci celulózy je množství vznikající glukózy nedostatečné pro růst a správnou funkci buněk. Naopak produkce celuláz může být pozastavena katalytickou represí, kdy je rychlost tvorby glukózy vyšší než rychlost jejího spotřebování. Proto musí být zaváděny finančně nákladné regulační procesy pro pomalý přítok substrátu a sledování koncentrace glukózy. [12,13]

I přes snahu využít genetického inženýrství pro lepší produkci enzymového aparátu je z ekonomického hlediska stále nutné upravit kroky takové produkce bioethanolu pro jeho komerční využití. [12,13]

Mikroorganismy produkující celulolytické enzymy jsou především takové, které utilizací využívají sacharidy - především proto, že nejsou schopni využít bílkoviny nebo lipidy jako zdroj energie pro růst. Zatímco celulolytické mikroorganismy jako *Cellulomonas* a *Cytophaga* a také většina hub dokáže ke své výživě využívat více druhů sacharidů, než jenom celulózu, některé anaerobní celulolytické druhy jsou takto schopny využívat pouze celulózu a produkty její hydrolýzy. [8,13]

Hub, co je schopno metabolizovat celulózu pro získání energie, je poměrně mnoho, ale pouze pár kmenů je schopno produkovat komplex celulolytických enzymů extracelulárně a to navíc ve velkém množství, což je důležitá podmínka pro jejich izolaci a následné využití pro enzymatickou hydrolýzu celulózy v praxi. [12,13]

Z hub využívaných ke komerční produkci celuláz se jedná především *Trichoderma reesei*, *Humicola insolens* a *Aspergillus niger*, z bakterií pak *Thermomonospora fusca* a *Bacillus sp.* [8,12,14]

Následná izolace vzniklých exocelulárních celuláz z prostředí bioreaktoru probíhá filtrací - pro oddělení nerozpustných materiálů - následovanou zakoncentrováním supernatantu, většinou lyofilizací. Takto izolovaný surový celulázový komplex může být případně dále rozdělen na jednotlivé enzymy za využití fast protein kapalinové chromatografie FPLC. [14]

3.2.5 Využití celuláz

Celulázy jsou pro své široké průmyslové využití ve světovém měřítku třetím nejvíce používaným enzymem. [3]

Zpočátku byly celulázy zkoumány pro svoji schopnost biokonverze biomasy rostlinného původu, čehož se hojně využívalo v průmyslovém využití při výrobě krmiv pro zvířata, potravinářství, textilním a dřevozpracujícím průmyslu. Přestože jsou v těchto odvětvích na nich založené technologie již nepostradatelné, až s úbytkem neobnovitelných zdrojů energie a dochází opět ke zvyšujícímu se zájmu o jejich další zkoumání, právě ve snaze

o získání dostačujícího obnovitelného zdroje energie a paliv, čímž by se mohly posunout na nejvíce průmyslově produkováný enzym. [3,13,15,16]

3.2.5.1 Textilní průmysl

Celulázy jsou využívány v textilním průmyslu při záměrném vytváření jemného opotřebení na jeansovém oblečení namísto použití původního mechanického tření pemzou. Působením na vlákna celulózy způsobují uvolnění barviva indigo, které je zodpovědné za modrou barvu tkaniny, čímž způsobují vznik světlejších skvrn.[12,13,16,17]

Rovněž jsou využívány pro odstraňování nežádoucích přečnívajících jemných vláken na okrajích a švech textilních produktů pro vznik lepšího zakončení, stejně jako pro zjemnění samotného materiálu. [12,16]

3.2.5.2 Prací prostředky

V pracích prostředcích jsou rovněž často využívány celulázy, kde působí podobným způsobem jako při využití v textilním průmyslu - jemným narušením vlákna celulózy dochází k lepšímu odstranění nečistot zevnitř vlákna, zároveň se zjemní celá struktura prádla. [12]

3.2.5.3 Potravinářský průmysl

Potravinářský průmysl využívá celulázy v širokém spektru aplikací, například pro usnadnění a zkrácení doby procesů lisování ovocných a zeleninových šťáv, při výrobě ovocných nektarů, produktů s vyšší viskozitou, jako třeba některá pyré, kde všude přispívají ke snížení viskozity produktu, ale rovněž dochází k lepšímu uvolnění organoleptických sloučenin z původní matrice. [12,16]

Taktéž jsou využívány při extrakci olejů, ať už při lisování semen rostlin jako je například slunečnice, ale také při výrobě olivového oleje. V takovém případě se využívá enzymové směsi pektináz (*Aspergillus*) a celuláz (*Trichoderma*), která dokáže zvýšit extrakci oleje z oliv z obvyklých 16-20 kg oleje na 100 kg oliv až o celé 2 kg za zachování podmínek nutných pro produkci extra panenského olivového oleje. Použití takové enzymové směsi při výrobě rovněž dokáže zvýšit obsah antioxidantů a vitamínu E.[12,16]

V pekařství jsou celulázy používány pro zlepšení kvality těsta i výsledných pekařských produktů, kde se předpokládá, že právě jejich použitím se zlepšují vlastnosti jako manipulace s těstem nebo objem a textura chleba. [13,16]

Při extrakci karotenoidů na výrobu potravinářských barviv jsou také používány celulázy, rovněž jako při výrobě vína, kde je využívána pro zlepšení macerace i extrakci samotné barvy hroznů z jejich slupky do výsledného produktu. Zvyšuje se tak nejen výtěžnost těchto procesů například zjednodušením procesu filtrace, ale rovněž i kvalita samotných produktů. Stejně využití a efekty mají celulázy i v pivovarnictví. [12,16]

Snaha po zlepšené stravitelnosti krmiv pro zvířata taktéž vede k využívání celulytických enzymů při jejich výrobě, především u krmiv vyráběných z obilovin. [12]

3.2.5.4 Papírenský průmysl

Důležitou roli hrají celulázy rovněž v papírenském průmyslu pro úpravu hrubé papírové drti - rozvlákňování, čímž následně zvyšují efektivitu a rychlost dalších výrobních kroků, jako například mletí. [12]

Při zpracovávání odpadních surovin jsou také využívány celulázy, kde - obdobně jako při využití v textilním průmyslu - povrchově narušují vlákna celulózy, ze kterých lze poté

jednodušeji vyprat barviva a pigmenty a taková surovina pak může být znovu (za další pomoci celulólytických enzymů) použita na výrobu např. papírových ručníků. [12]

3.2.5.5 *Biopaliva*

V poslední době je jedním z nejvíce studovaným použitím celulólytických enzymů degradace lignocelulózných odpadů pro produkci biopaliv. Především proto, že takový přírodní odpad by byl jednoduše obnovitelný zdroj, protože je lidstvu velmi snadno dostupný. Nevýhodou je právě omezení způsobené právě nedostatečnou ekonomickou efektivitou při zapojení do průmyslové výroby. [12,13,16]

Potenciální využití je založeno na biodegradaci celulózných materiálů těmito enzymy postupně až na glukózu a další zkvasitelné cukry. Ty pak mohou být v dalších krocích substráty pro mikroorganismy či jejich enzymové aparáty, jejichž fermentačním produktem je ethanol. Sice již byly objeveny mikroorganismy s celulóznými systémy, které jsou schopny přeměňovat biomasu přímo na ethanol, avšak žádný z těchto popsaných procesů není dostatečně efektivní pro komerční použití. [12,13,16]

3.3 Imobilizované enzymy

Imobilizované enzymy jsou definovány jako enzymy, které jsou fyzikálně či chemicky uchycené nebo umístěné v nějakém prostoru tak, aby byly opakovaně a kontinuálně použitelné a při tom si zachovaly svoji katalytickou aktivitu. [4]

Vlastnosti imobilizovaných enzymů se odvíjejí od dvou základních proměnných:

- Vlastnosti nosiče – např. izolace enzymu z reakčního prostředí a znovupoužití enzymu – tyto funkce jsou spjaty s fyzikálními a chemickými vlastnostmi nosiče – s jeho prostorovými vlastnostmi jako tvarem, velikostí, tloušťkou a délkou. [18,19,20]
- Vlastnosti enzymu – schopnost zpracovávat substrát na produkt – naopak závisí například na jeho aktivitě, selektivitě nebo stabilitě, pH a teplotě prostředí. [21]

Enzymy je při imobilizaci nutno vázat tak, aby nedocházelo ke změně jeho funkčních skupin, které nejsou esenciální pro jeho katalytickou aktivitu, rovněž při vzniku vazby nesmí docházet k denaturaci vázané bílkoviny a i reaktivní skupiny použitého nosiče musí být přístupny molekulám bílkoviny. [22]

Stabilita a katalytická aktivita závisí přímo na vlastnostech pevného nosiče – rozpustnost, stabilita, hydrofilní/-fobní charakter.

Nosič by neměl obsahovat funkční skupiny, se kterými by mohl reagovat přímo substrát a vázat se tak na něj. [21]

V současné době je známo mnoho možností imobilizace celulólytických enzymů. Většina z nich se potýká s problémy nízké aktivity připraveného enzymového preparátu nebo přílišné cenové náročnosti takového procesu, ať už se jedná o cenu nosiče nebo reakčních složek. [23,24,25]

3.3.1 Vlastnosti imobilizovaných enzymů

Vlastnosti imobilizovaných enzymů se oproti volným enzymům mění. Tyto změny jsou způsobeny dvěma faktory. [4]

Prvním z nich je vliv fyzikálních a chemických vlastností nosiče, kdy se vlastnosti mění nerovnoměrnou distribucí substrátu, produktů a vodíkových iontů mezi okolím aktivního místa enzymu a okolním prostředím, ve kterém enzym funguje. [4,20,22]

Druhým faktorem je změna konformace enzymu a sterické omezení (nepřístupnost aktivního místa enzymu pro vysokomolekulární látky) jako důsledek reakce, při které je enzym vázán na nosič. [4,22]

Důsledek obou faktorů se projevuje jako změna vlastností imobilizovaných enzymů. [16,20]

Vlastnosti, které se mohou vlivem imobilizace měnit, jsou:

- a) Specifická aktivita
- b) pH optimum
- c) Teplotní optimum
- d) Tepelná stabilita

3.3.1.1 *Specifická aktivita*

Vlivem změny konformace dochází ke snížení specifické aktivity imobilizovaného enzymu oproti enzymu volnému. Další možností snížení aktivity je také sterické stínění aktivního místa, kdy se vlivem množství imobilizovaného enzymu na nosiči a velikostí substrátu (především u vysokomolekulárních látek) nedostane substrát na aktivní místo enzymu v maximální možné míře, což opět způsobí pokles aktivity. Tomu lze předejít použitím oddalovací spojky mezi nosičem a enzymem. [4,21,22]

3.3.1.2 *Vliv pH na aktivitu*

Při určitém pH prostředí, ve kterém se enzymaticky katalyzovaná reakce odehrává, dochází k nejvyšší efektivitě katalyzátoru. Toto pH je označováno jako pH optimum. [4,18,19]

Ke změně pH optima dochází u imobilizovaných enzymů důsledkem nerovnoměrného rozložení vodíkových H^+ iontů mezi mikro- a makrookolím enzymu. V případě, že se na nosiči nenacházejí žádné ionogenní skupiny, pH optimum se nemění. Pokud však nosič nějaké disociovatelné skupiny obsahuje, tak disociací vzniklé vodíkové ionty snižují pH uvnitř nosiče. Zamezení tohoto efektu je možné zvýšením pH roztoku. Obdobně lze zamezit i opačnému efektu, kdy jsou na nosiči zásadité skupiny, jimi způsobené zvýšení pH lze potlačit okyselením roztoku. [4,21]

3.3.1.3 *Teplotní optimum*

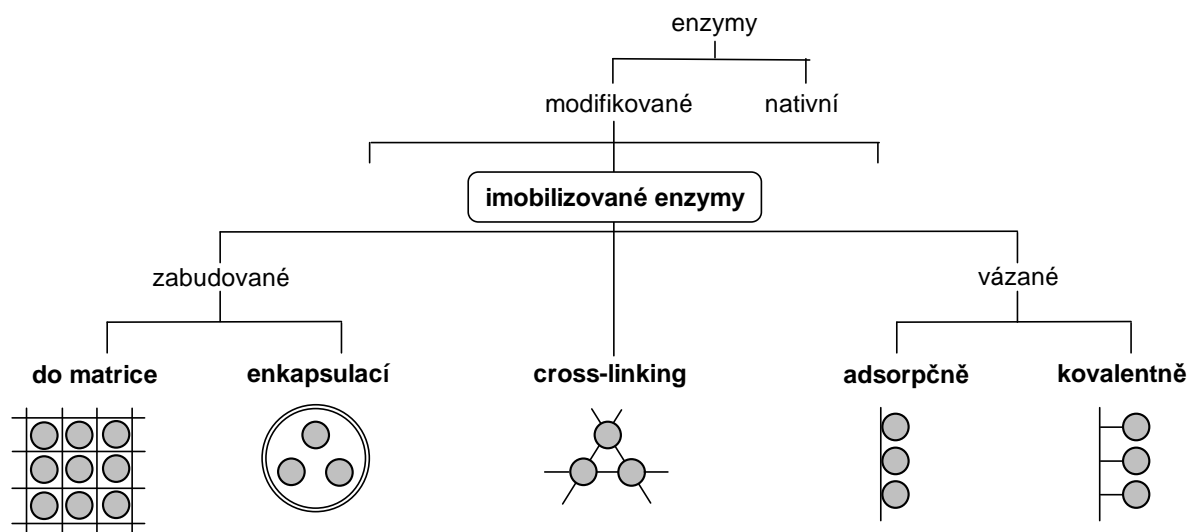
Teoreticky dochází se zvýšením teploty reakce i k zvýšení její rychlosti. S rostoucí teplotou však roste možnost denaturace enzymové bílkoviny. Teplota, při které je rychlost reakce nejvyšší a přitom nedochází k denaturaci bílkoviny, se označuje jako teplotní optimum. Imobilizované enzymy mají tu nevýhodu, že při nižších teplotách obecně dosahují nižších aktivit, protože je nepříznivě ovlivňuje vliv difuze. Naopak při vyšších teplotách se nejen zvyšuje aktivita enzymových preparátů, ale rovněž se mění rychlost difuze substrátu, což snižuje rychlost inaktivace enzymu zvyšující se koncentrací vzniklého produktu v nejbližším okolí. [4,21]

3.3.1.4 *Tepelná stabilita*

Je to schopnost enzymů pracovat v prostředí zvýšené teploty, aniž by docházelo k jejich tepelné denaturaci. V případě imobilizace enzymu je nutné při výběru vhodného nosiče zohlednit i jeho tepelnou roztažnost v prostředí. Pokud je jeho tepelná roztažnost vysoká, může se aktivní místo imobilizovaného enzymu poškodit právě roztahováním nebo smršťováním nosiče. [4,16,21,22]

3.3.2 Způsoby imobilizace enzymů

Zjednodušeně lze rozdělit imobilizované enzymy na preparáty, které nevyužívají nosič - enzymy zabudované v matrici a enzymy zesíťované mezi sebou - a na preparáty vázané na nosič.



Obrázek č. 3 - Schéma rozdělení možností imobilizace enzymu [18,19,22]

3.3.2.1 Enzymy zabudované

Tyto metody jsou založeny na uzavření enzymu do gelu matrice polymerního nosiče nebo do gelu semipermeabilní membrány, aniž by docházelo k jeho chemické modifikaci, totiž enzym se na gel matrice nebo polopropustné membrány nijak neváže. [4,21]

Tyto metody však nejsou vhodné pro imobilizaci enzymů, které katalyzují reakce, jejichž výchozími látkami jsou vysokomolekulární látky. Do blízkosti takto imobilizovaných enzymů totiž mohou difundovat pouze nízkomolekulární substráty. [4,20,22]

Imobilizace zabudováním do matrice

Při této metodě se enzym uzavře do vnitřního prostoru polymerní matrice, která je ve vodě nerozpustná. Materiál této matrice může být buď syntetický (například polyakrylamid nebo polyvinylalkohol), nebo přírodní (například škrob nebo dextransy). [4,20,22]

Reakce katalyzovaná takto imobilizovaným enzymem probíhá pouze v rámci gelové matrice, proto takto mohou reagovat pouze substráty, které do ní snadno difundují. [20,22]

Výhodou této metody je schopnost fungovat i při nižších teplotách, což může mít pozitivní vliv na zamezení ztrát enzymové aktivity. Naopak nevýhodou je finanční náročnost a nevhodnost pro užití v průmyslu. [4]

Imobilizace opouzdřením mikrokapsulí

Tato metoda využívá uzavření enzymu v mikrokapsuli z polopropustné membrány. Velikost takové kapsule se pohybuje v řádech jednotek až stovky mikrometrů. [4,20,22,25]

V porovnání s ostatními způsoby imobilizace enzymů patří mezi výhody metody enkapsulace především možnost imobilizovat mnoho enzymů zároveň a také často mírné podmínky potřebné pro tento způsob. [4,21]

Zabudování do alginátového gelu

Metodou využitelnou přímo pro imobilizaci celulózového komplexu je zabudování do gelové matrice z alginátu vápenatého. Ten je připraven reakcí alginátu sodného s roztokem chloridu vápenatého CaCl_2 , ve kterém už je zároveň rozpuštěna celulóza. Tato metoda má velkou výhodu, že při ní nedochází k vazbě celulózy, proto nedochází ke změně konformace aktivního místa enzymu a připravený preparát má poměrně velkou aktivitu. Nevýhodou je, že z důvodu relativně velkých pórů pro vstup substrátu k zabudovanému enzymu dochází k vymývání enzymu z matrice a při opakovaném použití pak aktivita takového preparátu klesá. [26]

Takto připravený enzymový preparát připravený z celulózového komplexu si dokáže zachovat až 83 % původní aktivity volného enzymu. [26]

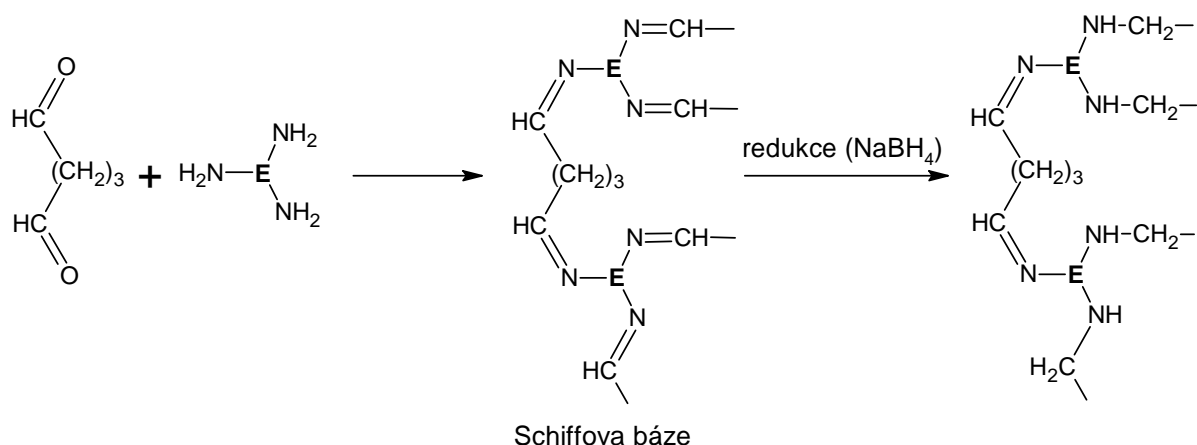
3.3.2.2 Imobilizace zesíťováním (cross-linking)

Jedná se o další způsob imobilizace využívající kovalentní vazbu. Na rozdíl od kovalentní imobilizace se enzym neváže na nerozpustný nosič, ten se v tomto případě vůbec nepoužívá, ale tvoří se intermolekulové vazby mezi bi- nebo multifunkčním síťovacím činidlem a aminoskupinou:

- α -aminoskupinou N-konce
- ϵ -aminoskupinou lysinu
- Fenolickou skupinou tyrosinu [4,21]

Stejně jako u kovalentní imobilizace může docházet k modifikaci esenciálních skupin aktivního místa, což může vést k prudkému poklesu aktivity imobilizovaného enzymu. Proto je nutné chránit aktivní místo enzymu vratnou chemickou reakcí nebo přidáním substrátu. Výhodou je relativně nízká cena síťovacího činidla, avšak modifikací esenciálních skupin aktivního místa enzymu může dojít k významnému poklesu aktivity enzymu. [20,22]

Na imobilizaci se nejčastěji používá glutaraldehyd (pentan-1,5-dial) – reakcí mezi aldehydovou skupinou a aminoskupinou enzymu vzniká Schiffova báze, ta může ještě dále redukovat. [27]



Obrázek č. 4 - Schéma průběhu imobilizace zesíťováním [27]

Cross-linked enzymové agretáty (CLEA)

Pro imobilizaci celulytického komplexu je využívána metoda zesíťovaných (cross-linked) enzymových agregátů, která spočívá ve vysrážení rozpuštěného z roztoku enzymu vhodným srážecím činidlem. Na to lze využít škálu různých látek, celulózový komplex si nejvyšší aktivitu zachovává při vysrážení polyethylenglykolem, dimethyletherem, síranem amonným, t-butanolem nebo n-propanolem. [28,29,30,31]

Takto vysrážený enzymový agregát se následně zesíťuje vhodným činidlem - nejčastěji glutaraldehydem, čímž se opět zvětšuje velikost částic a usnadňuje se tak zpětná izolace enzymu z reakčního prostředí. Další velkou výhodou je kromě relativně nízké ceny také možnost využití ve větším měřítku. Takto připravený enzymatický preparát neobsahuje kromě enzymu žádné další složky, takže se jedná o v podstatě čistý protein. Tím odpadají negativní vlivy nosičů na enzymovou aktivitu. [28,31,32]

Takto připravený enzymový preparát z celulózového komplexu vysrážený polyethylenglykolem a následně zesíťovaný glutaraldehydem si dokáže nejen zachovat původní hodnotu aktivity volného enzymu, ale dokonce ji ještě zvýšit na 140 %. [29]

3.3.2.3 Enzymy vázané na nosič

Enzymy imobilizované adsorpcí

Jedná se o nejstarší a nejjednodušší metodu přípravy imobilizovaných enzymů. Obecně tak lze označit všechny metody, kdy je enzym vázán na nosič na fázovém rozhraní nekovalentními vazbami. [20]

Pro samotnou imobilizaci stačí pouze styk vodného roztoku enzymu s nosičem – absorbentem. [22]

Dle typu nekovalentní vazby lze tento typ imobilizace dále rozlišovat dle typu interakce mezi nosičem a enzymem: [21,22]

- Nespecifická fyzikální adsorpce – enzymy jsou na nosič vázány různými typy vazeb – van der Waalsovými vazbami, vodíkovými můstky, hydrofilní interakcí.
- Biospecifická adsorpce – využívá imobilizované ligandy pro adsorpci enzymů.
- Elektrostatická interakce (iontová vazba) – založená na rozdílném náboji mezi nosičem a enzymem.
- Hydrofóbní interakce – interakce mezi hydrofóbními vazebnými místy na nosiči i enzymu.

V posledních pár desítkách let byl tento typ imobilizace intenzivně zkoumán pro jeho výhody [4,22]:

- Jednoduchost – malé nároky na podmínky imobilizace.
- Možnost zachování vysoké katalytické funkce – nedochází ke změnám aktivního místa enzymu.
- Stav enzymu nejbližší skutečnému stavu v buňce. [6]

Naopak nevýhodou tohoto typu imobilizace je především to, že vlivem malé vazebné interakce mezi enzymem a nosičem dochází u takto imobilizovaných enzymů k samovolnému uvolňování z nosiče. Je to způsobeno tím, že vázání enzymu na povrch není obecně dostatečně specifické, a proto dochází ke kompetici s dalšími látkami v roztoku a uvolnění enzymu zpět do prostředí roztoku. [20,21,22]

Chitosan-chitin

Jako nosič pro imobilizaci celulózy lze využít upravenou směs chitinu a chitosanu, který lze připravit jeho alkalickou deacetylací chitinu. Takto připravený nosič lze využít přímo k imobilizaci enzymu adsorpcí a následné aplikaci. Po provedení imobilizace lze zvýšit stabilitu takto připraveného preparátu reakcí s glutaraldehydem, který reaguje stejně, jak je zmíněno v kapitole 3.3.2.2. Další možností je aktivace chitinu reakcí s glutaraldehydem, kdy dojde ke zvětšení povrchu nosiče a zároveň po následné imobilizaci enzymu k zvětšení vzdálenosti od nosiče, čímž by mělo být aktivní místo enzymu lépe přístupné a takový preparát by měl potom mít vyšší aktivitu. Po imobilizaci na takto připravený nosič lze rovnou použít jako enzymový aparát. [33]

Takto připravené imobilizované celulózy si v kyselém reakčním prostředí zachovají i po mnoha opakovaných použití vysokou aktivitu až kolem 60 %. [33]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a přístroje

4.1.1 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga Eppendorf
- Laboratorní sklo
- Mikropipety
- Magnetická míchačka
- Nuč s fritou
- pH metr – WTW inoLab pH 720
- Spektrofotometr UV/VIS Helios ε
- Třepačka na zkumavky IKA LabDancer
- Váhy laboratorní Scaltec
- Vařič kuchyňský ETA
- Viskozimetr Ubbelohdeho
- Vodní vývěva

4.1.2 Použitý celulytický enzymový preparát

K charakterizaci byl použit lyofilizovaný celulytický preparát Cellulast 1.5L

4.1.3 Použité nosiče

Jako nosič byl použit polyethylentereftalát ve dvou variantách:

- Komerční preparát Sorsilen, výrobce Silon a.s.
- Aktivovaná drť z odpadních PET lahví dle patentu VUT [34]

4.1.4 Použitý substrát

Jako substrát pro enzymovou reakci byla použita karboxymethylcelulóza (CMC), výrobce Sigma-Aldrich.

4.1.5 Chemikálie

K práci byly použity tyto chemikálie:

- Tetrahydrát vinanu sodno-draselného – $C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$
- Hydrogenuhličitan sodný – $NaHCO_3$
- Uhličitan sodný – Na_2CO_3
- Síran sodný bezvodý – Na_2SO_4
- Pentahdrát síranu měďnatého – $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- Tetrahydrát heptamolybdenanu hexaamonného – $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$
- Heptahdrát hydrogenarseničnanu sodného – $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$
- Kyselina sírová koncentrovaná – H_2SO_4
- Kyselina octová koncentrovaná – CH_3COOH
- Octan sodný bezvodý – CH_3COONa
- Aceton – CH_3COCH_3

4.2 Příprava nosiče z odpadních PET lahví

Číré umyté odpadní PET lahve byly nastříhány na menší kusy. Ty byly dále pomlety na střížném mlýně a vzniklá drť byla sítováním rozdělena na jednotlivé frakce. Nejmenší frakce částic byla po úpravě dle patentu použita k imobilizaci. [34]

Takto připravený nosič byl následně uchováván v lednici při teplotě 4 °C.

4.3 Příprava roztoku 0,2M roztoku octanu sodného

Bylo naváženo 16,406 g bezvodého octanu sodného. Navážka byla kvantitativně převedena do 50ml odměrné baňky, rozpuštěna v malém množství destilované vody a objem byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

4.4 Příprava 0,1M roztoku octanového pufru pH 4,8

Ve 100ml odměrné baňce bylo smícháno 20,0 ml 0,2M roztoku kyseliny octové a 30,0 ml 0,2M roztoku octanu sodného a objem byl doplněn vodou po rysku.

4.5 Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 3,6

Bylo naváženo 1,003 g karboxymethylcelulózy, navážka byla rozmíchána na magnetické míchačce v 50,0 ml vody. Do směsi bylo přidáno 3,7 ml 0,2M octanu sodného a koncentrovanou kyselinou octovou bylo upraveno pH na hodnotu 4,0. Směs byla kvantitativně převedena do 100ml odměrné baňky a doplněna vodou po rysku.

4.6 Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 4,0

Bylo naváženo 1,008 g karboxymethylcelulózy, navážka byla rozmíchána na magnetické míchačce v 50,0 ml vody. Do směsi bylo přidáno 9,0 ml 0,2M octanu sodného a koncentrovanou kyselinou octovou bylo upraveno pH na hodnotu 4,0. Směs byla kvantitativně převedena do 100ml odměrné baňky a doplněna vodou po rysku.

4.7 Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 4,4

Bylo naváženo 1,007 g karboxymethylcelulózy, navážka byla rozmíchána na magnetické míchačce v 50,0 ml vody. Do směsi bylo přidáno 19,5 ml 0,2M octanu sodného a koncentrovanou kyselinou octovou bylo upraveno pH na hodnotu 4,4. Směs byla kvantitativně převedena do 100ml odměrné baňky a doplněna vodou po rysku.

4.8 Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 4,8

Bylo naváženo 1,008 g karboxymethylcelulózy, navážka byla rozmíchána na magnetické míchačce v 50,0 ml vody. Do směsi bylo přidáno 30,0 ml 0,2M octanu sodného a koncentrovanou kyselinou octovou bylo upraveno pH na hodnotu 4,8. Směs byla kvantitativně převedena do 100ml odměrné baňky a doplněna vodou po rysku.

4.9 Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 5,2

Bylo naváženo 1,002 g karboxymethylcelulózy, navážka byla rozmíchána na magnetické míchače v 40,0 ml vody. Do směsi bylo přidáno 39,5 ml 0,2M octanu sodného a koncentrovanou kyselinou octovou bylo upraveno pH na hodnotu 5,2. Směs byla kvantitativně převedena do 100ml odměrné baňky a doplněna vodou po rysku.

4.10 Příprava roztoku substrátu - 1% CMC v 0,1M octanovém pufru pH 5,6

Bylo naváženo 1,011 g karboxymethylcelulózy, navážka byla rozmíchána na magnetické míchače v 40,0 ml vody. Do směsi bylo přidáno 45,2 ml 0,2M octanu sodného a koncentrovanou kyselinou octovou bylo upraveno pH na hodnotu 5,6. Směs byla kvantitativně převedena do 100ml odměrné baňky a doplněna vodou po rysku.

4.11 Příprava roztoku enzymu

Bylo naváženo 0,010 g enzymu, které bylo rozpuštěno v malém množství 0,1M octanovém pufru pH = 4,8 a následně kvantitativně převedeno do 5ml odměrné baňky a následně byl objem stejným pufrům doplněn po rysku. Vznikl tak roztok o koncentraci enzymu $0,002 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Z této baňky bylo odebráno 0,500 ml roztoku pufru do 20ml odměrné baňky a objem byl stejným pufrům opět doplněn po rysku. Vznikl tak roztok o koncentraci enzymu $0,05 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$.

4.12 Stanovení aktivity enzymu metodou přírůstku redukujících skupin dle Somogyiho a Nelsona spektrometricky

Štěpením polysacharidického substrátu vznikají produkty, které obsahují redukující skupiny. Přidání směsi Somogyiho činidel jednak zastavuje enzymovou reakci, jednak působením redukujících skupin se měďnatý kationt Cu^{2+} (ze síranu měďnatého CuSO_4 ze směsi Somogyiho činidel) redukuje na Cu^+ , který se pak v roztoku nachází jako oxid měďný Cu_2O . Ten reaguje s Nelsonovým činidlem, kde redukuje arsenomolybdenovou kyselinu za vzniku typicky modrého zbarvení. Míra zbarvení se určuje spektrometricky. [35]

Naměřené hodnoty absorbance byly v programu Microsoft Office Excel vyneseny do grafu jako závislost absorbance na délce průběhu enzymové reakce.

Stejným programem byl funkcí LINREGRESE vypočítán koeficient regresní přímky, která vystihuje tuto závislost v tvaru:

$$y = a \cdot x.$$

Z rovnice regresní přímky byla spočítána absorbance roztoku pro délku enzymové reakce $t = 1 \text{ min}$.

Specifická aktivita se pak vypočítá dle vzorce: [22]

$$A[\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}] = \frac{A_{530} \cdot f}{t \cdot c_E},$$

kde f je přepočítávací faktor mezi koncentrací redukujících skupin v roztoku a naměřenou absorbancí, t je čas v minutách, při které byla odečítána příslušná hodnota absorbance a c_E je koncentrace enzymu v reakční směsi.

4.12.1 Příprava činidel

4.12.1.1 Somogyiho činidlo I

V 600 ml vody bylo rozpuštěno 18 g uhličitanu sodného, 16 g hydrogenuhličitanu sodného, 12 g vinanu sodno-draselného a 144 g bezvodého síranu sodného a objem byl doplněn na 800,0 ml. [35]

4.12.1.2 Somogyiho činidlo II

V malém množství vody byly rozpuštěny 4,0 g síranu měďnatého a 36 g bezvodého síranu sodného. Objem byl doplněn na 200,0 ml. [35]

4.12.1.3 Nelsonovo činidlo

V 450 ml vody bylo rozpuštěno 25 g tetrahydrátu heptamolybdenanu hexaamonného, do ní bylo přidáno 25 ml koncentrované kyseliny sírové. Poté byly přidány 3 g heptahydrátu hydrogenarseničnanu sodného a objem byl doplněn na 500,0 ml.

Pro promíchání se nechá činidlo inkubovat 24 hodin při 38°C. [35]

4.12.1.4 Směs Somogyiho činidel

Těsně před použitím se smísí Somogyiho činidlo I a II v poměru 4:1 a dále se pracuje pouze s touto směsí a Nelsonovým činidlem. [35]

4.13 Stanovení přepočítávacího faktoru redukujících skupin a absorbancí

4.13.1 Příprava základní řady roztoků glukózy

Pro sestavení kalibrační křivky glukózy byly připraveny jednotlivé roztoky. Bylo naváženo 1,80 g glukózy, toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Z takto připraveného roztoku bylo odpipetováno 10,0 ml do 500ml odměrné baňky a objem byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Z tohoto roztoku glukózy bylo potom dále pipetováno dle tabulky č. 1 pro přípravu kalibrační řady 0,0-2,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ v krocích po 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$. [22]

c [$\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$]	$\Sigma V = 1,0 \text{ ml}$	
	V H ₂ O [ml]	V Θ glukózy [ml]
0,0	1,0	0,0
0,2	0,9	0,1
0,4	0,8	0,2
0,6	0,7	0,3
0,8	0,6	0,4
1,0	0,5	0,5
1,2	0,4	0,6
1,4	0,3	0,7
1,6	0,2	0,8
1,8	0,1	0,9
2,0	0,0	1,0

Tabulka č. 1 - Ředění kalibrační křivky glukózy

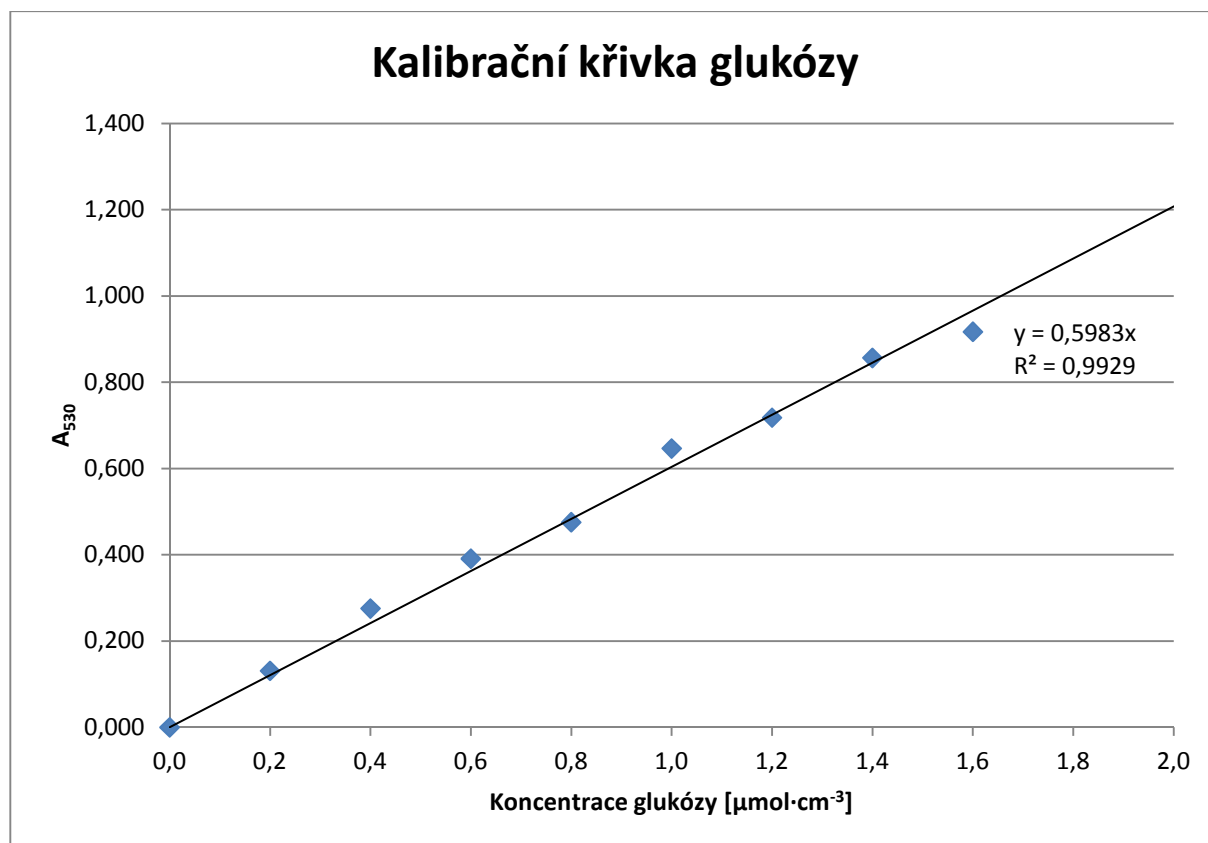
4.13.2 Stanovení kalibrační křivky glukózy

Do zkumavky s 1 ml připraveného roztoku glukózy o různých koncentracích v rozsahu $0,0-2,0 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ s krokem po $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ bylo vždy přidáno po 1,0 ml směsi Somogyiho činidel I a II v poměru 4:1. Obsah zkumavek byl po dobu 10 minut vařen na vodní lázni a po vyjmutí a ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno po 1,0 ml Nelsonova činidla. Vzniklý roztok byl zředěn přidáním 7,0 ml destilované vody a po promíchání byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 530 \text{ nm}$ oproti blanku, což byl roztok s nulovou koncentrací glukózy. [22]

Výsledky shrnuje tabulka č. 2 a graf č. 1.

Tabulka č. 2 - Kalibrační křivka glukózy

$C_{\text{glukóza}} [\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}]$	A_{530}
0,0	0,000
0,2	0,134
0,4	0,276
0,6	0,371
0,8	0,454
1,0	0,643
1,2	0,734
1,4	0,841
1,6	0,911



Graf č. 1 - Kalibrační křivka glukózy

Z regresní rovnice přímky ve tvaru $y = a \cdot x$ byl dopočítán přepočítávací faktor f , což je hodnota koncentrace glukózy, která odpovídá absorbanci $A_{530} = 1$.

$$y = a \cdot x$$

$$1 = 0,5983 \cdot x$$

$$y = \underline{\underline{1,6715}} = f$$

4.14 Stanovení aktivity volného enzymu

Pro stanovení aktivity volného enzymového preparátu byl připraven roztok o koncentraci $0,05 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ enzymu v $0,1 \text{ M}$ octanovém pufru o pH 4,8. Ten byl připraven navážením $0,010 \text{ g}$ lyofilizovaného enzymu a jeho rozpuštěním v malém množství $0,1 \text{ M}$ octanového pufru v 200 ml odměrné baňce a následném doplnění objemu baňky stejným pufrům po rysku. Do čtyř zkumavek bylo napipetováno po $0,500 \text{ ml}$ substrátu a $0,500 \text{ ml}$ roztoku enzymu. V určitém čase $t = 0, 10, 20, 30 \text{ min}$ bylo postupně přidáváno po $1,000 \text{ ml}$ předpřipravené směsi Somogyiho činidel I a II v poměru 4:1 pro zastavení činnosti enzymu.

Obsah zkumavek byl 10 minut vařen ve vodní lázni.

Do každé zkumavky bylo následně po vychladnutí přidáno $1,000 \text{ ml}$ Nelsonova činidla a $7,00 \text{ ml}$ vody a jejich obsah byl promíchán.

Byla změřena absorbance roztoků při vlnové délce $\lambda = 530 \text{ nm}$ proti obsahu zkumavky, kde probíhala enzymová reakce po dobu $t = 0 \text{ min}$.

Výsledky shrnuje tabulka č. 3 a graf č. 2.

Tabulka č. 3 - Naměřené hodnoty absorbance při reakci volného enzymu

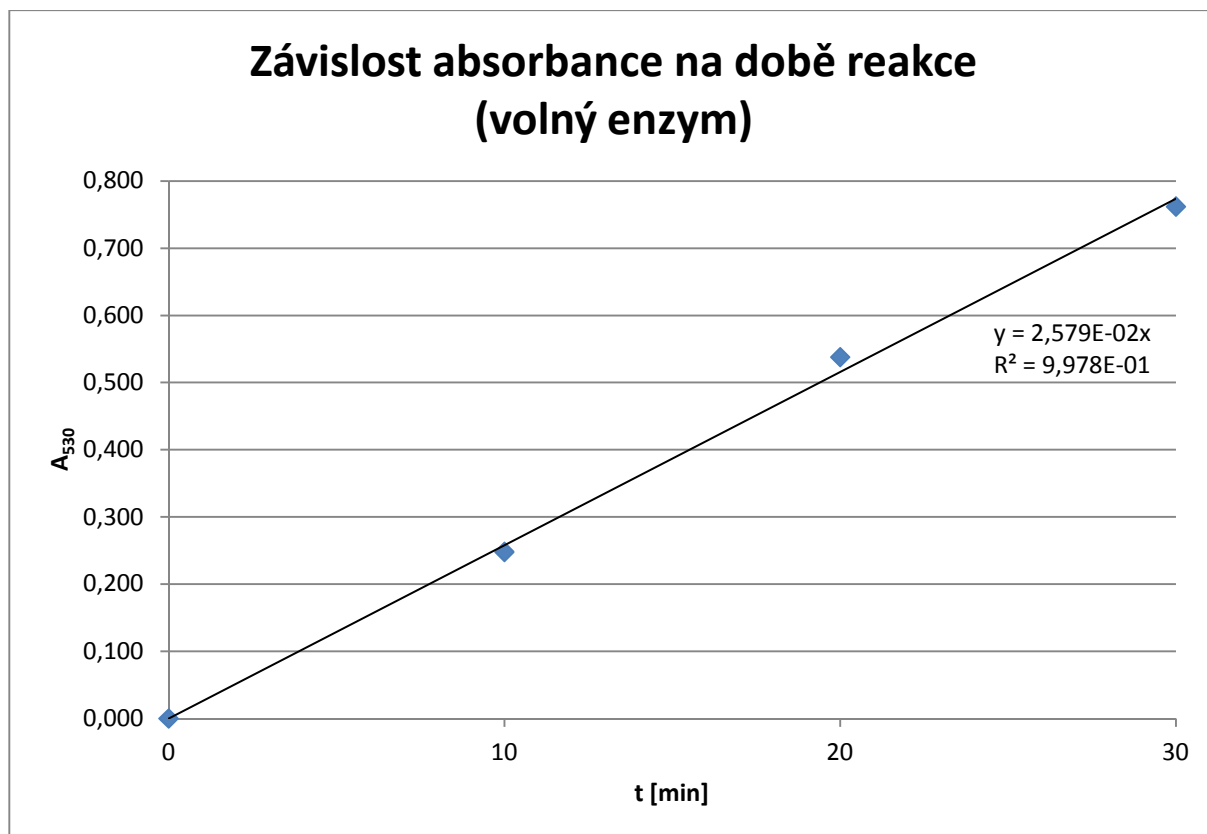
t [min]	A_{530}
0	0,000
10	0,248
20	0,538
30	0,762

V programu MS-Excel byl funkcí LINREGRESE vypočítán koeficient regresní přímky ve tvaru $y = a \cdot x$, vystihující závislost absorbance roztoku na délce enzymové reakce, kde a odpovídá hodnotě absorbance pro délku enzymové reakce $t = 1 \text{ minuta}$ - $y = 0,02579 \cdot x$.

Samotná aktivita pak byla spočítána dle vzorce $A[\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}] = \frac{A_{530} \cdot f}{t \cdot c_E}$, kde A_{530} je

hodnota absorbance pro délku enzymové reakce v čase $t = 1 \text{ minuta}$, f je přepočítávací faktor z kalibrační křivky glukózy a c_E je koncentrace enzymu. [22]

Stejným způsobem byla počítána aktivita i ve všech ostatních případech.



Graf č. 2 - Závislost absorbance na době reakce volného enzymu

Hodnota aktivity volného enzymu byla dosazením vypočítána na:

$$a = 0,8620 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$$

4.15 Imobilizace enzymu na PET nosič

V Erlenmeyerově baňce bylo vždy při teplotě 4 °C po dobu 48 hodin protřepáváno po 1,0 g PET nosiče s určitým množstvím enzymu v roztoku, doplněného na celkový objem 20 ml 0,1M octanovým pufrům o pH = 4,8. Množství enzymu v roztoku při jednotlivých měřeních bylo 0,1 μg, 0,3 μg, 0,5 μg, 1,0 μg a 2,0 μg.

Tyto roztoky byly připraveny ředěním základního roztoku enzymu o koncentraci enzymu 2,0 mg·cm⁻³ octanového pufru pH 4,8 dle tabulky č. 4.

Tabulka č. 4 - Ředění roztoku enzymu na imobilizaci na PET nosič

c _{0enzymu} [mg·cm ⁻³]	m _{enzymu v θ} [mg]	V _{0enzymu} [μl]	V _{pufr} [ml]	V _{celkem} [ml]
2,0	0,1	50	19,95	20
2,0	0,3	150	19,85	20
2,0	0,5	250	19,75	20
2,0	1,0	500	19,50	20
2,0	2,0	1000	19,00	20

Po 48 hodinách byla směs imobilizátu a octanu s nenasorbovaným enzymem odfiltrována na fritě. Imobilizát byl třikrát promyt 100 ml 0,1M octanového pufru pH 4,8 a filtráty byly jímány. Imobilizovaný enzym byl pak uchováván ve zkumavce spolu s 20,0 ml 0,1M octanového pufru pH = 4,8.

Stejným způsobem pak byla oddělena směs imobilizátu a kapaliny u všech směsí.

4.16 Imobilizace enzymu na nosič Sorsilen

V Erlenmeyerově baňce bylo vždy při teplotě 4 °C po dobu 48 hodin protřepáváno 1,0 g nosiče Sorsilenu s určitým množstvím enzymu v roztoku, doplněného na celkový objem 20 ml 0,1M octanovým pufrům o pH = 4,8. Množství enzymu v roztoku při jednotlivých měřeních bylo 0,1 mg, 0,3 mg, 0,5 mg, 1,0 mg, 2,0 mg, 3,0 mg, 5,0 mg, 10,0 mg, 20,0 mg, 30,0 mg a 40 mg.

Roztoky, kde bylo výsledné množství enzymu do 5,0 mg, byly připraveny ředěním základního roztoku enzymu o koncentraci 2,0 mg·cm⁻³ octanového pufru pH 4,8 dle tabulky č. 5.

Tabulka č. 5 - Ředění roztoku enzymu k imobilizaci na Sorsilen 1

$c_{\text{enzym}} [\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}]$	$m_{\text{enzymu v } \Theta} [\text{mg}]$	$V_{\Theta \text{ enzymu}} [\mu\text{l}]$	$V_{\text{pufr}} [\text{ml}]$	$V_{\text{celkem}} [\text{ml}]$
2,0	0,1	50	19,95	20
2,0	0,3	150	19,85	20
2,0	0,5	250	19,75	20
2,0	1,0	500	19,50	20
2,0	2,0	1000	19,00	20
2,0	3,0	1500	18,50	20
2,0	5,0	2500	17,50	20

Roztoky, kde bylo výsledné množství enzymu vyšší, než 5,0 mg byly připraveny ředěním základního roztoku o koncentraci 20,0 mg·cm⁻³ octanového pufru pH 4,8 dle tabulky č. 6.

Tabulka č. 6 - Ředění roztoku enzymu k imobilizaci na Sorsilen 2

$c_{\text{enzym}} [\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}]$	$m_{\text{enzymu v } \Theta} [\text{mg}]$	$V_{\Theta \text{ enzymu}} [\mu\text{l}]$	$V_{\text{pufr}} [\text{ml}]$	$V_{\text{celkem}} [\text{ml}]$
20,0	10,0	500	19,50	20
20,0	20,0	1000	19,00	20
20,0	30,0	1500	18,50	20

Po 48 hodinách byla směs imobilizátu a octanu s nenasorbovaným enzymem odfiltrována na fritě. Imobilizát byl třikrát promyt 100 ml 0,1M octanového pufru pH 4,8 a filtráty byly jímány. Imobilizovaný enzym byl pak uchováván ve zkumavce spolu s 20,0 ml 0,1M octanového pufru pH = 4,8.

Stejným způsobem pak byla oddělena směs imobilizátu a kapaliny u všech směsí.

4.17 Úprava PET nosiče glutaraldehydem

Pro zvýšení velikosti částic a tím i zvýšení sorpční kapacity PET nosiče byla drť míchána s roztokem glutaraldehydu o různých koncentracích. [33]

Jeden gram PET nosiče byl vždy rozsuspendován v 0,1M octanovém pufru pH 4,8 a byl přidán 15% vodný roztok glutaraldehydu v množství dle tabulky č. 7 pro dosažení koncentrací 1 %, 2 %, 3,75 % a 7,5 % tak, aby byl celkový objem kapaliny vždy 20 ml.

Tabulka č. 7 - Výpočet přidávaného množství glutaraldehydu

Celkový objem [ml]	Obsah glutaraldehydu [%]	Objem 15% roztoku glutaraldehydu [ml]	Objem pufru [ml]
20	1,00	0,800	19,2
20	2,00	1,600	18,4
20	3,75	3,00	17,0
20	7,50	6,00	14,0

Tyto směsi byly vždy po dobu tří hodin míchány při laboratorní teplotě ve tmě. Po ukončení míchání byly nosiče přefiltrovány za sníženého tlaku na fritě, opakovaně promyty 0,1M octanovým pufrům pH = 4,8 a použity k imobilizaci celulólytického komplexu.

4.18 Imobilizace enzymu na PET nosič aktivovaný glutaraldehydem

V Erlenmeyerově baňce bylo vždy při teplotě 4 °C po dobu 48 hodin protřepáváno po 1,0 g PET nosiče aktivovaného glutaraldehydem s určitým množstvím enzymu v roztoku, doplněného na celkový objem 20 ml 0,1M octanovým pufrům o pH 4,8. Množství enzymu v roztoku při jednotlivých měřeních bylo 0,1 µg, 0,3 µg, 0,5 µg, 1,0 µg a 2,0 µg.

Tyto roztoky byly připraveny ředěním základního roztoku enzymu o koncentraci enzymu 2,0 mg·cm⁻³ octanového pufru pH 4,8 dle tabulky č. 3.

Po 48 hodinách byla směs imobilizátu a octanu s nenasorbovaným enzymem odfiltrována na fritě. Imobilizát byl třikrát promyt 100 ml 0,1M octanového pufru pH = 4,8 a filtráty byly jímány. Imobilizovaný enzym byl pak uchováván ve zkumavce spolu 20,0 ml 0,1M octanového pufru pH = 4,8.

Stejným způsobem pak byla oddělena směs imobilizátu a kapaliny u všech směsí.

4.19 Stanovení aktivity imobilizovaných enzymů

Do čtyř sérií po čtyřech zkumavkách bylo vždy napipetováno po 0,5 ml předem připravené směsi Somogyiho činidel I a II v poměru 4:1.

Do kádinky byl vždy převeden enzym imobilizovaný na nosiči i s 20,0 ml 0,1M octanového pufru pH 4,8 a bylo z ní odebráno 15,0 ml pufru.

Za stálého míchání míchadlem na magnetické míchačce bylo přidáno 5,0 ml roztoku substrátu o pH 4,8 a v časech $t = 0, 30, 60, 120$ minut bylo vždy odpipetováno 0,500 ml kapaliny do zkumavek s předpřipravenou směsí Somogyiho činidel.

Zkumavky byly 10 minut vařeny ve vodní lázni.

Po vychladnutí bylo přidáno 0,500 ml Nelsonova roztoku, 3,50 ml vody a obsah zkumavek byl promíchán.

Byla změřena absorbance roztoků při $\lambda = 530$ nm oproti roztoku, kde probíhala enzymová reakce po čas $t = 0$ min.

Stejným způsobem byla stanovena aktivita pro všechny enzymy imobilizované na různých nosičích.

4.20 Stanovení zbytkové aktivity v roztocích po imobilizaci

Pro zjištění, zda byl veškerý enzym v roztoku, ze kterého se měl vázat na nosič, byl po ukončení každé imobilizace jímán filtrát oddělený od supernatantu, ve kterém pak byla stanovována zbytková enzymová aktivita.

Do čtyř zkumavek vždy bylo napipetováno po 0,250 ml filtrátu a 0,250 ml roztoku substrátu. V čase $t = 0, 30, 60, 90$ minut bylo postupně přidáváno po 0,500 ml předpřipravené směsi Somogyiho činidel I a II v poměru 4:1 pro zastavení činnosti enzymu.

Obsah zkumavek byl 10 minut vařen ve vodní lázni.

Do každé zkumavky bylo přidáno 0,500 ml Nelsonova činidla a 3,50 ml vody a jejich obsah byl promíchán.

Byla změřena absorbance roztoků při vlnové délce $\lambda = 530$ nm proti obsahu zkumavky, kde probíhala enzymová reakce po dobu $t = 0$ min.

4.21 Stanovení operační stability imobilizovaného enzymu

Imobilizovaný enzym, který si po navázání zachovával nejvyšší aktivitu, byl připraven znovu a po ukončení imobilizace a promytí byl po dobu 30 dní uchováván ve tmě při teplotě 4°C . Po uplynutí 30 dní byla obdobně stanovena aktivita takového enzymového preparátu.

Do čtyř sérií po čtyřech zkumavkách bylo vždy napipetováno po 0,5 ml předem připravené směsi Somogyiho činidel I a II v poměru 4:1.

Do kádinky byl vždy převeden enzym imobilizovaný na nosiči i s 20,0 ml 0,1M octanového pufru pH = 4,8 a bylo z ní odebráno 15,0 ml pufru.

Za stálého míchání míchadlem na magnetické míchačce bylo přidáno 5,0 ml roztoku substrátu o pH 4,8 a v časech $t = 0, 30, 60, 120$ minut bylo vždy odpipetováno 0,500 ml kapaliny do zkumavek s předpřipravenou směsí Somogyiho činidel.

Zkumavky byly 10 minut vařeny ve vodní lázni.

Po vychladnutí bylo přidáno 0,500 ml Nelsonova roztoku, 3,50 ml vody a obsah zkumavek byl promíchán.

Byla změřena absorbance roztoků při $\lambda = 530$ nm oproti roztoku, kde probíhala enzymová reakce po čas $t = 0$ min.

4.22 Stanovení pH optima imobilizovaného enzymu

Tento postup byl opakován pro každý připravený roztok substrátu - 1% roztoky CMC o různém pH v rozmezí 3,6 - 5,6 v krocích po $\Delta\text{pH} = 0,4$.

Jako enzymatický preparát byl pro stanovení pH optima použit takový imobilizovaný preparát, který měl z předchozích měření naměřenou nejvyšší aktivitu, viz kapitola Výsledky a diskuze.

Do čtyř sérií po čtyřech zkumavkách bylo vždy napipetováno po 0,5 ml předem připravené směsi Somogyiho činidel I a II v poměru 4:1.

Do kádinky byl vždy převeden imobilizovaný enzym a za stálého míchání míchadlem na magnetické míchačce bylo přidáno 5,0 ml roztoku substrátu o určitém pH a v časech $t = 0, 30, 60, 120$ minut bylo vždy odpipetováno 0,500 ml kapaliny do zkumavek s předpřipravenou směsí Somogyiho činidel.

Zkumavky byly 10 minut vařeny ve vodní lázni.

Po vychladnutí bylo přidáno 0,500 ml Nelsonova roztoku, 3,50 ml vody a obsah zkumavek byl promíchán.

Byla změřena absorbance roztoků při $\lambda = 530$ nm oproti roztoku, kde probíhala enzymová reakce po čas $t = 0$ min.

4.23 Stanovení teplotního optima imobilizovaného enzymu

Tento postup byl opakován pro každou sérii měření o různé teplotě v rozmezí 25 - 70 °C v krocích po $\Delta T = 10$ °C na temperované třepačce.

Jako enzymatický preparát byl pro stanovení teplotního optima použit takový imobilizovaný preparát, který měl z předchozích měření naměřenou nejvyšší aktivitu, viz kapitola Výsledky a diskuze.

Do čtyř sérií po čtyřech zkumavkách bylo vždy napipetováno po 0,5 ml předem připravené směsi Somogyiho činidel I a II v poměru 4:1.

Do kádinky byl vždy převeden imobilizovaný enzym vytemperovaný na teplotu reakce a za stálého míchání míchadlem na magnetické míchačce bylo přidáno 5,0 ml roztoku substrátu o pH = 4,8, taktéž vytemperovaného na teplotu reakce a v časech $t = 0, 30, 60, 120$ minut bylo vždy odpipetováno 0,500 ml kapaliny do zkumavek s předpřipravenou směsí Somogyiho činidel.

Zkumavky byly 10 minut vařeny ve vodní lázni.

Po vychladnutí bylo přidáno 0,500 ml Nelsonova roztoku, 3,50 ml vody a obsah zkumavek byl promíchán.

Byla změřena absorbance roztoků při $\lambda = 530$ nm oproti roztoku, kde probíhala enzymová reakce po čas $t = 0$ min.

4.24 Stanovení tepelné stability

Tepelná stabilita byla stanovena temperací enzymových preparátů v roztoku 0,1M octanového pufru pH = 4,8 na teplotu v rozsahu 20 - 80 °C v krocích po 10 °C ve vodní lázni vždy po dobu jedné hodiny a následným volným ochlazením na laboratorní teplotu.

Do čtyř sérií po čtyřech zkumavkách bylo vždy napipetováno po 0,5 ml předem připravené směsi Somogyiho činidel I a II v poměru 4:1.

Posléze bylo k enzymovému preparátu přidáno po 5,0 ml roztoku substrátu CMC o pH = 4,8 a v časech $t = 0, 30, 60, 120$ minut bylo vždy odpipetováno 0,500 ml kapaliny do zkumavek s předpřipravenou směsí Somogyiho činidel.

Zkumavky byly 10 minut vařeny ve vodní lázni.

Po vychladnutí bylo přidáno 0,500 ml Nelsonova roztoku, 3,50 ml vody a obsah zkumavek byl promíchán.

Byla změřena absorbance roztoků při $\lambda = 530$ nm oproti roztoku, kde probíhala enzymová reakce po čas $t = 0$ min.

Stejný proces byl zopakován pro volný i imobilizovaný enzym.

4.25 Stanovení změny účinku

Vlastnosti enzymů se vlivem imobilizace mohou mnohdy měnit. To je nejčastěji způsobeno vlivem dvou faktorů – fyzikálními a chemickými vlastnostmi nosiče a konformačními změnami proteinu.

Působením enzymu na substrát se spolu se změnou chemického složení mění i viskozita.

Relativní pokles viskozity se vypočítá dle Schuberta: [4]

$$P\% = \frac{t - t_E}{t_0 - t_E} \cdot 100,$$

kde t je průtoková doba reakční směsi, t_E je průtoková doba vody a t_0 je průtoková doba substrátu s inaktivovaným enzymem.

Nejdříve byla změřena doba průtoku vody $t_E = 11,50$ s

Následně doba průtoku roztoku substrátu s enzymem inaktivovaným 10minutovým varem na vodní lázni $t_0 = 25,4$ s.

Pro měření poklesu viskozity roztoku substrátu vlivem volného enzymu byla připravena směs z 1 ml roztoku ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) volného enzymu a 20 ml roztoku substrátu, která byla rychle vlita do viskozimetru a byla změřena její doba průtoku. Tato doba je považována jako doba v čase reakce $t = 0$. V časových intervalech 5, 10 a 15 minut byla opětovně měřena doba průtoku směsi viskozimetrem. Paralelně byl opět prováděn důkaz redukujících skupin pro každý časový interval.

Pro měření poklesu viskozity roztoku substrátu vlivem imobilizovaného preparátu bylo postupováno tak, že do kádinky s 20 ml roztoku substrátu a byl vložen 1 g nosiče, na kterém bylo imobilizováno 0,3 mg enzymu. Směs byla promíchávána na magnetické míchače a v třicetiminutových intervalech byl odebírán supernatant ke změření doby jeho průtoku viskozimetrem, který byl po jejím změření navrácen do kádinky. Paralelně byl opět prováděn důkaz redukujících skupin pro každý časový interval.

Paralelně je nutno opět provádět důkaz redukujících skupin, pro přepočítání absorbance na procento rozštěpených glykosidických vazeb byl použit vzorec: [4]

$$x = \frac{A_{530} \cdot f}{102,012} \cdot 100,$$

kde x je procento rozštěpených vazeb, A_{530} je absorbance roztoku při 530 nm a f je přepočítávací faktor mezi koncentrací redukujících skupin v roztoku a naměřenou absorbancí.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V experimentální části práce byla odzkoušena imobilizace celulázového komplexu na nosič připravený z drti odpadního materiálu z PET lahví. Nejdříve byla provedena optimalizace množství navázaného enzymu na nosič s cílem získat preparát s nejvyšší relativní aktivitou v porovnání s volným enzymem.

Jako další nosič byl zvolen nosič Sorsilen, protože jedná se o stejný polymer, který se používá na výrobu PET lahví. Sorsilen je však prášek, má tedy menší velikost částic, čímž poskytuje větší povrch na imobilizaci enzymu. [36]

Jako další z možností byla provedena aktivace povrchu PET nosiče vybranými koncentracemi glutaraldehydu. Po imobilizaci vybraných množství enzymu na takový nosič byla opět stanovena aktivita získaných preparátů.

Aktivita jednotlivých imobilizovaných enzymů na výše zmíněné nosiče byly mezi sebou porovnány a byl vybrán imobilizát s nejvyšší relativní aktivitou. Pro tento preparát pak byla sledována stabilita při uchovávání při 4 °C, teplotní a pH optimum, stejně jako i tepelná stabilita.

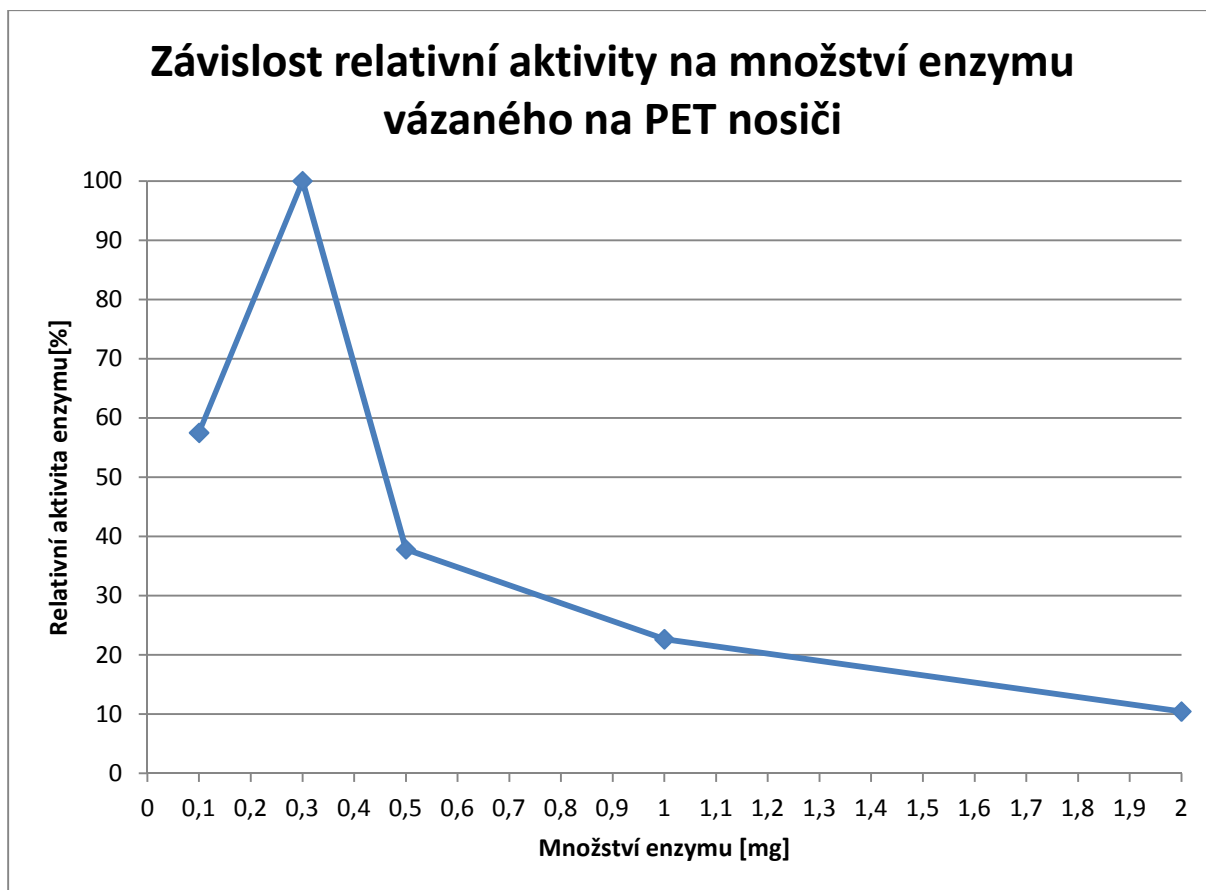
5.1 Imobilizace celulázového komplexu na PET nosič připravený z drti odpadního materiálu z PET lahví.

Pro imobilizaci celulázového komplexu byla zvolena různá množství enzymu, která byla navázána vždy na 1 g nosiče. Nejvyšší aktivitu vykazoval preparát s 0,3 mg enzymu na 1 g nosiče, výsledky shrnuje tabulka č. 8.

Tabulka č. 8 - Naměřené a vypočítané hodnoty aktivity enzymových preparátů imobilizovaných na PET nosič

Množství imobilizovaného enzymu [mg]	Aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Relativní aktivita enzymu [%]
0,1	0,00894	57,51
0,3	0,01555	100,00
0,5	0,00588	37,81
1,0	0,00352	22,66
2,0	0,00163	10,46

Dalším zvyšováním množství imobilizovaného enzymu na nosič se sice všechen enzym z roztoku na nosič vázal, ale již docházelo k výraznému poklesu aktivity, což lze názorně vidět na grafu č. 3.



Graf č. 3 – Závislost relativní aktivity na množství enzymu vázaného na PET nosiči

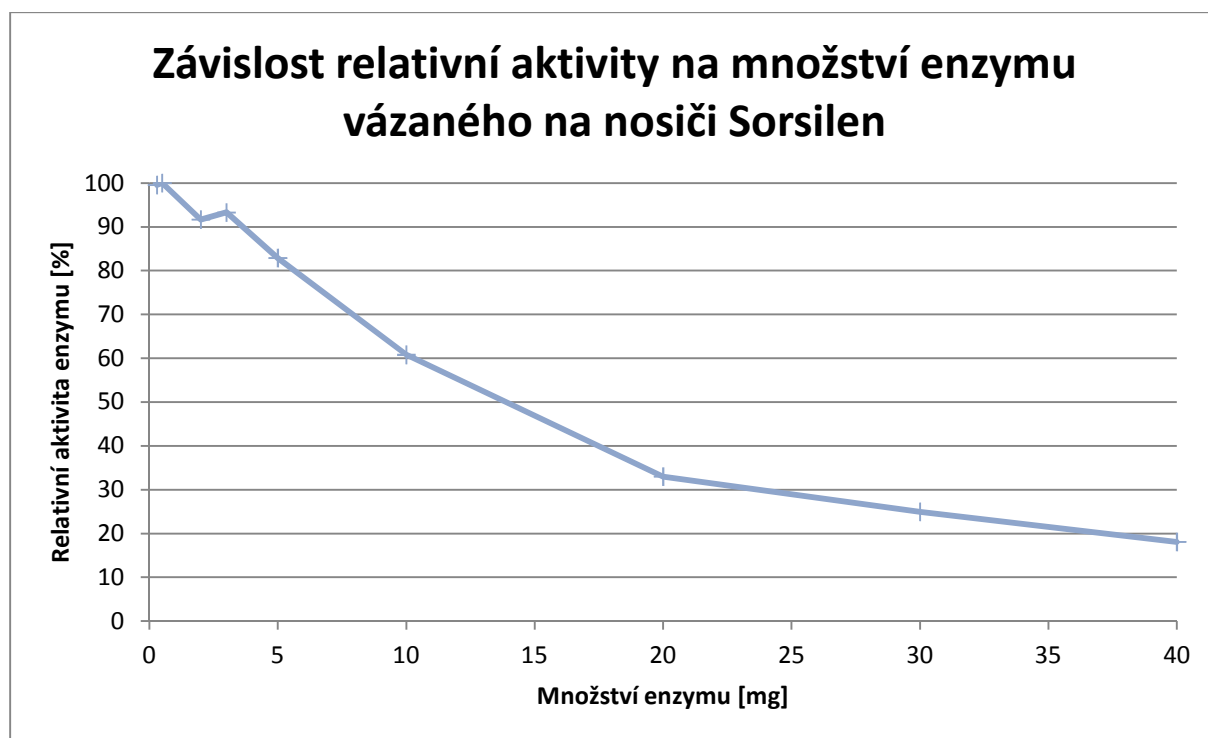
5.1.1 Imobilizace celulázového komplexu na nosič Sorsilen

Tak, jak již bylo výše zmíněno, tento nosič byl vybrán na základě předpokladu, že má větší povrch, což by mohlo pozitivně ovlivnit aktivitu navázaného enzymu. Na základě získaných výsledků, které jsou uvedeny v tabulce č. 9, všechny získané preparáty v rozmezí 0,3 – 5 mg na 1 g nosiče vykazovaly nižší aktivitu jako preparáty vázané na PET nosič, viz. tabulka č. 8.

Tabulka č. 9 - Naměřené a vypočítané hodnoty aktivity enzymových preparátů imobilizovaných na Sorsilen

Množství imobilizovaného enzymu [mg]	Aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Relativní aktivita enzymu [%]
0,3	0,00288	99,55
0,5	0,00289	100,00
2	0,00265	91,66
3	0,00270	93,30
5	0,00240	82,89
10	0,00176	60,80
20	0,00095	32,99
30	0,00072	24,97
40	0,00052	18,07

Z grafu č. 4 lze vidět, že zvětšení povrchu nosiče ovlivnilo množství navázaného enzymu, ovšem nedosáhlo se výrazného zvýšené aktivity imobilizovaného enzymu, viz. tabulka č. 9.



Graf č. 4 - Závislost relativní aktivity na množství enzymu vázaného na nosiči Sorsilen

Z grafu č. 4 a tabulky č. 9 vyplývá, že nejvyšší relativní aktivity dosahuje enzymový preparát připravený imobilizací 0,5 mg enzymu na 1 g nosiče Sorsilen. Ani v jednom případě nebyl zjištěn nenavázaný enzym v roztoku při imobilizaci.

5.2 Imobilizace celulózy a celulózy na PET nosič aktivovaný glutaraldehydem

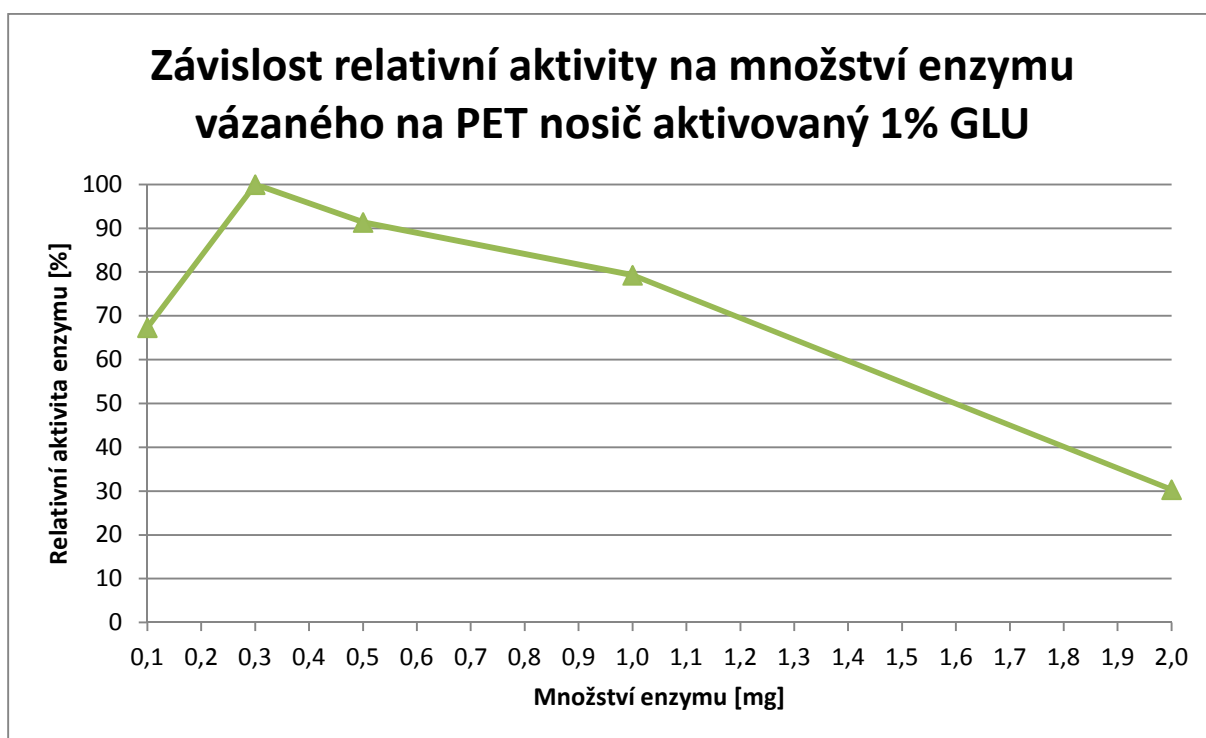
Na základě předcházejících výsledků byla zvolena úprava povrchu PET nosiče reakcí s vybranými koncentracemi glutaraldehydu. Na takto upravený nosič byla následně provedena imobilizace celulózy a celulózy.

5.2.1 Imobilizace na PET nosič aktivovaný 1% glutaraldehydem

Pro imobilizaci enzymu byl nejdříve PET nosič aktivován reakcí s 1% roztokem glutaraldehydu. Na takto upravený nosič byly posléze provedeny imobilizace jednotlivých množství enzymu na 1 g nosiče. Ze získaných výsledků, které jsou uvedeny v tabulce č. 10, vyplývá, že nejvyšší aktivitu si uchoval preparát, který obsahoval 0,3 mg enzymu na 1 g takového nosiče.

Tabulka č. 10 - Naměřené a vypočítané hodnoty aktivity enzymových preparátů imobilizovaných na PET nosič aktivovaný 1% roztokem glutaraldehydu

Množství imobilizovaného enzymu [mg]	Aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Relativní aktivita enzymu [%]
0,1	0,00275	67,31
0,3	0,00409	100,00
0,5	0,00373	91,34
1,0	0,00324	79,28
2,0	0,00124	30,33



Graf č. 5 – Závislost relativní aktivity na množství enzymu vázaného na PET nosič aktivovaný 1% roztokem glutaraldehydu

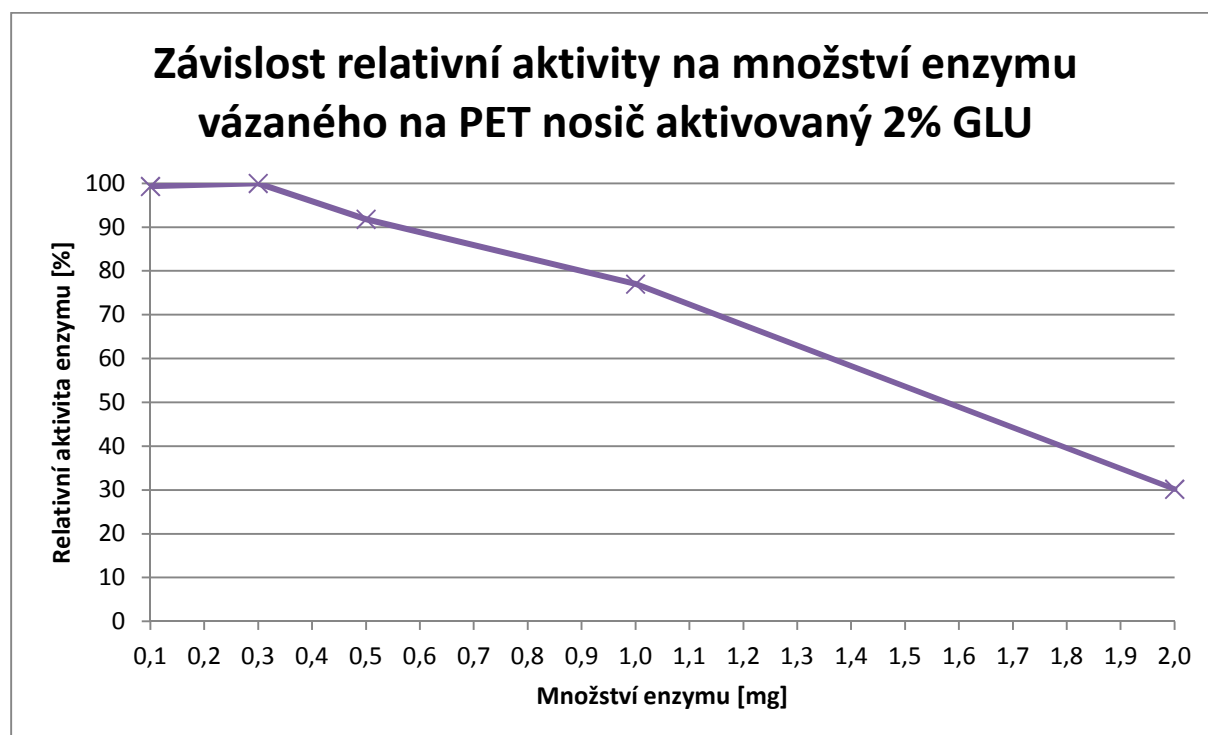
Z grafu č. 5 vyplývá, že nejvyšší relativní aktivity vykazuje enzymový preparát připravený imobilizací 0,3 mg enzymu na 1 g PET nosiče aktivovaného 1% roztokem glutaraldehydu. S dalším zvyšováním množství enzymu docházelo k vázání celého množství, avšak aktivita takto připravených preparátů již klesala.

5.2.2 Imobilizace na PET nosič aktivovaný 2% glutaraldehydem

Pro imobilizaci enzymu byl nejdříve PET nosič aktivován reakcí s 2% roztokem glutaraldehydu. Na takto upravený nosič byly posléze provedeny imobilizace jednotlivých množství enzymu na 1 g nosiče. Ze získaných výsledků, které jsou uvedeny v tabulce č. 11, vyplývá, že nejvyšší aktivitu si uchoval opět preparát, který obsahoval 0,3 mg enzymu na 1 g takového nosiče.

Tabulka č. 11 - Naměřené a vypočítané hodnoty aktivity enzymových preparátů imobilizovaných na PET nosič aktivovaný 2% roztokem glutaraldehydu

Množství imobilizovaného enzymu [mg]	Aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Relativní aktivita enzymu [%]
0,1	0,00437	99,30
0,3	0,00440	100,00
0,5	0,00404	91,82
1,0	0,00339	77,00
2,0	0,00133	30,19



Graf č. 6 - Závislost relativní aktivity na množství enzymu vázaného na PET nosič aktivovaný 2% roztokem glutaraldehydu

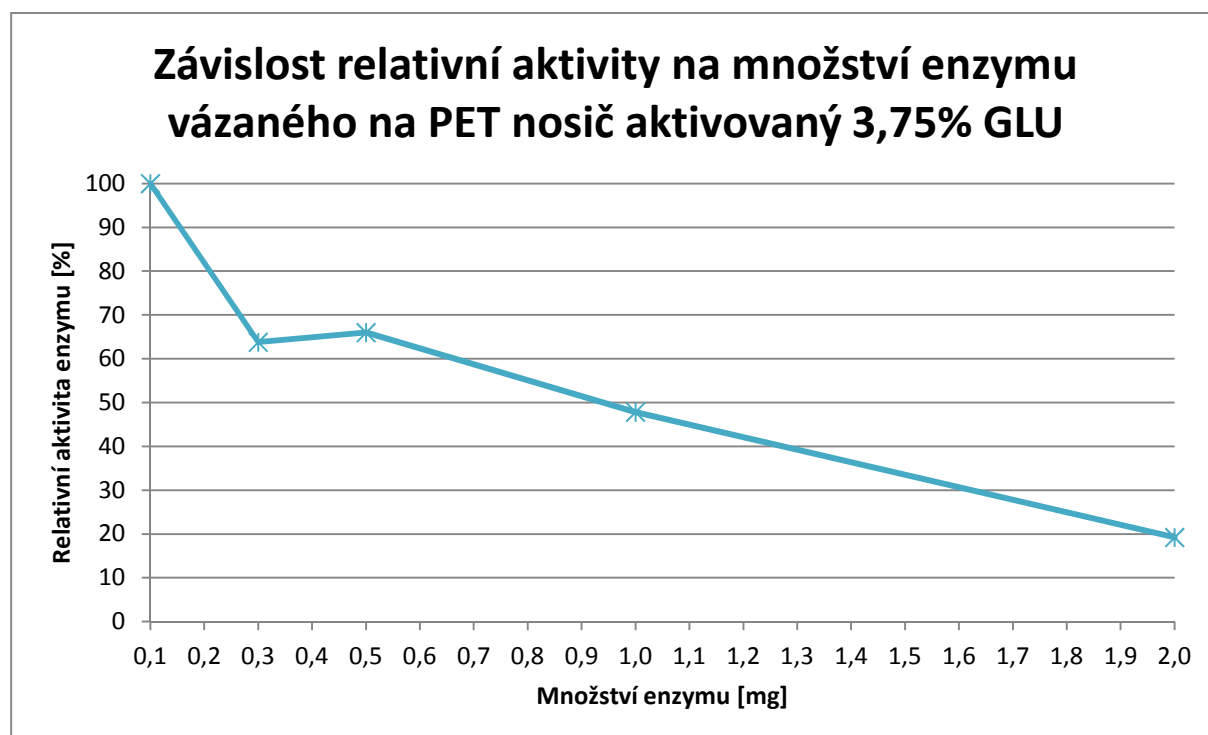
Z grafu č. 6 vyplývá, že nejvyšší relativní aktivity dosahuje enzymový preparát připravený imobilizací 0,1 mg enzymu na 1 g PET nosiče aktivovaného 2% roztokem glutaraldehydu. S dalším zvyšováním množství enzymu sice docházelo k vázání celého množství, avšak aktivita takto připravených preparátů již klesala.

5.2.3 Imobilizace na PET nosič aktivovaný 3,75% glutaraldehydem

Pro imobilizaci enzymu byl nejdříve PET nosič aktivován reakcí s 3,75% roztokem glutaraldehydu. Na takto upravený nosič byly posléze provedeny imobilizace jednotlivých množství enzymu na 1 g nosiče. Ze získaných výsledků, které jsou uvedeny v tabulce č. 12, vyplývá, že nejvyšší aktivitu si uchoval preparát, který obsahoval už jen 0,1 mg enzymu na 1 g takového nosiče. Tento imobilizát ovšem vykazoval nejvyšší aktivitu v porovnání s předcházejícími imobilizáty, viz. tabulka č. 10 a č. 11.

Tabulka č. 12 - Naměřené a vypočítané hodnoty aktivity enzymových preparátů imobilizovaných na PET nosič aktivovaný 3,75% roztokem glutaraldehydu

Množství imobilizovaného enzymu [mg]	Aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Relativní aktivita enzymu [%]
0,1	0,00755	100,00
0,3	0,00481	63,80
0,5	0,00498	66,00
1,0	0,00361	47,82
2,0	0,00145	19,22



Graf č. 7 - Závislost aktivity enzymu jeho množství vázaném na PET nosiči aktivovaném 3,75% roztokem glutaraldehydu

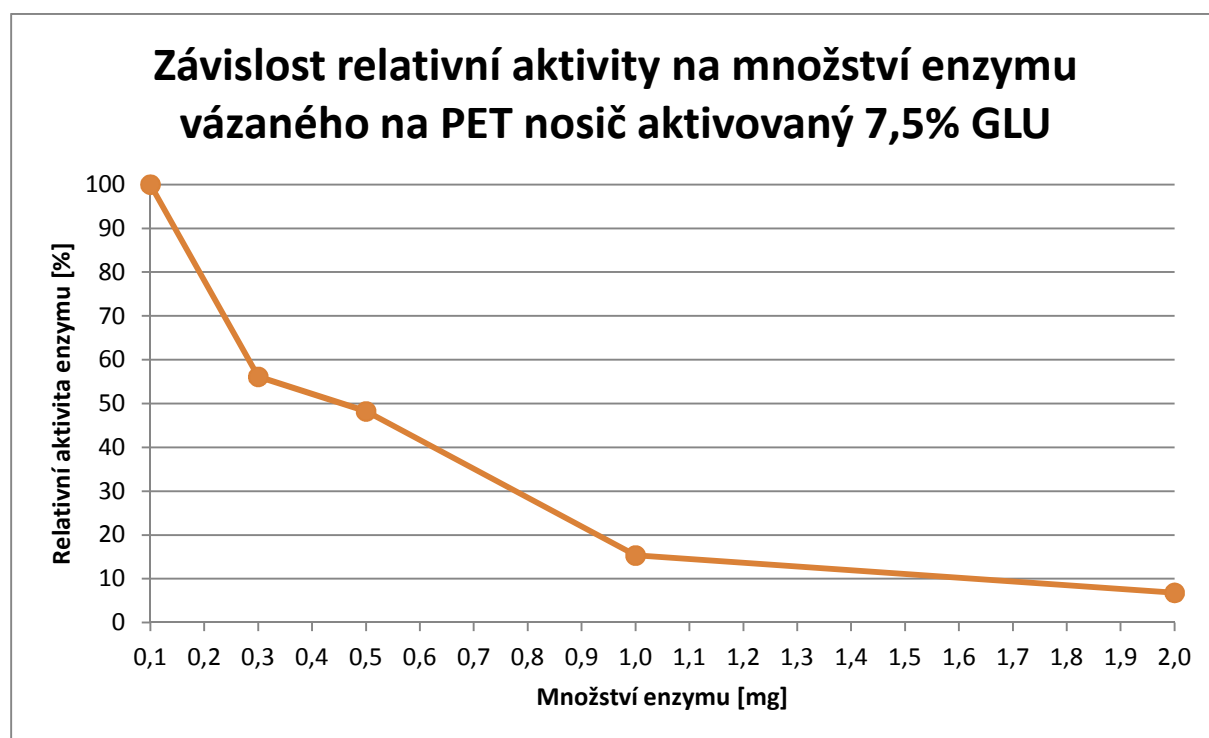
Z grafu č. 7 vyplývá, že nejvyšší relativní aktivity dosahuje enzymový preparát připravený imobilizací 0,1 mg enzymu na 1 g PET nosiče aktivovaného 3,75% glutaraldehydem. S dalším zvyšováním množství enzymu sice docházelo k vázání celého množství, avšak aktivita takto připravených preparátů již klesala.

5.2.4 Imobilizace na PET nosič aktivovaný 7,5% glutaraldehydem

Pro imobilizaci enzymu byl nejdříve PET nosič aktivován reakcí s 7,5% roztokem glutaraldehydu. Na takto upravený nosič byly posléze provedeny imobilizace jednotlivých množství enzymu na 1 g nosiče. Ze získaných výsledků, které jsou uvedeny v tabulce č. 13, vyplývá, že získané imobilizáty na takto aktivovaný nosič vykazovaly nejnižší aktivitu v porovnání s předcházejícími preparáty, viz. tabulky č. 10 – 12.

Tabulka č. 13 - Naměřené a vypočítané hodnoty aktivity enzymových preparátů imobilizovaných na PET nosič aktivovaný 7,5% roztokem glutaraldehydu

Množství imobilizovaného enzymu [mg]	Aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Relativní aktivita enzymu [%]
0,1	0,00152	100,00
0,3	0,00085	56,11
0,5	0,00073	48,22
1,0	0,00023	15,33
2,0	0,00010	6,81



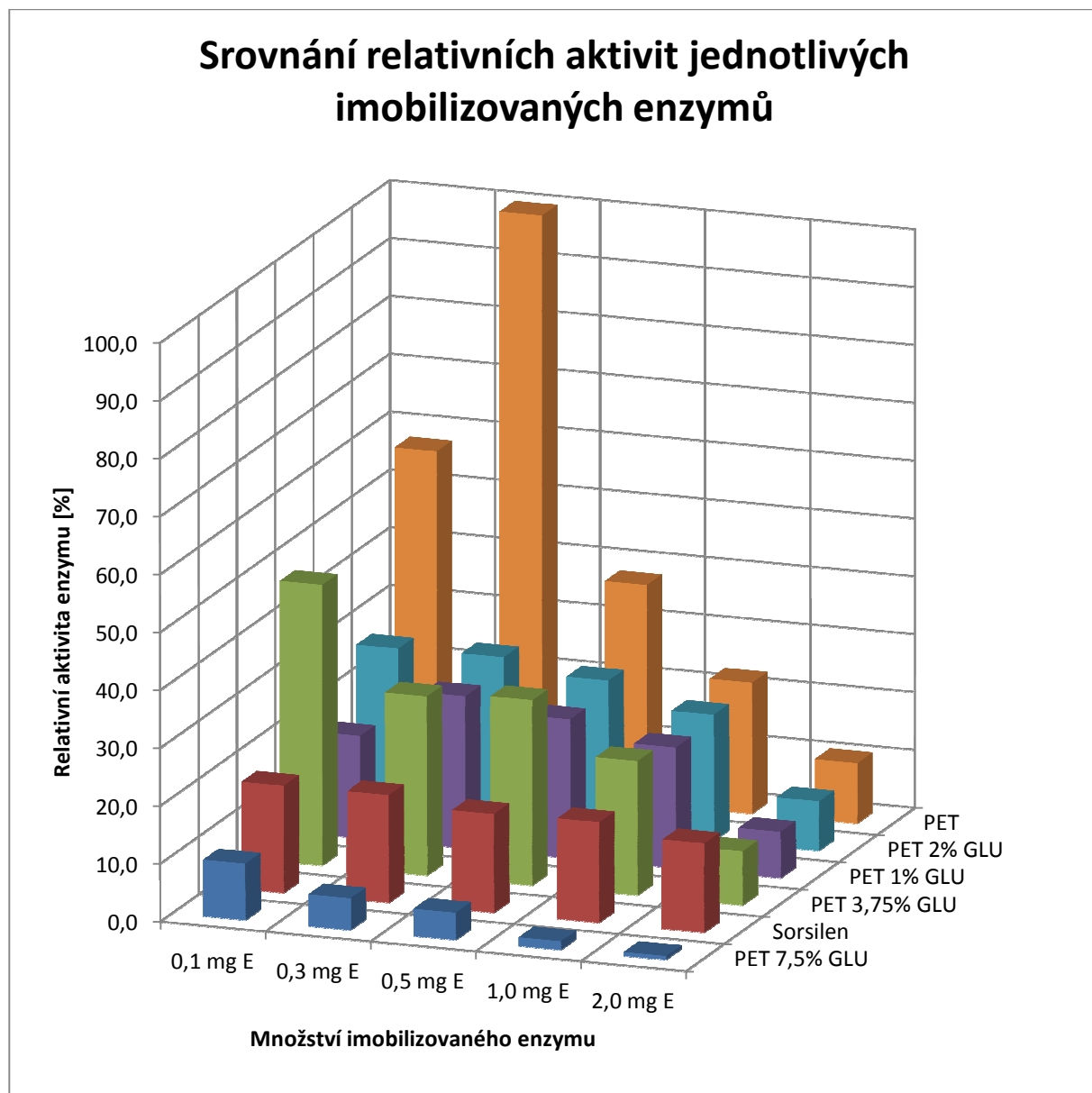
Graf č. 8 - Závislost aktivity enzymu jeho množství vázaném na PET nosiči aktivovaném 7,5% roztokem glutaraldehydu

Z grafu č. 8 vyplývá, že nejvyšší relativní aktivity dosahuje enzymový preparát připravený imobilizací 0,1 mg enzymu na 1 g takového nosiče. S dalším zvyšováním množství enzymu sice docházelo k vázání celého množství, avšak aktivita takto připravených preparátů již výrazně klesala.

5.3 Srovnání aktivit jednotlivých imobilizátů na všech použitých nosičích

Přestože hodnoty relativní aktivity dosahují v jednotlivých případech vysokých hodnot, ve srovnání s aktivitou volného enzymového celulólytického komplexu – $0,8620 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ – jsou jejich zdánlivé hodnoty aktivity velmi nízké vlivem ztráty aktivity při imobilizaci.

Srovnání aktivit jednotlivých imobilizovaných enzymů zobrazuje graf č. 9.



Graf č. 9 – Srovnání relativních aktivit imobilizovaných enzymů

Z grafu č. 9 lze vidět, že nejvyšší relativní aktivitu vykazuje imobilizovaný preparát na PET nosiči při koncentraci 0,3 mg enzymu na 1 g nosiče.

Imobilizací enzymu na nosič s větším povrchem, co je nosič Sorsilen, byl získán preparát jen okolo 15 % relativní aktivity.

Po úpravě povrchu PET nosiče roztokem glutaraldehydu v rozmezí koncentrací 1 – 7,5 %, byl získán preparát s relativní aktivitou maximálně 45 % a to jen v jednom případě. Jednalo se o imobilizát obsahující 0,1 mg enzymu na 1 g PET nosiče upraveného reakcí s 3,75% roztokem glutaraldehydu.

Ze získaných výsledků vyplývá, že použití nosiče Sorsilen s větším povrchem nemělo pozitivní vliv na aktivitu imobilizovaného celulózy komplexu a ani úprava povrchu PET nosiče pomocí různých koncentrací glutaraldehydu neovlivnila pozitivně jeho aktivitu.

Pro další experimenty a srovnávání s volným enzymem byl proto vybrán imobilizovaný enzym, který si zachoval nejvyšší aktivitu - připravený imobilizací 0,3 mg enzymu na 1 g PET nosiče.

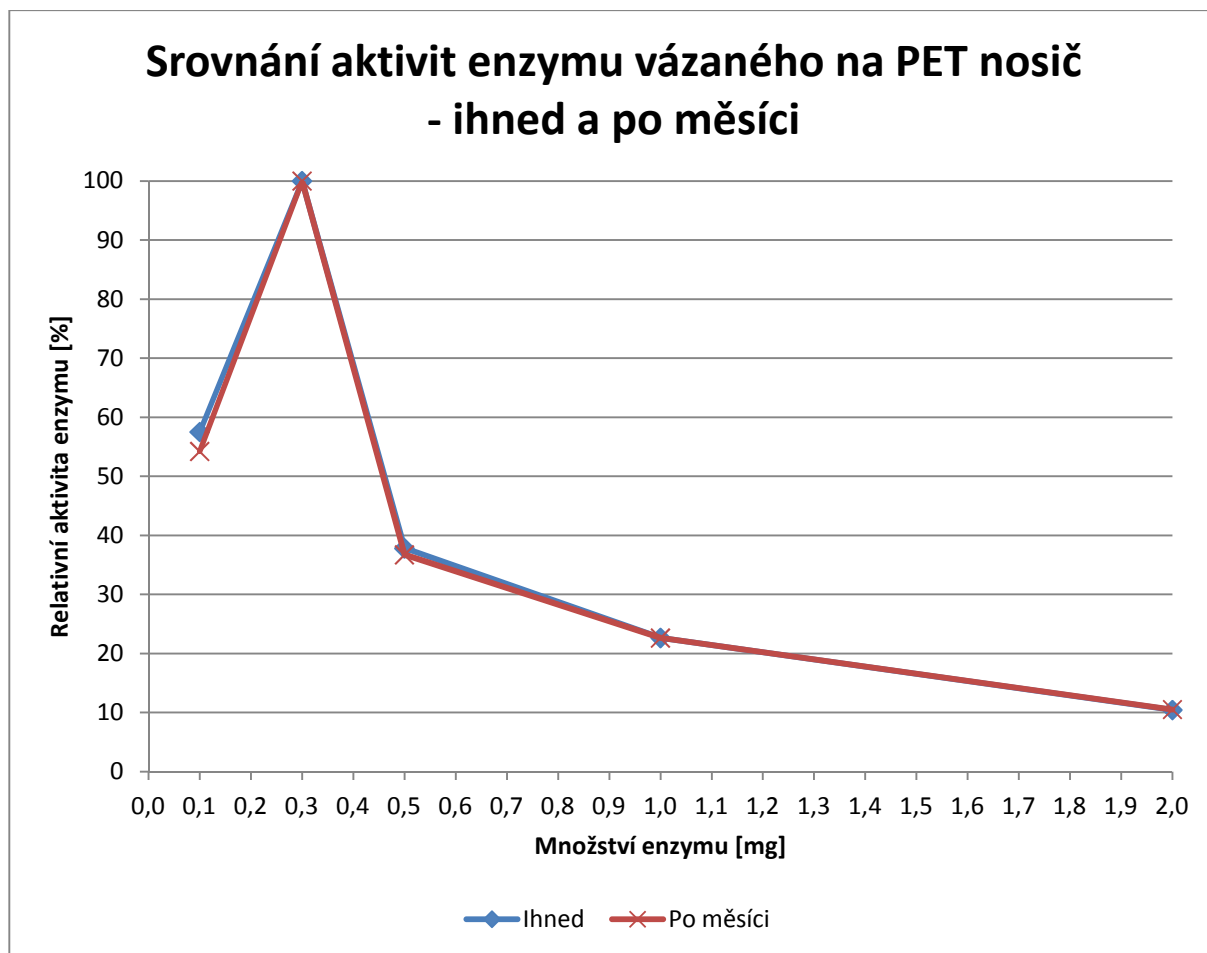
5.4 Operační stabilita enzymu imobilizovaného na PET nosiči

Pro stanovení stability připraveného imobilizovaného preparátu byla při enzymové reakci sledována aktivita imobilizovaných enzymových preparátů ihned po jejich vytvoření a následně po měsíčním uchovávání v pufru v lednici při teplotě 4 °C.

Výsledky shrnuje tabulka č. 14 a graf č. 10

Tabulka č. 14 - Naměřené a vypočítané hodnoty aktivity enzymových preparátů imobilizovaných na aktivovanou PET drť po 1 měsíci při teplotě 4 °C

Množství imobilizovaného enzymu [mg]	Aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Relativní aktivita enzymu [%]
0,1	0,00841	54,22
0,3	0,01550	100,00
0,5	0,00569	36,72
1,0	0,00351	22,63
2,0	0,00163	10,53



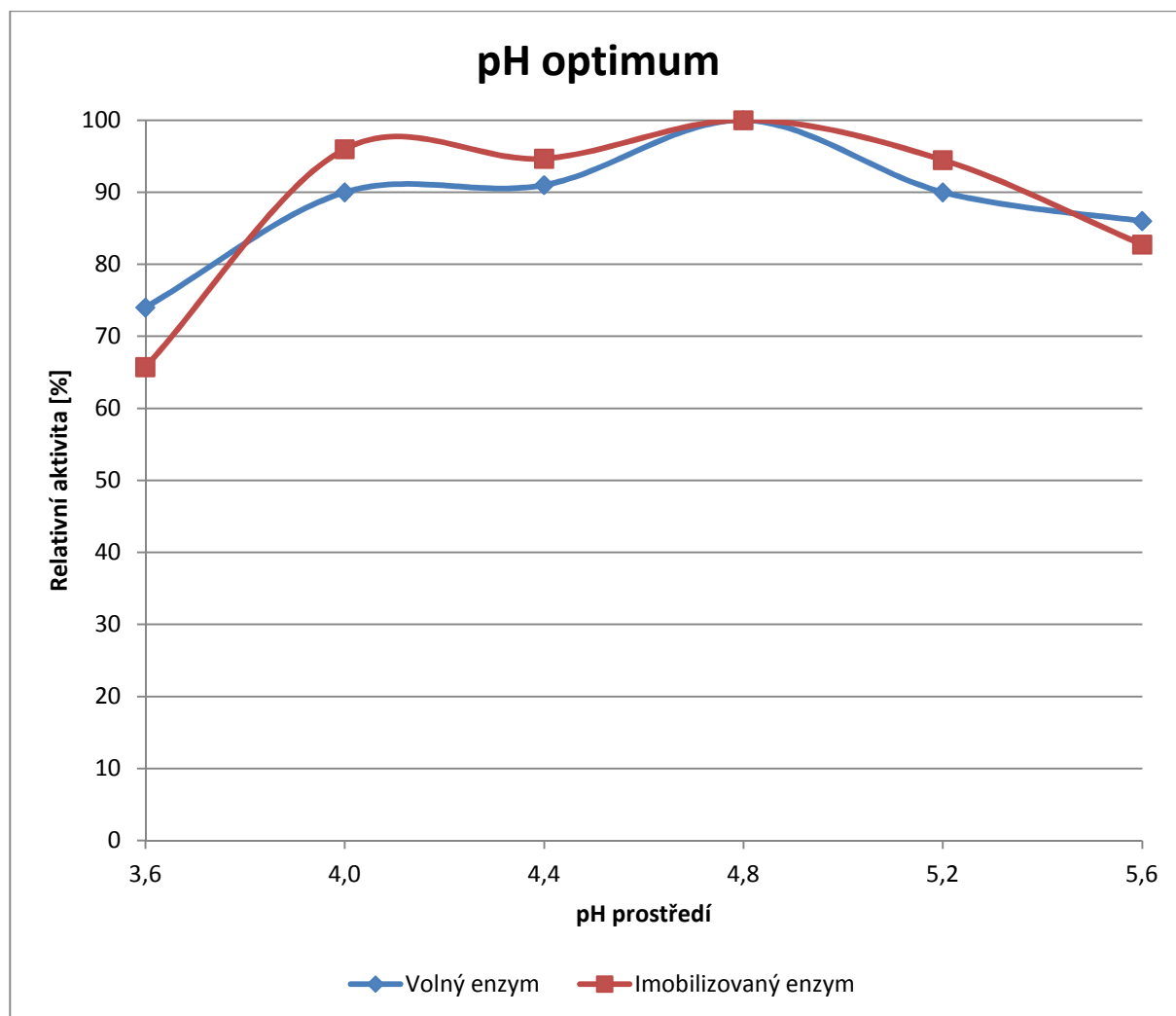
Graf č. 10 - Srovnání aktivit enzymu vázaného na PET nosič ihned a po měsíci při 4 °C

Z grafu č. 10 vyplývá, že vlivem uchování imobilizovaného enzymového preparátu při 4 °C po dobu jednoho měsíce nedochází k uvolňování enzymu z nosiče ani ke snížení aktivity takového preparátu. Interakce mezi nosičem a enzymem je tedy natolik stabilní i silná, že je možné připravené imobilizáty v chladu uchovávat po relativně dlouhou dobu.

5.5 pH optimum enzymu imobilizovaného na PET nosiči

Pro stanovení pH optima byla sledována aktivita volného enzymu a 0,3 mg enzymu imobilizovaného na 1 g nosiče z PET drti při reakci s 1% roztokem CMC o pH v rozmezí 3,6 - 5,6.

Srovnání relativních aktivit při různých pH shrnuje graf č. 11



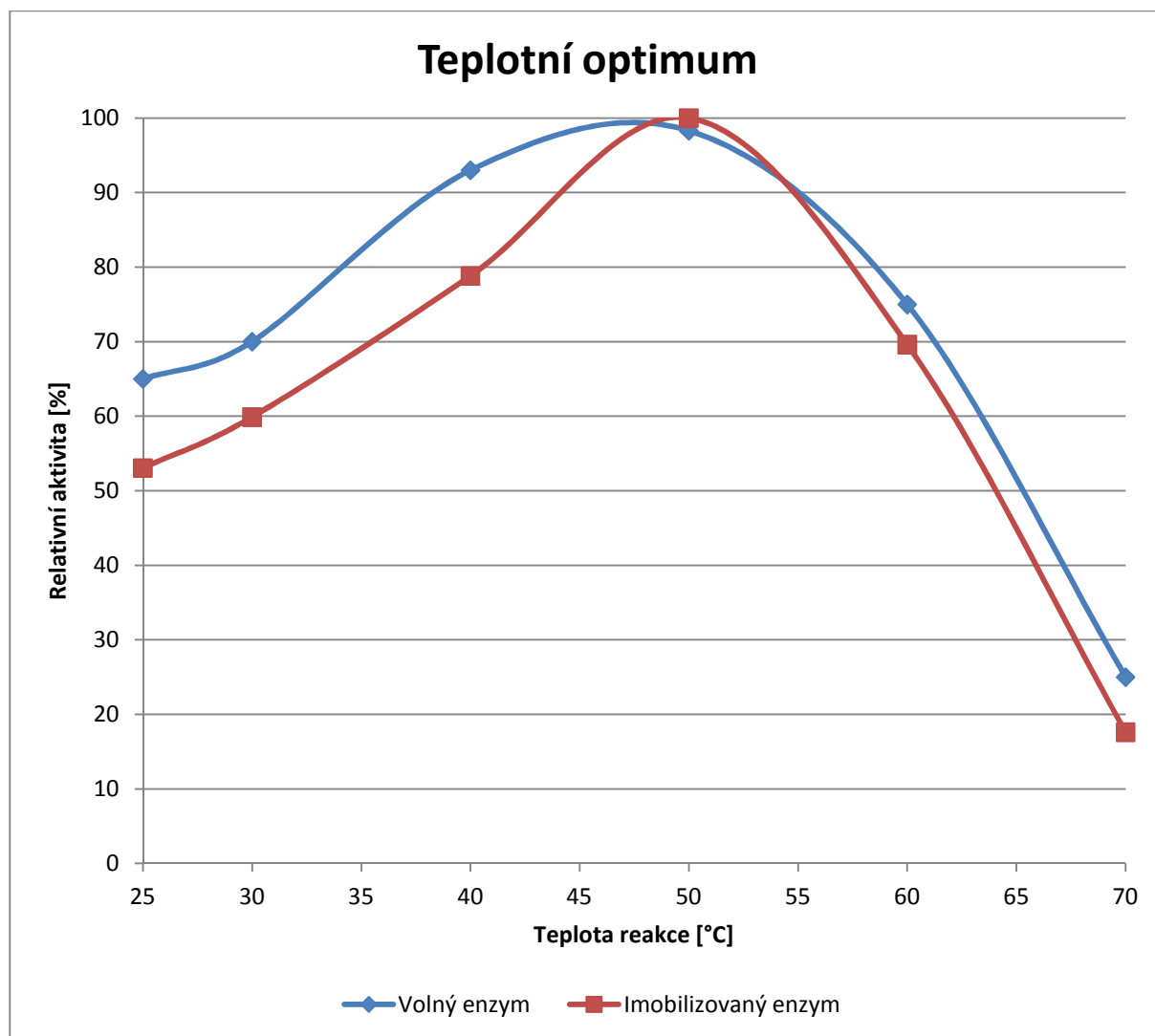
Graf č. 11 - pH optimum

Z grafu č. 11 je patrné, že nejvyšší aktivity dosahuje imobilizovaný enzym, stejně jako volný enzym, při reakci v prostředí pH 4,8 a mírnou změnou pH se aktivita v obou případech mění jen málo. Imobilizací na PET nosič se tedy pH optimum celulózy téměř nemění.

5.6 Teplotní optimum optimalizovaného imobilizovaného preparátu

Pro stanovení pH optima byla sledována aktivita 0,3 mg enzymu imobilizovaného na 1 g PET nosiče při reakci s 1% roztokem CMC o pH 4,8 při teplotách v rozmezí 25-70 °C.

Srovnání relativních aktivit při různých teplotách shrnuje graf č. 12



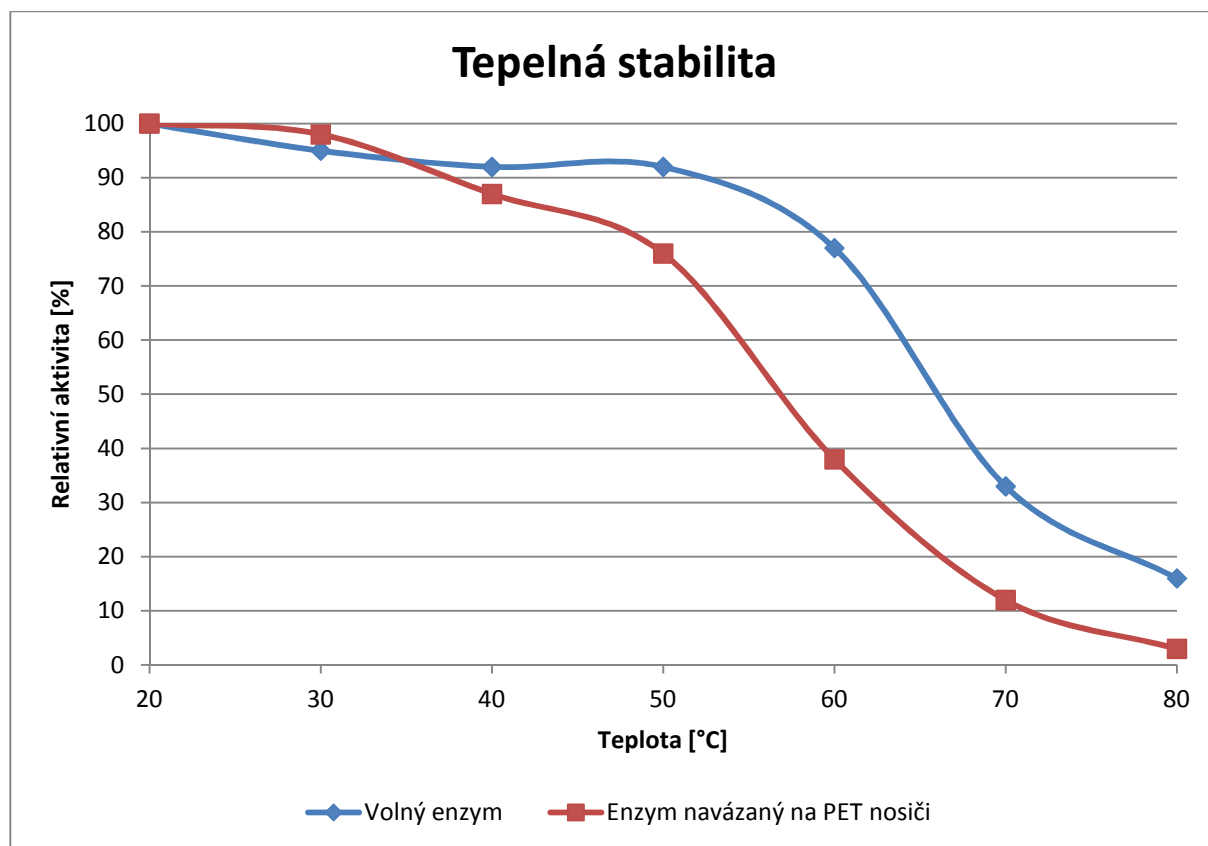
Graf č. 12 - Vliv teploty reakce na relativní aktivitu optimalizovaného imobilizovaného enzymu

Z grafu je patrné, že nejvyšší aktivity dosahuje enzymový preparát připravený imobilizací 0,3 mg enzymu na 1 g PET nosiče při reakci se substrátem při teplotě kolem 50 °C. Se zvyšující se teplotou od teploty laboratorní rosta až do tohoto bodu relativní aktivita tohoto enzymového preparátu. Dalším zvyšováním teploty již dochází k výraznému poklesu aktivity.

5.7 Tepelná stabilita enzymu

Pro stanovení tepelné stability byla sledována aktivita volného enzymu a 0,3 mg enzymu vázaného na PET nosiči po hodinové temperaci na teploty v rozmezí 20 - 80 °C a následném vychladnutí.

Výsledky shrnuje graf č. 13.



Graf č. 13 - Tepelná stabilita

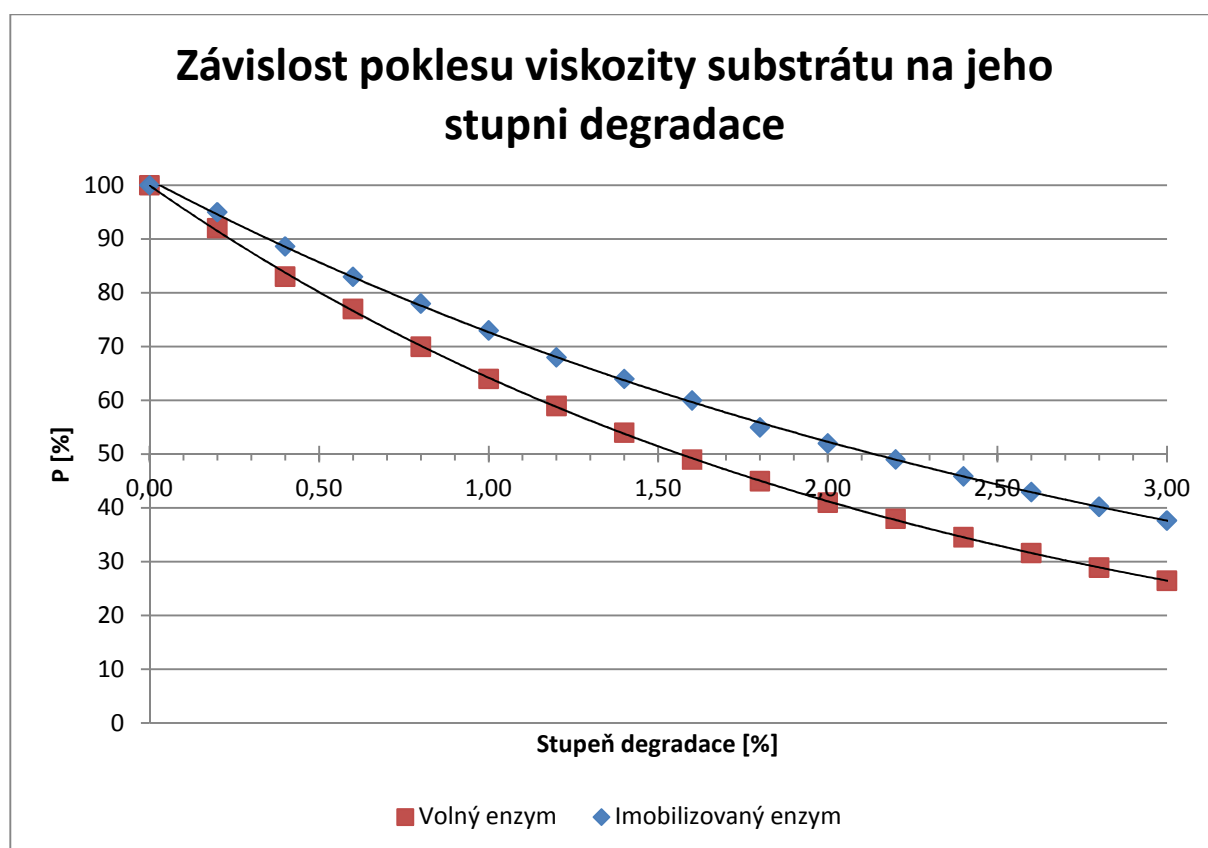
Z grafu č. 13 vyplývá, že vlivem imobilizace nedochází k pozitivní změně tepelné stability enzymu. Při nižších teplotách se aktivita příliš nemění, se zvyšující se teplotou dochází v obou případech ke znatelnému snížení aktivity, v případě imobilizovaného enzymu je pokles ještě výraznější než v případě volného.

5.8 Změna účinku

Z experimentů, ve kterých byl sledován pokles viskozity jako funkce stupně degradace substrátového roztoku v procentech, lze vysvětlit, že náhodné štěpení vnitřních glykosidických vazeb polymerního substrátu se vlivem imobilizace vůči volnému enzymu částečně mění.

Byla měřena doba průtoku směsi degradovaného substrátu Ubbelohdeho viskozimetrem. Každé měření bylo provedeno třikrát a výsledky zprůměrovány.

Výsledky shrnuje graf č. 14.



Graf č. 14: Vliv degradace polymerního substrátu volným a imobilizovaným enzymem na pokles viskozity roztoku

Z grafu č. 14 je patrné, že vlivem imobilizace nedochází k výrazné změně způsobu účinku celulózy na polymerní substrát.

U volného enzymu bylo zjištěno, že 50% pokles viskozity nastává při rozštěpení asi 1,6 % glykosidických vazeb.

Podobně u imobilizovaného preparátu dochází k 50% poklesu viskozity při rozštěpení asi 2,1 % glykosidických vazeb, což není výrazná změna.

6 ZÁVĚR

Úlohou této diplomové práce bylo prozkoumat vliv množství komerčního celulólytického enzymatického komplexu imobilizovaného sorpceí na nosič z polyethyltereftalátu na jeho enzymovou aktivitu. Nosiče byly použity tři – PET nosič z odpadních PET lahví dle patentu VUT, dále komerční preparát Sorsilen a také PET nosič z odpadních PET lahví dle patentu VUT, jehož povrch a také vzdálenost enzymu od nosiče byla upravena reakcí se čtyřmi různými koncentracemi glutaraldehydu.

Bylo zjištěno, že všechny použité nosiče mají dostatečnou sorpční kapacitu a jsou schopny na jeden gram své hmotnosti navázat minimálně 2 mg enzymu v případě nosičů z odpadních PET lahví a minimálně 40 mg enzymu v případě nosiče Sorsilen a to ve všech případech beze zbytku aktivity v roztoku, ze kterého byla imobilizace provedena.

Při imobilizaci zvyšujícího se množství komerčního celulólytického enzymového komplexu však docházelo k výraznému poklesu aktivity takto připraveného enzymového preparátu.

Nejvyšší aktivitu z imobilizovaných preparátů vykazoval ten, který byl připraven imobilizací 0,3 mg celulólytického enzymového komplexu na 1 g PET nosiče. Při imobilizaci stejného množství na jiný typ nosiče docházelo k výraznému poklesu aktivity, rovněž jako při zvýšení imobilizovaného množství. Proto byl tento nosič s navázaným množstvím 0,3 mg enzymu vybrán jako optimální pro další sledování vlastností daného celulólytického komplexu a stanovení základních charakteristik.

Takto imobilizovaný celulólytický enzymový preparát dobře snáší uchovávání při 4 °C po dobu 1 měsíce, během této doby nedošlo ke snížení aktivity.

Vliv pH prostředí se imobilizací enzymu na PET nosič téměř nemění a pH optimum imobilizovaného i volného enzymu bylo stejné při pH 4,8.

Tepelná stabilita enzymu se imobilizací snižuje, již při teplotách nad 30 °C. Nosič tedy není schopen imobilizací chránit enzymový protein před denaturací, jelikož dochází pouze k adsorpci enzymu na nosič.

Se zvyšující se teplotou reakce stoupá i enzymová aktivita imobilizátu, avšak teplotní optimum enzymu se imobilizací nemění a pro volný i imobilizovaný celulólytický komplex je při teplotě kolem 50 °C.

Z experimentů, kde byl sledován pokles viskozity roztoku substrátu jako funkce procenta rozštěpených glykosidických vazeb, vyplývá, že vlivem imobilizace se výrazně nemění způsob účinku enzymu.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KLEMM, Dieter, Brigitte HEUBLEIN, Hans-Peter FINK a Andreas BOHN. 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 44(22): 3358-3393 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1002/anie.200460587. ISSN 1433-7851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200460587>
- [2] CIOLACU, Diana, Florin CIOLACU a Valentin POPA. 2011. Amorphous Cellulose - Structure And Characterisation. *Cellulose chemistry and technology* [online]. 45(1-2): 13-21 [cit. 2015-04-04]. ISSN 0576-9787. Dostupné z: [http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT1-2\(2011\)/p.13-21.pdf](http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT1-2(2011)/p.13-21.pdf)
- [3] WILSON, David B a Xuân Nam PHẠM. 2009. Cellulases and biofuels: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 20(3): 295-299 [cit. 2015-03-21]. DOI: 10.1016/j.copbio.2009.05.007. ISSN 09581669. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166909000676>
- [4] SHELDON, Roger A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis* [online]. 2007-04-06, roč. 349, č. 8-9, s. 1289-1307 [cit. 2015-04-15]. ISSN 16154150. DOI: 10.1002/adsc.200700082. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adsc.200700082>
- [5] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [6] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie I: Živé systémy, jejich složení a organisace. Biopolymery - základ živých systémů. Obdivuhodné katalysátory - enzymy*. 1. vyd. Praha: Academia, 1992, 180 s. ISBN 80-200-0439-4.
- [7] KUHAD, Ramesh Chander, Rishi GUPTA a Ajay SINGH. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* [online]. 2011, vol. 2011, s. 1-10 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.4061/2011/280696. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/er/2011/280696/>
- [8] JUTURU, Veeresh a Jin Chuan WU. 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 33: 188-203 [cit. 2015-04-04]. DOI: 10.1016/j.rser.2014.01.077. ISSN 13640321. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114000999>
- [9] OGEDA, Thais L., Igor B. SILVA, Ludmila C. FIDALE, Omar A. EL SEOUD a Denise F.S. PETRI. Effect of cellulose physical characteristics, especially the water sorption value, on the efficiency of its hydrolysis catalyzed by free or immobilized cellulase. *Journal of Biotechnology* [online]. 2012, vol. 157, issue 1, s. 246-252 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.11.018.

- Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165611006523>
- [10] WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. 2015. *Cellulase - Worthington Enzyme Manual* [online]. [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.worthington-biochem.com/cel/default.html>
- [11] Information on EC 3.2.1.4 - cellulase. 2015. *Enzyme Database - BRENDA* [online]. [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.2.1.4>
- [12] SUKUMARAN, Rajeev K., Reeta Rani SINGHANIA a Ashok PANDEY. Microbial cellulases - Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research* [online]. 2005, vol. 64, s. 832-844 [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5375>
- [13] BHAT, M.K. a S. BHAT. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances* [online]. 1997, vol. 15, 3-4, s. 583-620 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1016/S0734-9750(97)00006-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975097000062>
- [14] WOODWARD, Jonathan. Immobilized cellulases for cellulose utilization. *Journal of Biotechnology* [online]. 1989, vol. 11, issue 4, s. 299-311 [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168165689900151>
- [15] SCHAECHTER, Moselio (ed.). 2009. *Encyclopedia of Microbiology* [online]. 3., ilustrované vydání, dotisk. Academic Press [cit. 2015-04-15]. ISBN 978-0-12-373944-5. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=rLhdW5YzuO4C>
- [16] BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* [online]. 2000, vol. 18, issue 5, s. 355-383 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00041-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975000000410>
- [17] PAZARLIOĞLU, Nurdan Kaşıkara, Merih SARIİŞİK a Azmi TELEFONCU. 2005. Treating denim fabrics with immobilized commercial cellulases. *Process Biochemistry* [online]. 40(2): 767-771 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.02.003. ISSN 13595113. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959204000779>
- [18] DATTA, Sumitra, L. Rene CHRISTENA a Yamuna Rani Sriramulu RAJARAM. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* [online]. 3(1): 1-9 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1007/s13205-012-0071-7. ISSN 2190-572x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-012-0071-7>
- [19] MUBARAK, N.M., J.R. WONG, K.W. TAN, J.N. SAHU, E.C. ABDULLAH, N.S. JAYAKUMAR a P. GANESAN. 2014. Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes. *Journal of Molecular*

- Catalysis B: Enzymatic* [online]. 107: 124-131 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.06.002. ISSN 13811177.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117714001751>
- [20] GEMEINER, Peter. *Enzymové inžinierstvo*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvá Alfa, 1987, 268 s. ISBN 063-041-87.
- [21] CAO, Linqiu. *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, 563 s. [cit. 2015-04-15]. ISBN 35-273-1232-3.
Dostupné z:
http://books.google.cz/books?id=h_78o7-OhrQC&lpq=PP1&hl=cs&pg=PP1#v=onepage&q&f=false.
- [22] OMELKOVÁ, Jiřina. *Príprava endopolygalakturonázy bioafinitnou chromatografiou, jej imobilizácia a charakterizácia*. Bratislava: Slovenská akadémia vied, Centrum chemického výskumu, Chemický ústav, 1986. 180 s. Kandidátská disertačná práca.
- [23] KHOSHNEVISAN, Kamyar, Abdol-Khalegh BORDBAR, Davood ZARE, Dariush DAVOODI, Masumeh NORUZI, Mohammad BARKHI a Meisam TABATABAEI. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2011, vol. 171, issue 2, s. 669-673 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1016/j.cej.2011.04.039.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894711005109>
- [24] HUNG, Tien-Chieh, Chun-Chong FU, Chia-Hung SU, Jing-Yi CHEN, Wen-Teng WU a Yu-Sheng LIN. Immobilization of cellulase onto electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofibrous membranes and its application to the reducing sugar production from microalgae. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2011, vol. 49, issue 1, s. 30-37 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2011.04.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022911000706>
- [25] WU, L, X YUAN a J SHENG. Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning. *Journal of Membrane Science* [online]. 2005-03-15, vol. 250, 1-2, s. 167-173 [cit. 2015-04-30]. DOI: 10.1016/j.memsci.2004.10.024.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738804007215>
- [26] TRAN, Quoc Viet, Phuoc Minh NGUYEN a Thi Anh Dao DONG. Immobilization of cellulase enzyme in calcium alginate gel and its immobilized stability. *American Journal of Research Communication* [online]. 2013, s. 254-267 [cit. 2014-12-05].
Dostupné z: http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2013/11/Viet_Vol112.pdf
- [27] UPOL [online]. Olomouc [cit. 2014-12-05]. Dostupné z: <http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/bios/Imobilizace.pdf>
- [28] PODREPŠEK, PRIMOŽIČ, Željko KNEZ a HABULIN. Immobilization of Cellulase for Industrial Production. *Immobilization of Cellulase for Industrial Production*

- [online]. 2012 [cit. 2014-12-05]. DOI: 10.3303/CET1227040. Dostupné z: <http://www.aidic.it/cet/12/27/040.pdf>
- [29]SULAIMAN, Nurul Jannah, Roshanida A. RAHMAN a Norzita NGADI. 2014. Precipitation of Cellulase and Xylanase for Cross-Linked Enzyme Aggregates. *Jurnal Teknologi* [online]. 68(5): 18-20 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.11113/jt.v68.3024. ISSN 2180-3722. Dostupné z: <http://www.jurnalteknologi.utm.my/index.php/jurnalteknologi/article/view/3024>
- [30]DALAL, Sohel, Aparna SHARMA a Munishwar GUPTA. 2007. A multipurpose immobilized biocatalyst with pectinase, xylanase and cellulase activities. *Chemistry Central Journal* [online]. 1(1) [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1186/1752-153X-1-16. ISSN 1752153x. Dostupné z: <http://journal.chemistrycentral.com/content/1/1/16>
- [31]NGUYEN, Le Truc a Kun-Lin YANG. 2014. Uniform cross-linked cellulase aggregates prepared in millifluidic reactors. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 428: 146-151 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.jcis.2014.04.033. ISSN 00219797. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979714002446>
- [32]WANG, Mengfan, Wei QI, Rongxin SU a Zhimin HE. 2015. Advances in carrier-bound and carrier-free immobilized nanobiocatalysts. *Chemical Engineering Science* [online]. [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1016/j.ces.2015.03.051. ISSN 00092509. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009250915002328>
- [33]ROMO-SÁNCHEZ, Sheila, Conrado CAMACHO, Héctor L. RAMIREZ a María ARÉVALO-VILLENA. Immobilization of Commercial Cellulase and Xylanase by Different Methods Using Two Polymeric Supports. *Advances in Bioscience and Biotechnology* [online]. 2014, vol. 05, issue 06, s. 517-526 [cit. 2014-12-05]. DOI: 10.4236/abb.2014.56062. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/abb.2014.56062>
- [34]OMELKOVÁ, Jiřina a Miroslava ZICHOVÁ. *Nosič pro imobilizaci enzymu, způsob jeho přípravy, způsob imobilizace enzymu a biokatalyzátor*. Dostupné také z: <http://spisy.upv.cz/Patents/FullDocuments/303/303640.pdf>
- [35]SOMOGYI, Michael. Notes on sugar determination. *The Journal of Biological Chemistry*. [online]. 1952-01-03, č. 195, str. 19-23. [cit. 2014-12-05]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/195/1/19.full.pdf+html> .
- [36]KUBÁNEK, Vladimír. *Imobilizované enzymy pro katalýzu organických reakcí a způsob jejich výroby*. Dostupné také z: <http://spisy.upv.cz/Patents/FullDocuments/214/214984.pdf>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A ₅₃₀	hodnota absorbance při vlnové délce $\lambda = 530$ nm
CMC	karboxymethylcelulóza
E	enzym
GLU	glutaraldehyd
PET	polyethylentereftalát
PET nosič	aktivovaný nosič připravený z odpadní PET drti
VUT	Vysoké učení technické v Brně

9 SEZNAM PŘÍLOH

Tabulka č. 15 - Vypočítané hodnoty aktivit jednotlivých enzymových preparátů	52
Obr. č. 5 - Průběh přípravy nosiče z odpadních PET lahví - předpříprava umytých odpadních PET lahví	53
Obr. č. 6 - Průběh přípravy nosiče z odpadních PET lahví - sítování	53

10 PŘÍLOHY

Tabulka č. 15 - Vypočítané hodnoty aktivit jednotlivých enzymových preparátů

Enzymový preparát	Aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Relativní aktivita enzymu [%]
Volný enzym	0,8620	100,0000
0,1 mg E na PET	0,0089	1,0376
0,3 mg E na PET	0,0156	1,8041
0,5 mg E na PET	0,0059	0,6822
1,0 mg E na PET	0,0035	0,4088
2,0 mg E na PET	0,0016	0,1886
0,1 mg E na PET po měsíci	0,0084	0,9752
0,3 mg E na PET po měsíci	0,0155	1,7984
0,5 mg E na PET po měsíci	0,0057	0,6604
1,0 mg E na PET po měsíci	0,0035	0,4070
2,0 mg E na PET po měsíci	0,0016	0,1894
0,1 mg E na PET upravený 1% GLU	0,0028	0,3193
0,3 mg E na PET upravený 1% GLU	0,0041	0,4743
0,5 mg E na PET upravený 1% GLU	0,0037	0,4333
1,0 mg E na PET upravený 1% GLU	0,0032	0,3761
2,0 mg E na PET upravený 1% GLU	0,0012	0,1439
0,1 mg E na PET upravený 2% GLU	0,0044	0,5073
0,3 mg E na PET upravený 2% GLU	0,0044	0,5109
0,5 mg E na PET upravený 2% GLU	0,0040	0,4691
1,0 mg E na PET upravený 2% GLU	0,0034	0,3934
2,0 mg E na PET upravený 2% GLU	0,0013	0,1542
0,1 mg E na PET upravený 3,75% GLU	0,0075	0,8755
0,3 mg E na PET upravený 3,75% GLU	0,0048	0,5585
0,5 mg E na PET upravený 3,75% GLU	0,0050	0,5778
1,0 mg E na PET upravený 3,75% GLU	0,0036	0,4187
2,0 mg E na PET upravený 3,75% GLU	0,0015	0,1683
0,1 mg E na PET upravený 7,5% GLU	0,0015	0,1763
0,3 mg E na PET upravený 7,5% GLU	0,0009	0,0989
0,5 mg E na PET upravený 7,5% GLU	0,0007	0,0850
1,0 mg E na PET upravený 7,5% GLU	0,0002	0,0270
2,0 mg E na PET upravený 7,5% GLU	0,0001	0,0120
0,3 mg E na Sorsilen	0,0029	0,3341
0,5 mg E na Sorsilen	0,0029	0,3356
2 mg E na Sorsilen	0,0027	0,3076
3 mg E na Sorsilen	0,0027	0,3132
5 mg E na Sorsilen	0,0024	0,2782
10 mg E na Sorsilen	0,0018	0,2041
20 mg E na Sorsilen	0,0010	0,1107
30 mg E na Sorsilen	0,0007	0,0838
40 mg E na Sorsilen	0,0005	0,0606



Obr. č. 5 - Průběh přípravy nosiče z odpadních PET lahví - předpříprava umytých odpadních PET lahví



Obr. č. 6 - Průběh přípravy nosiče z odpadních PET lahví - sítování