

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Imobilizace lipasy na magnetické celulosové
mikročástice**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Zuzana Radzyniaková**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 7. 5. 2012

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

V Olomouci dne 7. 5. 2012

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky při vypracování této bakalářské práce. Poděkování také patří Mg. Michaele Pečové a Mgr. Kristýně Pospíškové za pomoc při práci s imobilizací lipasy, dále všem pracovníkům katedry biochemie PŘF UP v Olomouci za vytvoření optimálních podmínek pro vypracování této práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Zuzana Radzyniaková
Název práce	Imobilizace lipasy na magnetické celulosové mikročástice
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce obsahuje teoretickou část, která se zabývá obecnou charakterizací lipasy (výskyt, purifikace, vlastnosti, struktura, katalýza, stanovení aktivity), dále se zabývá různými typy nosičů se zaměřením na mikročástice, jejich přípravou a povrchovou modifikací. Teoretická část zahrnuje také metody imobilizace enzymů na nosiče a zejména využití lipas v praxi. Experimentální část této bakalářské práce se zaměřuje na vlastní přípravu imobilizované lipasy na magnetické celulosové mikročástice a na porovnání charakterizace volné a imobilizované lipasy na magnetických celulosových mikročásticích s ohledem na tyto vlastnosti: termostabilita, pH optimum, opakované použití, funkční časová a skladovací stabilita.</p>
Klíčová slova	Imobilizace, celulosa, lipasa, mikročástice, magnetické nosiče
Počet stran	63
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Zuzana Radzyniaková
Title	Immobilization of lipase on magnetic cellulose microspheres
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2012
Abstract	<p>This bachelor thesis includes a theoretical part, which deals with a general characterization of lipase (its occurrence, purification, properties, structure, catalysis and activity determination). Next part deals with different types of carriers with a focus on microspheres, their preparation and surface modification.</p> <p>Theoretical part of this thesis also includes methods of enzymes immobilization on carriers and mainly a practical lipase usage.</p> <p>Experimental part is focused on a preparation of immobilized lipase on magnetic cellulose microspheres and on a characterization comparison of free and immobilized lipase on magnetic cellulose microspheres with regard on following properties: thermostability, pH optimum, reuse and storage stability.</p>
Keywords	Immobilization, cellulose, lipase, microspheres, magnetic carriers
Number of pages	63
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH	- 5 -
1 Cíle práce	- 8 -
2 Úvod	- 9 -
3 Teoretická část	- 10 -
3.1 Lipasa.....	- 10 -
3.1.1 Výskyt lipas	- 10 -
3.1.2 Purifikace lipas	- 11 -
3.1.2.1 Precipitační metody.....	- 11 -
3.1.2.2 Chromatografické metody	- 12 -
3.1.2.3 Membránové procesy.....	- 13 -
3.1.2.4 Imunoafinitní purifikace	- 13 -
3.1.3 Struktura lipas	- 13 -
3.1.4 Vlastnosti lipas.....	- 14 -
3.1.4.1 pH optimum a teplotní stabilita	- 14 -
3.1.4.2 Stabilita v organických rozpouštědlech.....	- 16 -
3.1.4.3 Vliv kovových iontů	- 16 -
3.1.4.4 Substrátová specifita.....	- 17 -
3.1.4.5 Inhibitory	- 18 -
3.1.5 Reakce katalyzované lipasou	- 18 -
3.1.6 Metody stanovení aktivity lipasy	- 20 -
3.1.6.1 Screening v pevném médiu.....	- 20 -
3.1.6.2 Volumetrie.....	- 20 -
3.1.6.3 Nefelometrie	- 20 -
3.1.6.4 Měření vodivosti.....	- 21 -
3.1.6.5 HPLC	- 21 -
3.1.6.6 Plynová chromatografie (GC).....	- 21 -
3.1.6.7 Kolorimetrické metody.....	- 21 -
3.2 Imobilizace enzymů na nosiče	- 22 -
3.2.1 Porézní nosiče.....	- 23 -

3.2.1.1	Porézní nosiče anorganického původu	- 23 -
3.2.1.2	Porézní nosiče organického původu	- 23 -
3.2.2	Neporézní nosiče.....	- 24 -
3.2.2.1	Magnetické mikročástice	- 25 -
3.2.2.1.1	Příprava magnetických jader	- 25 -
3.2.2.1.2	Modifikace povrchu magnetických mikročástic.....	- 26 -
3.2.3	Metody imobilizace	- 29 -
3.2.3.1	Adsorpce.....	- 29 -
3.2.3.2	Zesíťování.....	- 29 -
3.2.3.3	Zachycení do polymerní matrice	- 29 -
3.2.3.4	Uzavření mezi semipermeabilní membrány	- 30 -
3.2.3.5	Kovalentní vazba	- 30 -
3.2.4	Imobilizace lipasy	- 31 -
3.2.5	Využití lipas v praxi.....	- 31 -
3.2.5.1	Lipasy v detergentech	- 32 -
3.2.5.2	Lipasy v potravinářství	- 32 -
3.2.5.3	Lipasy v papírenském průmyslu.....	- 33 -
3.2.5.4	Lipasy v organické syntéze	- 34 -
3.2.5.5	Lipasy v syntéze esterů.....	- 34 -
3.2.5.6	Lipasy v oleochemickém průmyslu.....	- 34 -
3.2.5.7	Lipasy ve farmaceutickém průmyslu	- 35 -
4	Experimentální část	- 37 -
4.1	Materiály a chemikálie	- 37 -
4.2	Přístroje.....	- 37 -
4.3	Metody	- 38 -
4.3.1	Příprava imobilizované lipasy na magnetické celulosové mikročástice.....	- 38 -
4.3.2	Stanovení aktivity lipasy	- 38 -
4.3.2.1	Stanovení závislosti aktivity lipasy na teplotě	- 39 -

4.3.2.2	Stanovení závislosti aktivity lipasy na pH	- 40 -
4.3.2.3	Funkční časová stabilita lipasy	- 40 -
4.3.2.4	Skladovací stabilita lipasy	- 40 -
4.3.2.5	Operační stabilita imobilizované lipasy	- 41 -
4.4	Výsledky a diskuze	Chyba! Záložka není definována.
4.4.1	Stanovení závislosti aktivity lipasy na teplotě.....	Chyba! Záložka není definována.
4.4.2	Stanovení závislosti aktivity lipasy na pH.....	Chyba! Záložka není definována.
4.4.3	Funkční časová stabilita lipasy	Chyba! Záložka není definována.
4.4.4	Skladovací stabilita lipasy	Chyba! Záložka není definována.
4.4.5	Operační stabilita lipasy.....	Chyba! Záložka není definována.
5	Závěr	Chyba! Záložka není definována.
6	Literatura	- 42 -
7	Seznam použitých zkratk	- 55 -

1 Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma „Imobilizace lipasy na magnetické celulosové mikročástice“.
- Příprava imobilizované lipasy na magnetických celulosových mikročásticích.
- Charakterizace volné a imobilizované lipasy na magnetických celulosových mikročásticích.

2 Úvod

Lipasa EC [3.1.1.3] patří mezi hydrolytické enzymy, které katalyzují štěpení esterových vazeb mastných kyselin triacylglyceridů za účasti vody za vzniku diacylglyceridů, monoacylglyceridů až glycerolu a volných mastných kyselin. V závislosti na přítomnosti vody v reakční směsi nemusí docházet k hydrolýze, ale naopak dochází k syntéze esterů. Lipasy se vyskytují v mikroorganismech, živočiších a rostlinách, ale pouze lipasy mikrobiálního původu jsou komerčně významné. Pro katalytické vlastnosti se lipasy řadí mezi velmi významné a využívané enzymy v biotechnologiích. Hlavní komerční aplikací lipas je jejich použití v detergentech. Dále nacházejí široké uplatnění v potravinářském, oleochemickém, papírenském a farmaceutickém průmyslu.

Magnetické celulosové mikročástice, které jsou připraveny z magnetitu (Fe_3O_4) o průměrné velikosti v mikrometrech, se vyznačují výbornou mechanickou odolností, vysokou chemickou rezistencí a snášenlivostí s nejrůznějšími pufrými a rozpouštědly, tepelnou stabilitou, snadnou separací vnějším magnetickým polem. Tyto mikročástice jsou modifikovány biopolymerem (celulosou) z důvodu zabránění shlukování částic a vnesení na povrch mikročástic funkční skupiny, které jsou důležité pro imobilizaci biomolekul (enzymů).

Po imobilizaci lipasy na magnetické celulosové mikročástice oproti volné lipase dochází k zlepšení vlastností, jako například k zvýšení tepelné a pH stability, k zvýšení stability při skladování. Díky imobilizaci se lipasy mohou opakovaně používat pro katalytickou reakci, což hraje velkou roli ve snížení nákladů na potřebné množství enzymu pro reakci. Imobilizace také nabízí snadnou separaci enzymu z reakční směsi pomocí vnějšího magnetického pole.

3 Teoretická část

3.1 Lipasa

Lipasy jsou hydrolytické enzymy, které katalyzují hydrolýzu a syntézu vazeb esterů mastných kyselin (MK) triacylglyceridů (TAG) nebo jiných monoesterů primárních a sekundárních alkoholů. Lipasy postupně působí na esterové vazby za vzniku diacylglycerolu, monoacylglycerolu až glycerolu a volných mastných kyselin. Lipasy tedy patří v databázi enzymů do třídy triacylglycerolhydrolas [EC 3.1.1.3]. Syntéza glyceridů byla provedena už v roce 1964 vědeckým týmem Iwai et al. použitím lipasy z plísně *Aspergillus niger* a dále jejich práce byla rozšířena o další tři lipasy vyprodukované plísněmi, a to *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* a *Penicillium cyclopium* (Tsujisaka et al., 1977).

3.1.1 Výskyt lipas

Lipasy se v širokém rozsahu vyskytují v přírodě, ale pouze lipasy produkované mikroorganismy jsou významné pro komerční účely (Tab. 1). Lipasy mikrobiálního původu se využívají hlavně v průmyslu. Všeobecným problémem je neustále rostoucí cena enzymů na světovém trhu (Godfrey & West, 1996).

V eukaryotních organismech se lipasy vyskytují v různých místech lipidového metabolismu, který zahrnuje trávení, absorpci, opětovnou tvorbu tuků a také se vyskytují v lipoproteinovém metabolismu (Balashev et al., 2001).

V rostlinné říši se lipasy nachází zejména v organelách, které zajišťují hospodaření s energií (Balashev et al., 2001).

Živočišné lipasy se nacházejí v pankreatu (pankreatické lipasy) a v žaludku (žaludeční lipasy) a účastní se v lipidovém metabolismu (Balashev et al., 2001).

Tab. 1 Některé běžně dostupné mikrobiální lipasy (upraveno dle Jaeger & Reetz, 1998).

Typ	Zdroj	Aplikace
houby	<i>C. rugosa</i>	organická syntéza
	<i>C. antarctica</i>	organická syntéza
	<i>T. lanuginosus</i>	aditivum detergentů
	<i>R. miehei</i>	zpracování potravin
bakterie	<i>Burkholderia cepacia</i>	organická syntéza
	<i>P. alcaligenes</i>	aditivum detergentů
	<i>P. mendocina</i>	aditivum detergentů
	<i>Ch. viscosum</i>	organická syntéza

3.1.2 Purifikace lipas

Lipasy jsou produkovány mnohými mikroorganismy a vyššími eukaryoty. Běžně používané lipasy jsou obvykle mikrobiálního původu. Tyto mikroorganismy produkují širokou škálu typů extracelulárních lipas (Chowdary et al., 2001). Vyprodukované lipasy musí být nějakou vhodnou metodou purifikovány tak, aby se získal co největší homogenní podíl (Woodlley & Peterson, 1994).

Aplikace většiny komerčně používaných lipas nevyžadují homogenní produkty, avšak určitý stupeň přečištění umožňuje jejich efektivní a úspěšné použití. Navíc purifikace enzymů umožňuje úspěšné určení sekvence primárních aminokyselin, a pak trojrozměrnou strukturu (Ghosh et al., 1996).

Mezi nejpoužívanější purifikační metody se řadí precipitace a chromatografie (Woodlley & Peterson, 1994).

3.1.2.1 Precipitační metody

Po kultivaci mikroorganismů produkujících lipasy obvykle následuje odstranění buněk z média buď odstředěním, nebo filtrací. Vzniklý supernatant je zakoncentrován ultrafiltrací, srážením nebo extrakcí do organických rozpouštědel. Ve většině případů se pro purifikaci používá srážení. Nejpoužívanějším srážedlem je síran amonný (Pabai et al., 1995b). V menší míře se používá také ethanol (Lupescu et al., 2007) nebo aceton (Riaz et al., 2010). Srážecí metoda se používá v prvních fázích purifikace pro hrubé přečištění enzymu, především pro zakoncentrování velkých objemů.

Po vysrážení proteinu následuje jeho rozpuštění a dialýza za účelem odstranění síranu amonného, a pak následuje chromatografická metoda (Pabai et al., 1995b).

3.1.2.2 Chromatografické metody

Pro účinnou purifikaci není dostačující použít pouze jednu chromatografickou metodu, a proto je nutná jejich kombinace (Saxena et al., 2003).

Nejběžněji používaná chromatografická metoda je ionexová chromatografie. U ionexové chromatografie dochází k separaci podle náboje. Mezi nejčastěji používané ionexy pro purifikaci lipas patří diethylaminoethyl (DEAE) jako anex a v méně případech karboxymethyl (CM) jako katex. Silnější iontoměniče na bázi triethylaminoethylových funkčních skupin (TEAE) (Veeraragavan et al., 1990) a Q-Sepharose (Menge et al., 1990) jsou pro purifikaci lipasy stále častěji vyhledávány, jelikož mají lepší průtokové vlastnosti. Lipasa z *Pseudomonas* spp. ATCC 21808 byla purifikována použitím Q-Sepharosy a oktyl-Sepharosy s 56% výtěžkem (Kordel et al., 1991).

Druhou nejčastěji používanou chromatografickou metodou je gelová filtrace, která je založená na principu molekulového síta. Mezi nejpoužívanější gely patří Sephadex. Pro purifikaci lipasy z *Rhizopus oryzae* byl použit gel Sephadex G-100. Tato purifikace poskytovala 64% výtěžek (Razak et al., 1997).

Další chromatografickou metodou je afinitní chromatografie, která je založená na separaci podle interakce mezi proteinem a imobilizovaným ligandem, např. concavalin A (Con-A), který je kovalentně vázaný na Sepharosu. Tento typ chromatografické metody v kombinaci s ionexovou chromatografií byl použit k purifikaci lipasy z *Mucor miehei* s 57% výtěžkem (Huge-Jensen et al., 1987).

Chromatografie, která používá hydrofobní sorbent s oktylovou nebo fenylovou skupinou, je založená na hydrofobních interakcích (Farooqui et al., 1994). Lipasa z *Pseudomonas fluorescens* byla purifikována hydrofobní interakční chromatografií s použitím sorbentu oktyl-Sepharosy CL-4B v kombinaci s ionexovou chromatografií. Purifikace poskytla 21% výtěžek (Sztajer et al., 1992).

Adsorpční chromatografie se také uplatňuje při purifikaci s použitím hydroxyapatitu jako adsorbentu (Taipa et al., 1992). Lipasa z *Rhizopus japonicus* NR 400 byla purifikována

pomocí adsorpční chromatografie a gelové filtrace. Výtěžek purifikace činil 31 % (Suzuki et al., 1986).

3.1.2.3 Membránové procesy

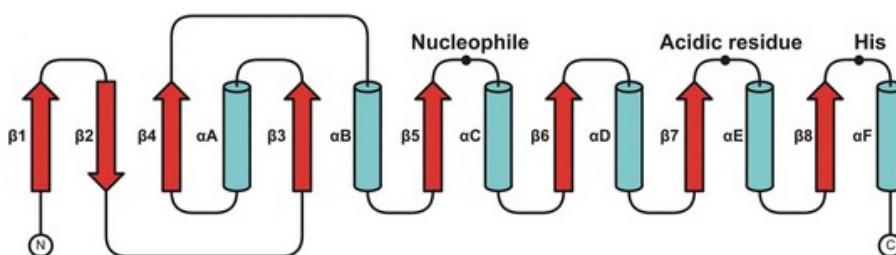
Obvyklé postupy purifikace jsou časově náročné s často nízkým konečným výtěžkem, a proto přicházejí nové technologie purifikace. Mezi ně patří například membránové procesy, které zahrnují ultrafiltraci s použitím kapilárních membrán z polyakrylonitrilu (PAN) nebo polysulfonu (PS) (Sztajer & Bryjak, 1989).

3.1.2.4 Imunoafinitní purifikace

Mezi nové technologie purifikace také patří imunoafinitní purifikace, která je jednou z nejvíce selektivních a zároveň nejdražších metod, zejména při použití monoklonálních protilátek (Hill et al., 1989). Pomocí IgG afinitní chromatografie byla purifikována lipasa z *Escherichia coli* (Dandmann et al., 2000).

3.1.3 Struktura lipas

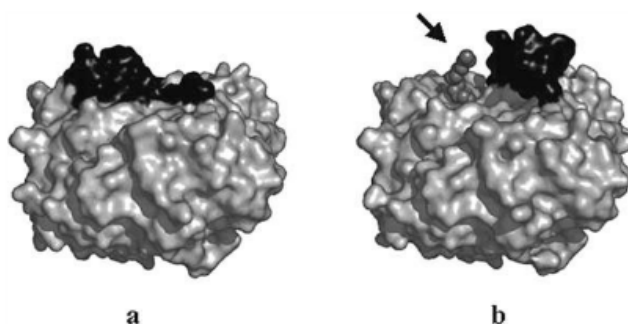
Lipasa obsahuje dvě odlišné domény, a to N-koncovou doménu s α/β hydrolasovou konformací (Obr. 1), kde se nachází aktivní místo enzymu (Frikha et al., 2010) a C-koncovou doménou s vázanou kolipasou (Van Tilbeurgh et al., 1999).



Obr. 1 Kanonická α/β hydrolasová konformace. Topologický diagram se znázorněnými α -helixy (modré válce), β -skládanými listy (červené šipky) a pozicemi katalytických reziduí (černé tečky) (Levisson et al., 2009).

Lipasy jsou serinové hydrolasy, které obsahují shodné sekvence pentapeptidů G-X1-S-X2-G (G = glycin, S = serin, X1 = histidin, X2 = glutamová nebo asparagová kyselina) (Svendsen, 1994) s aktivním místem, které obsahuje triádu Ser-His-Asp, kde serin vystupuje jako aktivní nukleofilní část (Uppenberg et al., 1994).

Bylo prokázáno, že aktivní místa lipasy jsou chráněna před rozpouštědly mobilními částmi neboli „víčky“. Pomocí těchto „víček“ dochází ke změně konformace a tím je enzym buď v aktivní, nebo inaktivní formě pro interakci se substrátem nebo inhibitorem (Obr. 2). Vazebné místo pro substrát (inhibitor) se nachází uvnitř dutiny na povrchu hlavního β -skládaného listu. Velikost a geometrie dutiny pro vazbu koresponduje se substrátovou specifitou enzymu (Pleiss et al., 1998).



Obr. 2 3D struktura lipasy z *Candida rugosa*. (a) inaktivní konformace (b) aktivní konformace s otevřeným „víčkem“ (černá) a navázaným inhibitorem v aktivním místě enzymu (tmavě šedá, místo zvýrazněno šipkou) (Lotti et al., 2007).

Počáteční studium lipas metodami proteinového inženýrství je datováno okolo roku 1980 na lipasu z bakterie *Pseudomonas mendocina*. Struktura byla sestavena pouze na základě znalosti sekvencí (Gray et al., 1988). Po odprezentování struktury se zájem o proteinové inženýrství dramaticky zvýšil, jelikož znalost trojrozměrné struktury lipas hraje důležitou roli při sestavování lipas pro specifické účely (Svendsen, 1994).

3.1.4 Vlastnosti lipas

3.1.4.1 pH optimum a teplotní stabilita

Obecně platí, že bakteriální lipasy mají neutrální (Lee et al., 1999) nebo zásadité pH optimum (Schmidt-Dannert et al., 1994) s výjimkou lipasy z bakterie *Pseudomonas*

fluorescens SIK W1, která má optimální pH v mírně kyselé oblasti (pH = 4,8). Stabilita bakteriálních lipas se pohybuje v širokém rozsahu pH, od 4 do 11 (Kojima et al., 1994).

Teplotní optimum lipas se pohybuje okolo 30-60 °C (Dharmsthiti et al., 1998b), nicméně existují i lipasy s teplotním optimem vyšším nebo nižším, než jak je uvedeno. Obecně jsou lipasy stabilní při vyšších teplotách (Janssen et al., 1994). Použitím stabilizátoru, např. ethylenglykolu nebo sorbitolu, se může docílit zvýšení termostability, např. lipasa z rodu *Bacillus* byla aktivní při 70 °C i po 150 minutách (Nawani & Kaur, 2000). Jsou známy také vysoce termotolerantní lipasy, například lipasa z *Bacillus stearothermophilus*, která je stabilní při teplotě 100 °C s poločasem 15-25 minut (Bradoo et al., 1999).

Příklady různých zdrojů lipas a jejich teplotní a pH charakterizace jsou zobrazeny v Tab. 2.

Tab. 2 Příklady teplotní a pH charakterizace různých bakteriálních lipas (upraveno dle Gupta et al., 2004)

Zdroj	pH optimum	Teplotní optimum [°C]	pH a teplotní stabilita	Literatura
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> LP009	7,0	50	stabilní v pH 4,0-8,0 při teplotách nižších než 45 °C	(Dharmsthiti et al., 1998a)
<i>Acinetobacter sp.</i> RAG-1	9,0	55	aktivní v teplotách vyšších než 70 °C	(Snellman et al., 2002)
<i>Bacillus sp.</i>	*	*	stabilní za 12 hod. při 60 °C	(Nawani & Kaur, 2000)
<i>Burkholderia sp.</i>	11,0	90-100	stabilní při pH 6,0-12,0 při teplotách 90-100 °C i po 12 hod	(Bradoo et al., 2002)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LP 602	8,0	55	90% zbytková aktivita při pH 8,0 po 5 hod.; 50% zbytková aktivita při 55 °C po 2 hod.	(Dharmshiti a Kuhasuntisuk, 1998)
<i>Staphylococcus warneri</i> 2	7,0	*	stabilní při pH 6,0-8,0 za 24 hod.	(Van Kampen et al., 2001)

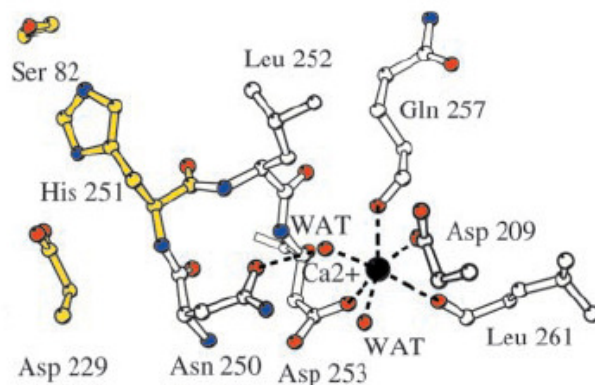
* Blíže nespecifikováno.

3.1.4.2 Stabilita v organických rozpouštědlech

Lipasy jsou obecně stabilní v organických rozpouštědlech až na pár výjimek, které vyvolávají stimulaci nebo inhibici. Stabilita v organických rozpouštědlech je velmi užitečná v syntetických reakcích. Ukázalo se, že přidání acetonu, ethanolu nebo methanolu do reakční směsi má stimulující účinky pro lipasu z *Bacillus thermocatenulatus* (Schmidt-Dannert et al., 1994) a naopak u lipasy z *Pseudomonas aeruginosa* YS-7 má aceton inhibiční účinky (Sugihara et al., 1991). Lipasa z *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 byla vysoce nestabilní v různých organických rozpouštědlech (Dharmshiti et al., 1998).

3.1.4.3 Vliv kovových iontů

Vápenatý kation patří mezi ionty, které stimulují aktivitu enzymu, jelikož Ca^{2+} tvoří vápenaté soli dlouhých MK (Godtfredsen, 1990). Tato stimulace byla prokázána například u lipasy z *Acinetobacter* sp. RAG-1 (Snellman et al., 2002), lipasy z *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee et al., 1999), lipasy z *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, u které se vazebné místo pro Ca^{2+} nachází přibližně 15 Å od aktivní nukleofilní části Ser⁸² a na stejné straně, kde je lokalizován His²⁵¹. Ca^{2+} je vázán koordinačně k ligandům (dvě karboxylové skupiny Asp²⁰⁹ a Asp²⁵³, dvě karbonylové skupiny Gln²⁵⁷ a Leu²⁶¹ a dvě molekuly vody) a zaujímá tvar oktaedru (Obr. 3) (Nardini et al., 2000). Působením Ca^{2+} na lipasu z *Pseudomonas aeruginosa* 10145 nebyla prokázána stimulace, nýbrž inhibice (Finkelstein et al., 1970). Aktivitu lipas lze inhibovat těžkými kovy, jako Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} aj. (Patkar & Bjorkling, 1994). Například aktivita lipasy z *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 byla z 60 % inhibována Fe^{3+} , ale nikoliv Ca^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} (Lin et al., 1996).



Obr. 3 Ca^{2+} -vazebné místo lipasy z *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Katalytická triáda (žlutá), aminokyselinové zbytky a molekuly vody koordinují vápenatý ion (černá koule). Oktaedrická konformace je zobrazena přerušovanou čarou (Nardini et al., 2000).

3.1.4.4 Substrátová specifita

Na základě substrátové specifity se mikrobiální lipasy dělí na tři základní skupiny: nespecifické, regiospecifické, specifické (Davranov, 1994).

Důsledkem náhodného působení nespecifické lipasy na molekulu TAG dojde k jeho úplnému rozkladu na MK a glycerol. Příkladem této mikrobiální lipasy je lipasa z *Staphylococcus aureus* (Davranov, 1994).

Regiospecifické lipasy hydrolyzují jen primární esterové vazby, tj. na atomech uhlíku C1 a C3 glycerolu. Příkladem bakterií produkující takové extracelulární regiospecifické lipasy je rod *Bacillus* (Sugihara et al., 1991).

Třetí skupina zahrnuje lipasy specifické na mastné kyseliny. Lipasy některých bakterií preferují TAG s dlouhým řetězcem MK, např. *Pseudomonas alcaligenes* 24 (Misset et al., 1994), jiné zase s krátkým nebo se středně dlouhým řetězcem MK, např. *Pseudomonas fluorescens* (Sugiura et al., 1991), nebo také existují bakterie, které preferují řetězce s nenasycenými MK, např. *Staphylococcus aureus* 226 (Muraoka et al., 1982).

Další vlastností lipas je jejich enantio-stereoselektivita. Lipasy mají schopnost selektivně rozlišovat enantiomery v racemické směsi. Stereoselektivita lipas se využívá například pro rozklad různých racemických směsí organických kyselin v nemísitelném

dvoufázovém systému (Klibanov, 1990). Racemické směsi alkoholů mohou být také rozloženy na enantiomericky čisté formy (Arroyo & Sinisterra, 1995).

3.1.4.5 Inhibitory

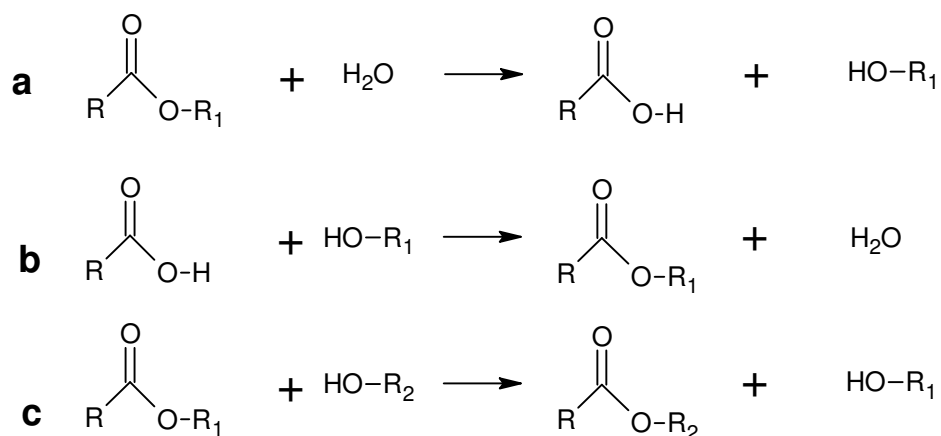
Studium inhibice lipas bylo zejména prospěšné pro farmaceutický průmysl. Inhibitory lipas se totiž používají pro výrobu medikamentů pro léčbu obezity, jelikož inhibitory zabraňují štěpení tuků, které jsou následně odstraněny z těla pryč a také pro léčbu kožních problémů, např. akné (Gupta et al., 2004). Lipasa z *Propionibacterium acnes* je zodpovědná za tvorbu akné, jelikož se volné MK tvoří v důsledku působení této lipasy na triglyceridy vyvolávající záněty. Tetracykliny a erythromycin se nejčastěji používají k systémové léčbě akné v důsledku jejich inhibičních účinků na aktivitu lipasy z *Propionibacterium acnes* (Higaki, 2003).

Nespecifické reverzibilní inhibitory se vyznačují tím, že nepůsobí přímo v aktivním místě enzymu. Mezi tyto inhibitory se řadí surfaktanty neboli density (Iizumi et al., 1990), žlučové soli (Wang et al., 1999) a proteiny (Gargouri et al., 1984).

Látky se specifickým inhibičním účinkem přímo interagují s aktivním místem enzymu. Specifické inhibitory se dále dělí na reverzibilní a irreverzibilní. Mezi reverzibilní inhibitory se řadí deriváty kyseliny borité (Lolis & Petsko, 1990), substrátová analoga, např. triethylglycerol (analog triacylglyceridu). Použitím triethylglycerolu dochází ke kompetitivní inhibici pankreatické lipasy (Lengsfeld & Wolfer 1988). Irreverzibilní inhibitory reagují s aminokyselinami v blízkosti aktivního místa, a tak nevratně inhibují katalytickou aktivitu enzymu. Všeobecně serinové inhibitory inhibují aktivitu lipasy, jelikož lipasy patří do skupiny serinových hydrolas. Mezi tyto inhibitory patří například fenylmethylsulfonyl fluorid (Dharmsthiti et al., 1998b).

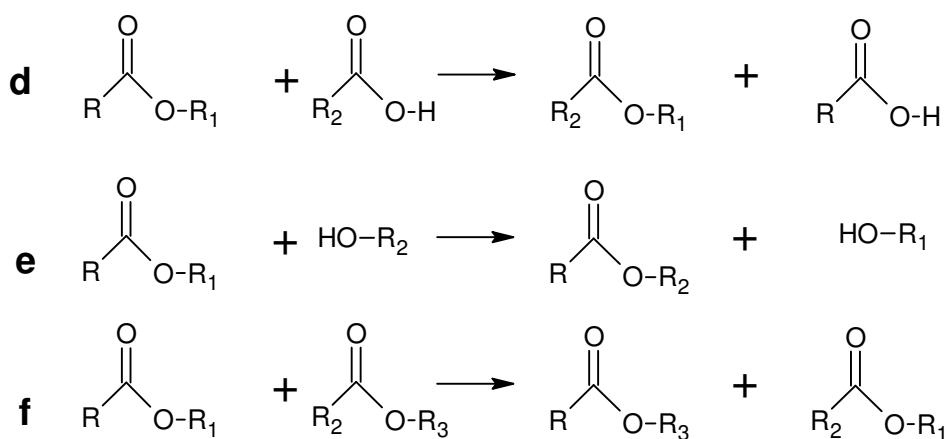
3.1.5 Reakce katalyzované lipasou

Typickými reakcemi, které katalyzuje lipasa, jsou hydrolýza, esterifikace a transesterifikace (Obr. 4) (Levisson et al., 2009).



Obr. 4 Schematické znázornění reakcí katalyzovaných lipasou. (a) hydrolýza, (b) esterifikace, (c) transesterifikace (upraveno dle Levisson et al., 2009).

Transesterifikace zahrnuje chemické reakce, kde ester reaguje s alkoholem (alkoholýzu), karboxylovou kyselinou (acidolýzu) nebo jiným esterem (interesterifikaci) (Obr. 5) (Balcão et al., 1996).



Obr. 5 Obecná schémata příkladů transesterifikace. (d) acidolýza, (e) alkoholýza, (f) interesterifikace (upraveno dle Pleva, 2010).

3.1.6 Metody stanovení aktivity lipasy

Několik metod bylo vyvinuto pro měření aktivity lipasy. Reakční rychlost katalýzy se může měřit buď rychlostí spotřeby substrátu, rychlostí tvorby MK nebo rychlostí vyjasnění média (Smeltzer et al., 1992).

Mezi tyto metody patří: screening v pevném médiu, volumetrie, nefelometrie, měření vodivosti, kolorimetrické metody, HPLC, plynová chromatografie a další. Obecně se při těchto metodách používají umělé substráty, př. *p*-nitrofenyl estery MK i přírodní substráty, př. olivový olej (Hasan et al., 2009).

3.1.6.1 Screening v pevném médiu

Lipidická aktivita může být sledována přímo změnou vzhledu substrátu (tributyryn, triolein), který byl mechanicky emulgován v růstových médiích. Kolem kolonií s lipidickou aktivitou se vytvoří projasněné zóny v médiu (Jaeger et al., 1994).

3.1.6.2 Volumetrie

Reakcí katalyzovanou lipasou vzniká volná kyselina, která se může detekovat titračně. Titrační metoda s použitím pH-statů se obvykle používá jako referenční metoda stanovení aktivity lipasy (Dellamora-Ortiz et al., 1997). pH-stat za mechanického míchání snímá pH roztoku (s přidaným přírodním nebo syntetickým substrátem) a automaticky přidává zásadu (NaOH) pro udržení konstantního pH. Zařízení slouží k sledování časového průběhu reakce při uvolňování volných MK (Ferrato et al., 1997).

3.1.6.3 Nefelometrie

Tyto metody jsou založené na porovnání intenzity světla rozptýleného vzorkem za definovaných podmínek s intenzitou světla rozptýleného standardní referenční suspenzí. Čím vyšší je intenzita rozptýleného světla, tím je vyšší zákal (O'Dell, 1993). V podstatě jde o vyčeření (štěpení substrátu) emulze působením lipolytické aktivity. Tento postup číření vyplývá z poklesu množství hydrolyzovaných emulgovaných částic, což způsobí snížení intenzity rozptýleného světla (Zinterhofer et al., 1973).

3.1.6.4 Měření vodivosti

Elektrická vodivost média se zvyšuje během hydrolýzy, vzhledem k vývoji uvolněných elektricky nabitých volných MK (Ballot et al., 1982).

3.1.6.5 HPLC

Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie používá pro stanovení katalytické aktivity lipasy jako substrát například β -naftyllaureát. Tento substrát je inkubován s enzymem za tvorby naftolu, který je stanoven pomocí HPLC použitím UV detektoru. HPLC metoda byla použita pro měření produktu 2-hydroxyoktanové kyseliny UV detektorem za použití methyl nebo butyl esterů 2-hydroxyoktanové kyseliny jako substrátu (Sakaki et al., 2002).

3.1.6.6 Plynová chromatografie (GC)

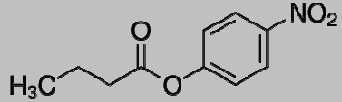
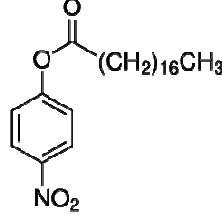
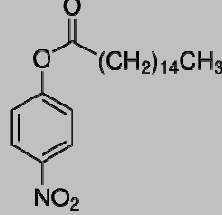
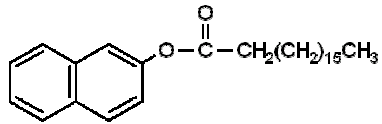
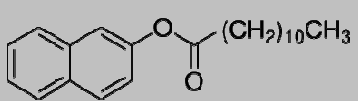
GC metoda může být použita pro separaci a kvantifikaci hydrolytických produktů (Louwrier et al., 1996). Tato metoda je obecně vhodnější než HPLC především proto, že HPLC má nízkou citlivost detektorů (Snellman & Colwell, 2008).

3.1.6.7 Kolorimetrické metody

Použitím kolorimetrických metod (kolorimetrie, fotometrie, spektrofotometrie) se docílí větší rychlosti a citlivosti testu pro stanovení volných MK (Lowry & Tinsley, 1976).

Aktivita lipasy se určuje hydrolýzou umělých substrátů *p*-nitrofenyl esterů MK s různou délkou řetězce (např. estery kyseliny butanové, palmitové, aj.). Tato hydrolýza vede k uvolnění *p*-nitrofenolu, který je kvantitativně stanoven spektrofotometricky. Žluté zbarvení *p*-nitrofenolu lze sledovat odečítáním absorbance při vlnové délce 405 nm (Stuer et al., 1986) nebo při 410 nm (Winkler & Stuckmann, 1979). Příklady komerčně dostupných umělých substrátů jsou zobrazeny v Tab. 3.

Tab. 3 Příklady komerčně dostupných umělých substrátů (převzato z <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>; prohlíženo 24. 4. 2012).

Substrát	Empirický vzorec	Molekulová hmotnost [g/mol]	Strukturní vzorec
4-nitrofenylbutyrát	$C_{10}H_{11}NO_4$	209,20	
4-nitrofenylstearát	$C_{24}H_{39}NO_4$	405,57	
4-nitrofenylpalmitát	$C_{22}H_{35}NO_4$	377,52	
2-naftylstearát	$C_{28}H_{42}O_2$	410,63	
2-naftyllaureát	$C_{22}H_{30}O_2$	326,48	

3.2 Imobilizace enzymů na nosiče

Enzymy jsou relativně drahé katalyzátory. Z ekonomického hlediska je v mnoha aplikacích vyžadováno jejich opětovné použití. Aby se enzym mohl použít znovu, musí být jeho stabilita dostatečně vysoká, což se docílí imobilizací. Enzym, který je imobilizován na nosič, je možné po skončení reakce separovat filtrací přes síto (Zhao et al., 2011), dekantací (Jeong et al., 2006), centrifugací (Phadtare et al., 2004) či magnetickou separací (Šafaříková & Šafařík, 1995). Použití imobilizovaných enzymů umožňuje výrazně zjednodušit konstrukci reaktoru a také umožňuje kontrolovat průběh reakce (Mateo et al., 2007).

Ve většině případů se provádí imobilizace kovalentním vázáním na pevné nosiče, které by měly mít dostatečné množství funkčních skupin k imobilizaci a také mít mechanickou a chemickou odolnost, dobré průtokové vlastnosti aj. (Hermanson et al., 1992).

Imobilizací enzymů na nosiče se ve většině případů mohou zlepšit jejich vlastnosti v porovnání s neimobilizovanými formami. Mezi tyto vlastnosti patří rozšířený rozsah teplotního a pH optima, vyšší stabilita při skladování, vyšší aktivita aj. (Hong et al., 2007).

Bohužel imobilizace přináší některé nevýhody. Mezi ně patří například to, že enzym může částečně ztrácet svou aktivitu (Bryjak, 2003) a může dojít ke snížení afinity enzymu k substrátu (Lei et al., 2007).

3.2.1 Porézní nosiče

Jako nosiče se využívají porézní materiály anorganického původu, např. porézní sklo, písek, silikagel organického původu, např. celulóza a její deriváty, Sepharosa, polyvinylalkohol atd. (Hermanson et al., 1992).

3.2.1.1 Porézní nosiče anorganického původu

Výhodou silikagelu je vysoká pórovitost a mechanická odolnost, dobrá definovatelnost, ale má omezenou chemickou stabilitu (limitujícím faktorem je pH a teplota) a je náchylný ke specifickým interakcím (Hermanson et al., 1992). Porézní sklo a křemičité materiály jsou užitečné vzhledem ke své pórovitosti, rigiditě, mechanické odolnosti, termostabilitě a odolnosti vůči nespecifickým interakcím. Nevýhodou použití porézního skla je jeho křehkost a rozpustnost v zásaditém prostředí (Exnar, 1985).

3.2.1.2 Porézní nosiče organického původu

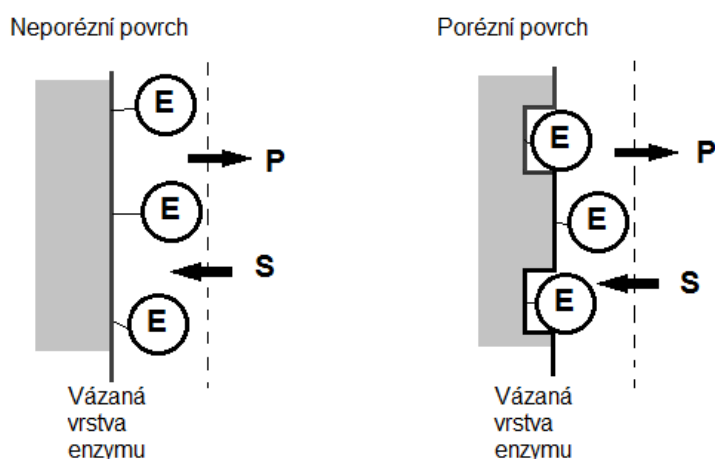
Jako porézní nosič organického původu se používá polysacharid Sepharosa získaná z mořských řas. Přírodní Sepharosa je mechanicky i chemicky labilní, avšak po zesílení činidlem 2,3-dibrompropanolem nebo epichlorhydrinem vzniká stabilní gel, u kterého se tyto vlastnosti mění na stabilní. Další výhodou je velikost pórů. Celulóza je

nejpoužívanější makroporézní, hydrofilní nosič. Celulosa je charakteristická snášenlivostí k vyšším teplotám i pH (Hermanson et al., 1992).

Nosiče vyrobené ze syntetického polymeru polyakrylamidu (PAD) mají dobrou pH stabilitu, odolnost vůči nesespecifickým interakcím. Mezi nevýhody při použití polyakrylamidu jako nosiče patří nízké průtokové vlastnosti, mechanická labilita. Dalším, široce používaným syntetickým polymerem je polyvinylalkohol (PVA), který je rozpustný ve vodě, nerozpustný v organických rozpouštědlech. PVA vykazuje dobrou mechanickou a tepelnou stabilitu (Hermanson et al., 1992).

3.2.2 Neporézní nosiče

Rychlost enzymové reakce v případě porézních nosičů je limitována difuzí substrátu k enzymu a produktu ven, a proto se začínají více preferovat nosiče neporézní (Obr. 6) (Dohányos & Šmejkalová, 2006). Mezi neporézní nosiče se řadí nejrůznější materiály o velikosti nano- až mikro- metrů v závislosti na aplikacích v různých oblastech medicíny, biotechnologie, environmentální technologie, biologických nebo chemických oborech (Šafařík & Šafaříková, 2009). Nejčastěji se využívají magnetické nano- nebo mikročástice vyrobené z oxidů železa – maghemitu $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a magnetitu Fe_3O_4 (Liu et al., 2009). Dalšími možnými materiály jsou CrO_2 (Zhong et al., 2001) nebo čistě kovy Fe, Ni a jejich slitiny (Suh et al., 2006).



Obr. 6 Imobilizace enzymů na porézním a neporézním povrchu. K enzymu vázaného na povrch nosiče difunduje rozpuštěný substrát a opačným směrem difunduje produkt (upraveno dle Dohányos & Šmejkalová, 2006).

Výhodou použití magnetických neporézních nosičů je využití jejich snadné manipulace a separace vnějším magnetickým polem během několika sekund (Obr. 7). Mezi žádoucí vlastnosti také patří chemická rezistence a kompatibilita s nejběžněji používanými rozpouštědly a pufrů, termostabilita, mechanická odolnost, superparamagnetismus, velký povrch aj. (Hsing et al., 2007).

Magnetické částice patří mezi kompozity, které mají magnetickou část (nejčastěji tvořen z magnetitu, maghemitu nebo různých feritů) a druhou částí je polymerní látka (Laurent et al., 2008). Po modifikaci povrchu částic polymerem je zajištěna stabilizace, dispergace a funkcionalizace povrchu částic (Horák et al., 2007).



Obr. 7 Separace magnetických celulosových mikročástic vnějším magnetickým polem (magnetem). Rozsuspendované MCM v pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ K-P_i, pH = 7,5) před magnetickou separací (vlevo) a po magnetické separaci (vpravo).

3.2.2.1 Magnetické mikročástice

3.2.2.1.1 Příprava magnetických jader

Magnetické mikročástice jsou složeny z magnetických jader, která mohou mít velikost řádově v nanometrech. Tato magnetická jádra se pak obalují polymerem za vzniku mikročástic (Horák et al., 2007).

Mezi nejrozšířenější způsob přípravy magnetických jader patří koprecipitace se zásadou. Fe^{2+} a Fe^{3+} soli se smíchají s vodným roztokem amoniaku. Výsledkem srážení jsou částice magnetitu. Tvorba produktu a morfologie částic je ovlivněna různými parametry koprecipitačního procesu, tj. pH, iontová síla, teplota, koncentrace solí, reakční doba, aj. (Massart, 1981).

Další možnou přípravou je termický rozklad prekurzorů obsahujících železo. Termický rozklad pentakarbonylželeza za přítomnosti surfaktantu (př. kyseliny olejové) poskytuje

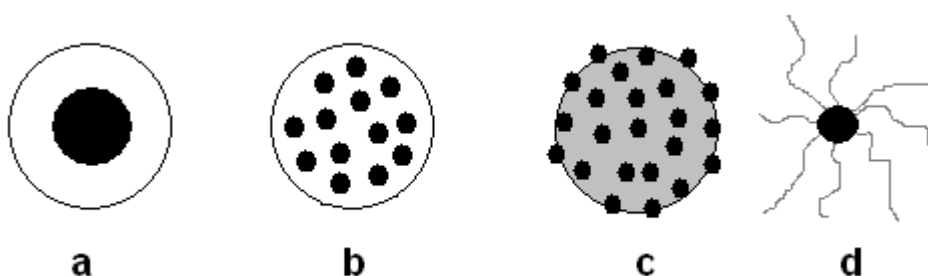
nejprve primární částice železa a až po oxidaci se tvoří magnetit (Pei et al., 2007) nebo maghemit (Hyeon et al., 2001).

Hydrotermální proces zahrnuje reakce směsných oxidů a hydroxidů železa ve vodném prostředí při nadkritických podmínkách (při teplotách nad 200 °C, pod tlakem vyšším než 14 MPa) za vzniku částic feritu (Horák et al., 2007).

3.2.2.1.2 Modifikace povrchu magnetických mikročástic

Magnetické polymerní mikročástice mají charakter kompozitního materiálu složený z anorganické a organické složky. Modifikace mikročástic polymerem je velmi důležitá, jelikož polymer chrání mikročástice před přímým kontaktem s prostředím. Dále modifikace povrchu zabraňuje nežádoucím nesespecifickým interakcím, zabraňuje shlukování mikročástic, zajišťuje stabilizaci mikročástic a přítomnost funkčních skupin (OH, COOH, NH₂, CONH₂, aj.), které jsou nezbytné pro imobilizaci biomolekul. Biokompatibilita a biodegradabilita jsou velmi důležité vlastnosti magnetických polymerních mikročástic při použití v aplikacích *in vivo* (Horák et al., 2007). K modifikaci povrchu se používají různé typy polymerů – přírodní a syntetické (Bajerová et al., 2009), které jsou znázorněny v Tab. 4.

Různé metody přípravy modifikace polymerem poskytují magnetické polymerní částice, které se liší morfologií (Obr. 8).



Obr. 8 Různé typy morfologie kompozitních magnetických polymerních mikročástic. (a) jedno magnetické jádro uvnitř polymerního pouzdra, (b) více magnetických jader rovnoměrně rozptýlených v polymerní matrici, (c) magnetická jádra umístěná na povrchu polymerní koule, (d) polymerní řetězce přivěšené k magnetickému jádru (upraveno dle Horák et al., 2007).

Mezi metody přípravy magnetických polymerních mikročastic patří fázová separace, síťovací metody, polymerová inkompatibilita, odpaření rozpouštědla aj. (Bajerová et al., 2009).

Při fázové separaci dochází k rozdělení polymerního roztoku na dvě nemísitelné kapalně fáze. Jedna z fází je bohatá na makromolekulární materiál, který se vysráží za neustálého míchání na magnetická jádra změnou pH, teploty nebo přidáním síťovacího činidla, př. glutaraldehydu (Bajerová et al., 2009).

Tvorba kovalentních vazeb mezi polymerem a magnetickým jádrem je princip chemické síťovací metody. Jako činidla zprostředkovávající kovalentní vazby patří glutaraldehyd, formaldehyd nebo přírodní genepin. Tato činidla byla použita pro přípravu chitosanových mikročastic (Bajerová et al., 2009).

Polymerová inkompatibilita využívá principu fázové separace, ale je založená na vzájemné neslučitelnosti dvou polymerních roztoků, které se chemicky od sebe liší. V závislosti na inkompatibilitě dochází k oddělení dvou polymerních fází. Povrch magnetického jádra tvoří pouze jeden z polymerů. Druhý polymer se přidává do reakce, aby vyvolal fázovou separaci (Bajerová et al., 2009).

Nejjednodušší a zároveň nejpoužívanější metodou přípravy magnetických polymerních mikročastic je odpaření rozpouštědla z vnitřní fáze emulze. Magnetický materiál se rozptýlí do rozpuštěného polymeru v těkavém organickém rozpouštědle. Pak se za stálého míchání organická fáze emulguje do disperzního média (vnější fáze) s emulgátorem. Rychlost míchání je limitujícím faktorem pro výslednou velikost magnetických polymerních mikročastic. Po stabilizaci emulze dochází k difuzi vnitřního rozpouštědla a následně k jeho odpařování (Bajerová et al., 2009).

Tab. 4 Příklady polymerů používaných k povrchové modifikaci mikročástic a jejich možné využití v praxi.

Typ materiálu	Konkrétní obalový materiál		Aplikace	Literatura
<i>Přírodní polymery</i>	chitosan	oleochemický průmysl	výroba bionafty	Xie & Wang, 2012
	dextran	biomedicína	biosensory, DNA biočipy	Graham et al., 2002
	celulosa	biomedicína	mimotělní čištění krve	Ettenauer et al., 2010
	alginát	biomedicína	cílený přenos léčiva - uvolňování nervového růstového faktoru	Ciofani et al., 2009
	škrob	biomedicína	cílený přenos léčiva - vliv opsoninu v Kupfferových buňkách potkana	Colet & Muller, 1994
	želatina	biomedicína	cílený přenos léčiva	Tataru et al., 2011
	albumin	biomedicína	cílený přenos léčiva - uvolňování 5-fluorouracilu v pankreatu potkana	Jia et al., 2007
<i>Syntetické polymery</i>	polyethylenglykol	biomedicína	cílený přenos léčiva - uvolňování aktivátoru plasminogenu	Kaminski et al., 2008
	kyselina poly(L-mléčná)	biomedicína	cílený přenos léčiva - uvolňování insulinu	Teply et al., 2008
	kyselina poly(glykolová)	biomedicína	cílený přenos léčiva - uvolňování insulinu	Teply et al., 2008
	polyvinylalkohol	potravinářský průmysl	hydrolýza sacharosy	Akgöl et al., 2001a
	silikon	biomedicína	cílený přenos léčiva - uvolňování protinádorových léčiv	Gu et al., 2010
	polystyren	biomedicína	léčba glaukomu	Samsel et al., 2011

3.2.3 Metody imobilizace

3.2.3.1 Adsorpce

Adsorpce je jednou z nejstarších metod pro imobilizaci proteinů na magnetické nosiče. Vyznačuje se jednoduchostí, ekonomickou nenáročností a snadnou proveditelností postupu. Princip adsorpce enzymu na nosič je založený na nekovalentních interakcích, jako jsou iontové, hydrofobní, vodíkové nebo van der Waalsovy síly (Akgöl et al., 2001b) (Obr. 9b). Jelikož u adsorpce nedochází k chemické vazbě jako takové, enzym si může zachovat svou vysokou katalytickou aktivitu (Mateo et al., 2000). Adsorpce má nevýhody ve srovnání s například kovalentně vázanou imobilizací, a to takové, že je méně spolehlivá a méně stabilní. Avšak nízká stabilita může být využita pro reverzibilní navázání proteinů (Bayramoglu et al., 2008).

3.2.3.2 Zesítnění

Principem imobilizační metody zesítnění je vytvoření (kovalentních) chemických vazeb mezi molekulami proteinu, čímž vzniká nerozpustná síť (Obr. 9d). Aktivačním činidlem může být bifunkční vodný roztok glutaraldehydu, který efektivně aktivuje aminoskupiny. Tato chemická vazba zajišťuje stabilní strukturu a zesítnění biomolekul. Mezi činidla, která se používají pro metodu zesítnění patří také bisdiazobenzidin nebo hexamethylen diisokyanát (Eldin et al., 2000). Použití imobilizace pomocí mezimolekulárního vázání je často doprovázeno jinými metodami, například fyzikální adsorpcí. Touto kombinací se docílí větší stability enzymu a v neposlední řadě se zabrání jeho postupnému uvolňování z nosiče (Lopez-Gallego et al., 2005)

3.2.3.3 Zachycení do polymerní matrice

Další fyzikální metodou pro imobilizaci biomolekul je jejich zachycení do gelové matrice (Obr. 9a), která je tvořená syntetickými polymerními látkami (např. PAD nebo PVA), dále polypeptidy (např. kolagenem nebo kaseinem) a polysacharidy (např. agarosem) (Prabhune & SivaRaman, 1991). I když jsou enzymy zabudované do struktury matrice gelu, nacházejí se v roztoku nevázané, tudíž jejich katalytická aktivita se většinou příliš nesníží. Matrice zpřístupňují enzym substrátu, tudíž po ukončení reakce se uvolní požadovaný produkt (Zajoncová & Pospíšková, 2009). Tento typ imobilizace má nevýhodu v tom, že se imobilizovaný enzym postupně uvolňuje z matrice (Cao, 2005).

3.2.3.4 Uzavření mezi semipermeabilní membrány

Tento typ imobilizace se využívá zejména v bioaplikacích (v medicíně). Principem této metody je zabudování biomolekul do lipidové dvouvrstvy (Walde & Ichikawa, 2001) nebo do kapsule z polymerního materiálu (Iso et al., 1989) (Obr. 9c).

Použitím liposomů se umožní transport a cílené intracelulární uvolnění léčiva v tkáni, díky schopnosti liposomů interagovat s buněčnými membránami (Franc et al., 2012). Liposomy poprvé charakterizovali Bangham et al. v roce 1964 jako umělé kruhové vezikuly, které jsou tvořené jednou nebo více fosfolipidovými dvouvrstvami, které mají vlastnosti membrány.

Proces, u kterého dochází k zabudování biomolekuly do kapsule z polymerního materiálu, se nazývá mikroenkapsulace (Iso et al., 1989).

Výhodou této metody je, že enzym se nachází v roztoku volný, pouze je ohraničen membránou. Jelikož se jedná o membrány semipermeabilní, enzym snadno reaguje se substrátem za vzniku žádaného produktu, který se uvolní do prostředí (Zajoncová & Pospíšková, 2009). Mezi hlavní nevýhody této metody patří občasná inaktivace enzymu během mikroenkapsulace a požadovaná vysoká koncentrace enzymu. Navíc velikost pórů musí být dostatečně malá, jelikož systém je omezen difuzí (Costa et al., 2004).

3.2.3.5 Kovalentní vazba

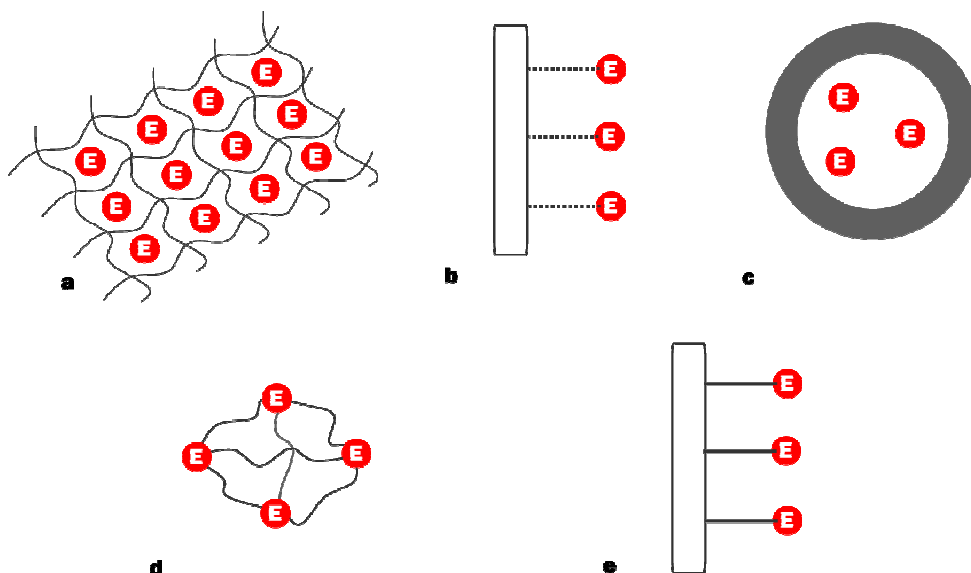
Nejčastější imobilizační metodou je navázání kovalentní vazbou (Obr. 9e). Kovalentní zachycení poskytuje nejsilnější vazbu pro imobilizaci. Pevná vazba může ovlivnit konformaci enzymu natolik, že se jeho afinita k substrátu může zvýšit nebo naopak snížit. Snížení afinity se lze předejít použitím kofaktorů nebo kompetitivních inhibitorů během imobilizace (Cao, 2005).

Povrch magnetického nosiče musí být modifikovaný polymery, jelikož obsahují funkční skupiny (např. NH_2 , OH , SH , COOH nebo CONH_2). Aby se biomolekuly (např. enzymy) mohly navázat, je zapotřebí aktivovat tyto funkční skupiny vhodnými činidly (Cao, 2005).

Například pro aktivaci karboxylových skupin se používají různé sloučeniny karbodiimidů jako aktivační činidla, která zajistí poměrně stabilní produkt (Hong et al., 2007).

Aktivace aminoskupin se provádí pomocí vodného roztoku glutaraldehydu, který stabilizuje výslednou strukturu (Betancor et al., 2006).

Pomocí epichlorhydrinu (Akkaya et al., 2009) nebo bromkyanu (Arica et al., 2000) se aktivují povrchy nosičů obsahující hydroxyskupiny.



Obr. 9 Schematické znázornění imobilizace enzymů. (a) zachycení do polymerní matrice, (b) adsorpce, (c) uzavření mezi semipermeabilní membrány, (d) zesíťení, (e) kovalentní vazba (upraveno dle Zajoncová & Pospíšková, 2009).

3.2.4 Imobilizace lipasy

Imobilizace enzymů, včetně lipas je čím dál více požadována, jelikož mají využití v mnoha aplikacích, ale jejich cena je velmi vysoká. Cíle imobilizace lipas na nosiče jsou snížení nákladů na izolaci a purifikaci, zlepšení vlastností imobilizovaných lipas oproti volným formám (Jaeger & Reetz, 1998).

3.2.5 Využití lipas v praxi

Lipasy nacházejí velké využití ve speciálních organických syntézách, mycích přípravcích, dále oleochemickém, potravinářském, agrochemickém, papírenském

farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Vývoj technologických postupů založených na použití lipasy pro syntézu nových sloučenin rapidně roste (Liese et al., 2000).

3.2.5.1 Lipasy v detergitech

Hlavní komerční aplikací pro hydrolytické lipasy je jejich použití v pracích prostředcích a detergitech. Díky jejich schopnosti hydrolyzovat tuky, nacházejí volné lipasy hlavní použití jako aditivum v pracích prostředcích a detergitech ve všech domácnostech (Masse et al., 2001). Lipasy v detergitech jsou speciálně vybrány tak, aby splňovaly následující požadavky: Enzymy musí mít nízkou substrátovou specifitu, tj. schopnost hydrolyzovat tuky různého složení; dále měly by být schopny odolat relativně drsným podmínkám (pH 10-11, 30-60 °C); a také musí odolat škodlivým surfaktantům a jiným enzymům (například lineárnímu alkyl benzen sulfonátu a proteasam), které jsou také důležitými přísadami v mnoha detergitech. Lipasy s požadovanými vlastnosti jsou získávány přes kombinaci neustálých screening testů (Yeoh et al., 1986) a proteinového inženýrství (Kazlauskas & Bornscheuer, 1998). V roce 1994 společnost Novo Nordisk představila první komerční rekombinantní lipasu „Lipolase“, která byla získána z houby *Thermomyces lanuginosus*, jenž byla exprimována v *Aspergillus oryzae*. Tato geneticky modifikovaná bakterie produkovala velké množství enzymu „Lipolase“ štěpící tuky. Enzym byl použit v celé řadě pracích prostředků po celém světě pro účinné odstranění mastných skvrn (Jaeger & Reetz, 1998).

3.2.5.2 Lipasy v potravinářství

Tuky a oleje jsou důležité složky potravin. Nutriční hodnota, smyslové vnímání a fyzikální vlastnosti TAG jsou značně ovlivněny takovými faktory, jako například umístění mastné kyseliny na uhlíkové kostře glycerolu, délka řetězce mastné kyseliny a také její stupeň nasycení. Lipasy nám dovolují modifikovat vlastnosti lipidů změnou umístění řetězce mastné kyseliny v glyceridech nebo vyměnit jednu nebo více mastných kyselin za jiné. Tímto způsobem relativně levný a méně žádaný lipid může být pozměněn na lipid s lepšími vlastnostmi. Příkladem této modifikace, zprostředkovávající imobilizovaná lipasa, je tvorba mléčného tuku, který je podobný lidskému lipidu v mateřském mléce, což je využito v dětské výživě, a také výroba náhražek kakaového másla (Undurraga et al., 2001).

Čokoláda se vyrábí z kakaové hmoty, kakaového másla, sacharidů a emulgátorů. Kakaové máslo je nažloutlý rostlinný tuk, který získáme lisováním kakaových bobů. Jeho bod tání se pohybuje okolo 37 °C. Po vložení čokolády do úst se dostaví příjemný chladivý pocit právě kvůli tání kakaového másla. Kakaové máslo obsahuje kyselinu palmitovou, stearovou a olejovou. Technologie založená na spojení hydrolytických a syntetických reakcí katalyzované lipasou se běžně používají pro zlepšení kvality některých méně žádoucích (povolených vyhláškou) náhražek rostlinných tuků za kakaové máslo (Undurraga et al., 2001). Jeden z možných postupů výroby kvalitnějších náhražek je použití imobilizované lipasy získané z půdní houby *Rhizomucor miehei*. Reakcí, kterou katalyzuje imobilizovaná lipasa, je transesterifikace, při které se zamění kyselina stearová za kyselinu palmitovou v palmovém oleji, který je nejčastějším příkladem takovéto náhražky v čokoládě. (Pabai et al., 1995a).

Díky pozitivním metabolickým účinkům na lidské zdraví jsou polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) čím dál více používány jako farmaceutika, nutraceutika a potravinové doplňky (Gill & Valivety, 1997a). Mnoho PUFA jsou nezbytné pro normální syntézu lipidových membrán a prostaglandinů. Neimobilizované mikrobiální lipasy jsou používány k získání PUFA ze živočišných a rostlinných lipidů. Volné PUFA a jejich mono- a diglyceridy jsou následně používány k výrobě různých farmaceutik (Gill & Valivety, 1997b).

Navíc se volné lipasy používají pro vývoj chutí při zrání sýra, pro výrobu potravinářských barviv a emulgátorů podporující chuť jídla a nápojů. Také jsou lipasy užitečné při odstraňování tuků z produktů masa a ryb (Kazlauskas & Bornscheuer, 1998).

3.2.5.3 Lipasy v papírenském průmyslu

Pryskyřice nebo jiné hydrofobní komponenty dřeva, zejména triglyceridy a vosky, způsobují několik problémů v papírenském a dřevozpracujícím průmyslu. Lipasy jsou používány v procesech, které zajišťují odstranění právě těchto hydrofobních komponent. Společnost Nippon Paper sídlící v Japonsku vyvinula metodu na kontrolu množství přítomné pryskyřice ve dřevě. V této metodě se používala volná lipasa z kvasinky *Candida rugosa* k hydrolýze více než 90 % triglyceridů z dřeva (Jaeger & Reetz, 1998).

3.2.5.4 Lipasy v organické syntéze

Aplikace volných lipas v organické syntéze se stává stále více důležité, jelikož katalyzují široké spektrum chemo-, regio- a stereoselektivních transformací. Většina lipas, které se používají jako katalyzátory v organické chemii jsou mikrobiálního původu. Tyto enzymy jsou schopny se účastnit reakce jen u hydrofilní-lipofilního fázového rozhraní a tolerují organická rozpouštědla v reakční směsi (Berglund & Hutt, 2000).

Enzymy katalyzují hydrolýzu triglyceridů, které nejsou mísitelné s vodou na rozhraní voda-kapalina. Množství vody přítomné v reakční směsi je určujícím faktorem pro určení typu katalýzy. Pokud je prostředí bezvodé nebo je přítomno malé množství vody, jsou upřednostněny esterifikace a transesterifikace. Při nadbytku vody probíhá hydrolytická reakce (Klibanov, 1997).

3.2.5.5 Lipasy v syntéze esterů

Volné lipasy (Janssen et al., 1999) i imobilizované lipasy (Krishnakant & Madamwar, 2001) jsou úspěšně používány jako katalyzátory pro syntézu esterů. Estery tvořené krátkými řetězci mastných kyselin mají aplikaci jako chuťová činidla v potravinářství. Methylestery a ethylestery tvořené dlouhými řetězci mastných kyselin se dají použít jako obohacené dieselové palivo (Vulfson, 1994).

Ačkoli lipasy patří mezi hydrolytické enzymy, které štěpí esterové vazby TAG, mohou také katalyzovat reverzní reakce (syntézu esterů) v prostředí o malém množství vody. Důležitou reakcí při syntéze esterů je transesterifikace. V závislosti na substrátu, lipasy mohou katalyzovat acidolýzu (reakce esteru a karboxylové kyseliny za vzniku jiného esteru), alkoholýzu (reakce esteru a alkoholu za vzniku jiného esteru) a interesterifikace (reakce dvou esterů za vzniku esterů s vyměněnými acylovými zbytky) (Balcão et al., 1996).

3.2.5.6 Lipasy v oleochemickém průmyslu

Použití imobilizovaných lipas v oleochemickém průmyslu se zaměřuje na reakce, u kterých dochází k uchování energie a minimalizaci teplotní degradace během alkoholýzy, acidolýzy, hydrolýzy a glycerolýzy (Vulfson, 1994).

V oleochemickém průmyslu nachází uplatnění výroba biopaliv. Biopaliva se vyrábí z biomasy, což je hmota organického původu (živočišného i rostlinného), také zahrnuje produkty a odpady dřevozpracujícího průmyslu, komunální a jiné průmyslové odpady. Podmíněná je zde biodegrace (Šebor et al., 2006).

Využívání biopaliv má mnoho výhod. Jedna z výhod je, že biopaliva se řadí mezi obnovitelné zdroje energie na rozdíl od fosilních paliv, která se sice tvořila v průběhu několika geologických období, ale mohou být rychle vyčerpána. Další výhodou je snížení závislosti států na jiných státech, které ropu vyvážejí a také by se minimalizovaly přírodní katastrofy, které způsobují tankery převážející ropu. Dále využíváním biopaliv se sníží tvorba emisí skleníkových plynů (CO₂) do ovzduší (Šebor et al., 2006).

Využívání biopaliv přináší také negativa. Výroba biopaliv je po energetické stránce náročný proces, který zahrnuje pěstování a samotné zpracování rostlin. Z tohoto důvodu je produkce CO₂ u biopaliv první generace okolo 50 % z uspořené tvorby CO₂, u biopaliv druhé generace se tato hodnota výrazně snížila. Objektivní posouzení vyprodukovaných emisí CO₂ musí zahrnovat celý jeho cyklus v prostředí, tj. tvorba CO₂ při udržování růstu rostliny až po finální spálení biopaliva ve vozidle. Nemalým problémem je také zabránění výsadbové plochy pro rostliny. Může dojít ke kácení pralesů nebo k vytlačení plodin určené k potravě. Aplikace biopaliv přináší i technické problémy. Spalovací motory by musely projít úpravami pro možnost používání biopaliv (Hromádka et al., 2010).

Mezi světově využívané biopaliva se řadí bioethanol a bionafta. Podstatou výroby bionafty (methylestery mastných kyselin) je transesterifikace esterů MK a glycerolu, triglyceridů za katalýzy lipasou. Základními surovinami pro výrobu jsou rostlinný olej, který se získává z olejnatých rostlin, jako například sója, řepka olejná nebo slunečnice, nebo živočišný tuk získaný z ryb, skotu, drůbeže nebo prasat a methanol. Jako alternativa se může použít již upotřebené fritovací oleje (Šebor et al., 2006).

3.2.5.7 Lipasy ve farmaceutickém průmyslu

Farmaceutické společnosti kladou důraz na zefektivnění metod pro průmyslovou syntézu čistých enantiomerů vykazujících chiralitu, tj. biologicky aktivních látek. Mezi tyto látky patří protizánětlivá léčiva, léčiva tlumící bolest a horečnaté stavy jako naproxen (Xin et al., 2001) a ibuprofen (Lee et al., 1995). Dále jsou imobilizované

lipasy použity v syntéze antihypertenzivních léčiv (inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu) a léků, které slouží k blokaci membránových vápenatých kanálů (Berglund & Hutt, 2000).

4 Experimentální část

4.1 Materiály a chemikálie

Dihydrogenfosforečnan draselný (Merck, Německo)

Ethanol (96%, denaturovaný) (lihovar Kojetín)

Hydrogenfosforečnan draselný (Merck, Německo)

Hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR)

Jodistan sodný (Sigma Aldrich, USA)

Kyselina boritá (Chemapol, ČR)

Kyselina octová ($\geq 99,7\%$) (Sigma Aldrich, USA)

Kyselina trihydrogenfosforečná (85%) (Chemapol, ČR)

Lipasa z *Candida rugosa* (Sigma Aldrich, USA)

Magnetické celulosové mikročástice Perloza MG 200 (Iontosorb, Ústí nad Labem)

p-nitrofenylbutyrát (Sigma Aldrich, USA)

4.2 Přístroje

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Automatické pipety 1-5000 μ l (Eppendorf, Německo)

Digitální pH metr (WTW, Německo)

Programovatelný rotátor (Biosan, Litva)

Spektrofotometr Biochrom WPA (Biochrom Ltd., Velká Británie)

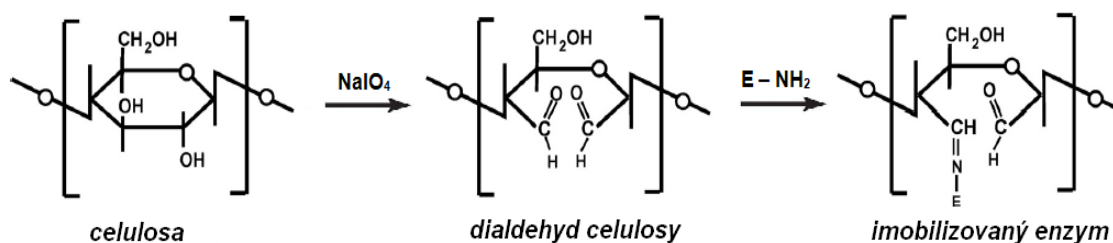
Termostat (Grant, Velká Británie)

Vortex MS-1 (IKA, Německo)

4.3 Metody

4.3.1 Příprava imobilizované lipasy na magnetické celulosové mikročástice

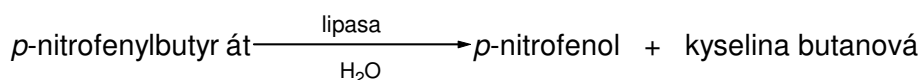
Magnetické celulosové mikročástice Perloza MG 200 (MCM) o standardní velikosti v rozsahu 50-80 μm byly rozsuspendovány v 300 μl 0,1 mol.l^{-1} NaIO_4 za stálého míchání a třepání na rotátoru po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po aktivaci celulosové vrstvy jodistanem sodným byly MCM třikrát promyty pufrům (0,05 mol.l^{-1} K-P_i, pH = 7,5). Pak se k aktivovaným částicím přidal 300 μl roztok lipasy (1 mg lipasy z *C. rugosa* na 1 ml 0,05 mol.l^{-1} K-P_i, pH = 7,5), který se nechal míchat na rotátoru přes noc pro efektivní navázání enzymu (Obr. 10).



Obr. 10 Schéma aktivace celulosové vrstvy magnetických mikročástic a následná imobilizace lipasy (upraveno dle Namdeo & Bajpai, 2009).

4.3.2 Stanovení aktivity lipasy

Aktivita lipasy z *C. rugosa* byla stanovena spektrofotometricky. Při měření aktivity byl použit umělý substrát, a to *p*-nitrofenylbutyrát, který je lipasou hydrolyzován dle rovnice (Obr. 11) za vzniku barevného produktu *p*-nitrofenolu. Jelikož maximální absorbance *p*-nitrofenolu se nachází ve žluté oblasti, aktivita byla proměřována při vlnové délce 405 nm.



Obr. 11 Rovnice hydrolýzy umělého substrátu *p*-nitrofenylbutyrátu.

Při měření aktivity volné lipasy se do skleněné kyvety napipetovalo 1980 μl pufru (0,05 mol.l^{-1} K-P_i, pH = 7,5), 10 μl *p*-nitrofenylbutyrátu (35,1 mmol.l^{-1} v ethanolu)

a po promíchání se přidalo 10 µl roztoku lipasy z *C. rugosa* (1 mg.ml⁻¹) v pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5). Zaznamenávala se změna absorbance v intervalu 30 s po dobu 2,5 minuty.

Při měření aktivity imobilizované lipasy se do skleněné kyvety přepipetovalo 10 mg MCM s imobilizovanou lipasou a bylo přidáno 1990 µl pufru (0,05 mol.l⁻¹ KP_i, pH = 7,5). Enzymová reakce byla zahájena přidáním 10 µl substrátu *p*-nitrofenylbutyrátu (35,1 mmol.l⁻¹ v ethanolu). Reakce probíhala za stálého míchání. Absorbance se odečítala vždy po usazení částic na dno kyvety (pomocí vnějšího magnetického pole – magnetu) v časových intervalech (30 s) po dobu 2,5 minut.

Aktivita byla získána ze vztahu (1)

$$\frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\varepsilon \cdot l}, \text{ kde} \quad (1)$$

$\Delta n / \Delta t$ je aktivita (kat), ΔA je změna absorbance, Δt je časový interval (s), V je celkový objem vzorku v kyvetě (dm³), ε je molární absorpční koeficient (dm³/mol.l⁻¹.cm⁻¹), l je délka optické dráhy (cm).

Výše uvedený postup měření aktivity lipasy (volné, imobilizované) je u všech podkapitol shodný, obměňují se pouze proměnné (pH, teplota, znovupoužití, skladování při laboratorní teplotě nebo v lednici).

4.3.2.1 Stanovení závislosti aktivity lipasy na teplotě

Stanovení aktivity volné lipasy z *C. rugosa* v závislosti na teplotě bylo zjištěno tak, že vzorky roztoků lipasy (1 mg.ml⁻¹) v pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5) byly inkubovány při různých teplotách (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C) po dobu 30 minut. Po ochlazení v ledové lázni bylo odpipetováno 10 µl roztoku a přidáno k 1980 µl pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5) a 10 µl substrátu (35,1 mmol.l⁻¹ v ethanolu). Závislost aktivity imobilizované lipasy z *C. rugosa* na teplotě byla stanovena za stejných podmínek, ale místo 10 µl roztoku lipasy (1 mg.ml⁻¹) v pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5) bylo přidáno 10 µl pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5) a 10 mg imobilizované lipasy na MCM. Pro porovnání aktivit volné a imobilizované lipasy byla určena hodnota T_{50} , což je teplota, při které aktivita enzymu klesne právě na polovinu zjištěné maximální hodnoty.

4.3.2.2 Stanovení závislosti aktivity lipasy na pH

Závislost aktivity volné lipasy z *C. rugosa* na pH byla porovnána pomocí roztoků K-P_i pufru (0,05 mol.l⁻¹) o různých hodnotách pH v rozsahu jeho pufrální kapacity (5,6; 6; 6,5; 7; 7,5; 8) a pomocí Britton-Robinsonova pufru (0,04 mol.l⁻¹) o různých hodnotách pH v rozsahu jeho pufrální kapacity (4,10; 5,02; 6,59; 7; 7,54; 7,96; 8,95; 9,15). Celkové množství pufru bylo 1980 µl, dále bylo přidáno 10 µl substrátu (35,1 mmol.l⁻¹ v ethanolu). Reakce byla startována 10 µl roztoku lipasy (1 mg.ml⁻¹) v pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5). Závislost aktivity imobilizované lipasy z *C. rugosa* na pH byla porovnána za stejných podmínek, ale místo 10 µl roztoku lipasy (1 mg.ml⁻¹) v pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5) bylo přidáno 10 µl roztoku K-P_i pufru (0,05 mol.l⁻¹, pH = 5,6; 6; 6,5; 7; 7,5; 8), resp. Britton-Robinsonova pufru (0,04 mol.l⁻¹, pH = 4,10; 5,02; 6,59; 7; 7,54; 7,96; 8,95; 9,15) a 10 mg imobilizované lipasy na MCM.

4.3.2.3 Funkční časová stabilita lipasy

Aktivita volné lipasy z *C. rugosa* při stanovení funkční časové stability lipasy byla proměřována v různých časových intervalech po dobu 24 hodin (po 0,33; 1; 2,5; 5; 8; 10; 24 hodinách). Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě. Do skleněné kyvety bylo napipetováno 1980 µl pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5), 10 µl inkubovaného vzorku roztoku lipasy (1 mg.ml⁻¹) v pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5). Enzymová reakce byla zahájena přidáním 10 µl substrátu (35,1 mmol.l⁻¹ v ethanolu). Funkční časová stabilita imobilizované lipasy z *C. rugosa* byla určena za stejných podmínek, ale místo 10 µl roztoku lipasy (1 mg.ml⁻¹) v pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5) bylo přidáno 10 µl pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5) a 10 mg imobilizované lipasy na MCM.

4.3.2.4 Skladovací stabilita lipasy

Stabilita volné lipasy z *C. rugosa* při skladování byla určena tak, že se proměřila její aktivita v určitých časových intervalech po dobu 22 dní. Vzorky byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C. Do skleněné kyvety bylo napipetováno 1980 µl pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5), 10 µl uskladněného vzorku lipasy (1 mg.ml⁻¹) v pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5). Počátek reakce byl zahájen připipetováním 10 µl substrátu (35,1 mmol.l⁻¹ v ethanolu). Skladovací stabilita imobilizované lipasy z *C. rugosa* byla určena za stejných podmínek, ale místo 10 µl roztoku lipasy (1 mg.ml⁻¹) v pufru

(0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5) bylo přidáno 10 µl pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5) a 10 mg imobilizované lipasy na MCM.

4.3.2.5 Operační stabilita imobilizované lipasy

Pro zjištění operační stability (opakované použití) imobilizované lipasy z *C. rugosa* byl použit jeden vzorek MCM s imobilizovanou lipasou, u kterého se měřila aktivita lipasy v jednotlivých cyklech měření. První měření bylo určeno jako 100 %. Do kyvety s MCM s imobilizovanou lipasou bylo připipetováno 1990 µl pufru (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5) a enzymová reakce byla startována 10 µl substrátu (35,1 mmol.l⁻¹ v ethanolu). Aktivita byla stanovována v 8 cyklech měření, kdy mezi jednotlivými cykly byly magnetické mikročástice separovány (magnetem), dále nezreagovaný substrát a produkt byly odpipetován a mikročástice byly promyty šestkrát pufrům (0,05 mol.l⁻¹ K-P_i, pH = 7,5).

5 Literatura

Akgöl S., Kacar Y., Denizli A., Arica M. Y. (2001a) Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chem.* **3**, 281-288.

Akgöl S., Kaçar Y., Özkara S., Yavuz H., Denizli A., Arica M. Y. (2001b) Immobilization of catalase via adsorption onto L-histidine grafted functional PHEMA based membrane. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **15**, 197-206.

Akkaya B., Şahin F., Demirel G., Tümtürk H. (2009) Functional polymeric supports for immobilization of cholesterol oxidase. *Biochem. Eng. J.* **43**, 333-337.

Arica M. Y., Yavuz H., Patir S., Denizli A. (2000) Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **11**, 127-138.

Arroyo M., Sinisterra J. V. (1995) Influence of chiral corvones on selectivity of pure lipase-B from *Candida antarctica*. *Biotechnol. Lett.* **17**, 525-530.

Bajerová M., Dvořáčková K., Gajdziok J., Masteiková R., Rabišková M. (2009) Metody přípravy mikročastic ve farmaceutické technologii. *Czech Slov. Farm.* **58**, 191-198.

Balashov K., Jensen T. R., Kjaer K., Bjornholm T. (2001) Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces: Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie* **83**, 387-397.

Balcão V. M., Paiva A. L., Malcata F. X. (1996) Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 392-416.

Ballot C., Favre-Bonvin G., Wallach J. M. (1982) Conductimetric assay of a bacterial lipase, using triacetin as a substrate. *Anal. Lett.* **15**, 119-129.

Bangham A. D., Horne R. W. (1964) Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* **8**, 660-668.

Bayramoglu G., Arica M. Y. (2008) Preparation of poly (glycidylmethacrylate-methylmethacrylate) magnetic beads: Application in lipase immobilization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **55**, 76-83.

Bayramoglu G., Yilmaz M., Senel A. U., Arica M. Y. (2008) Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption. *Biochem. Eng. J.* **40**, 262-274.

Berglund P., Hutt K. (2000) Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases. In *Stereoselective biocatalysis* (Patel R. N., ed.), pp. 633-657, Marcel Dekker, New York, USA.

Betancor L., Lopez-Gallego F., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Mateo C., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M. (2006) Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enz. Microb. Technol.* **39**, 877-882.

Braddo S., Rathi P., Saxena R. K., Gupta R. (2002) Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. *J. Biochem. Biophys. Methods* **51**, 115-120.

Bradoo S., Saxena R. K., Gupta R. (1999) Two acidothermotolerant lipases from new variant of *Bacillus* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 87-91.

Bryjak J. (2003) Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilization on acrylic carriers. *Biochem. Eng. J.* **16**, 347-355.

Cao L. (2005) Carrier-bound immobilized enzymes - Principles, applications and design, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Ciofani G., Raffa V., Menciassi A., Cuschieri A., Micera S. (2009) Magnetic alginate microspheres: system for the position controlled delivery of nerve growth factor. *Biomed. Microdevices* **11**, 517-527.

Colet J. M., Muller R. N. (1994) Effect of opsonins on the uptake of magnetic starch microspheres by rat Kupffer cells. *Magn. Reson. Mater. Phys., Biol. Med.* **2**, 303-305.

Costa S. A., Azevedo H. S., Reis R. L. (2004) Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. In *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative medicine* (Reis R. L., Román J. S., ed.), pp. 301-317, CRC Press, Boca Raton.

Dandmann N., Collet E., Leijen J., Uhlen M., Veide A., Nygren P. A. (2000) Genetic engineering of the *Fusarium solani pisi* lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems. *J. Biotechnol.* **79**, 161-72.

Davranov K. (1994) Microbial lipases in biotechnology (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **30**, 527-534.

- Dellamora-Ortiz G. M., Marins R. C., Rocha W. L., Dias A. P. (1997) Activity and stability of *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **26**, 111-116.
- Dharmsthiti S., Kuhasuntisuk B. (1998b) Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 75-80.
- Dharmsthiti S., Pratuangdejkul J. Theeragool G. T. Luchai S. (1998a) Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**, 139-145.
- Dohányos M., Šmejkalová P. (2006) Biotechnologie v ochraně životního prostředí, pp. 30-31, VŠCHT - Ústav technologie vody a prostředí, Praha, ČR
- Eldin M. S. M., Schoën C. G. P. H., Janssen A. E. M., Mita D. G., Tramper J. (2000) Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **10**, 445-451.
- Ettenauer M., Fischer S., Thummler K., Weber V., Falkenhagen D. (2010) Synthesis of magnetic cellulose microparticles as matrix for markers in extracorporeal blood purification. *Int. J. Artif. Organs* **33**, 452-452.
- Exnar P. (1985) Porézní sklo – příprava, vlastnosti a použití. *Chem. Listy* **79**, 958-970.
- Ferrato F., Carriere F., Sarda L., Verger R. (1997) A critical re-evaluation of the phenomenon of „interfacial activation“. In *Methods Enzymol.* (Dennis E., Rubin B., ed.), pp. 327-347, Academic Press, New York, USA.
- Finkelstein A. E., Strawich E. S., Sonnino S. (1970) Characterization and partial purification of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **206**, 380-391.
- Franc A., Vetchý D., Smilková L., Rabišková M., Kratochvíl B. (2012) Lipofilní formulace pro zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek. *Chem. Listy* **106**, 3-9.
- Frikha F., Miled N., Bacha A. B., Mejdoub H., Gargouri Y. (2010) Structural Homologies, Importance for Catalysis and Lipid Binding of the N-Terminal Peptide of a Fungal and a Pancreatic Lipase. *Protein Pept. Lett.* **17**, 254-259.
- Gargouri Y., Julian R., Sugihara A., Verger R., Sarda L. (1984) Inhibition of pancreatic and microbial lipase by proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 326-331.

- Ghosh P. K., Saxena R. K., Gupta R., Yadav R. P., Davidson S. (1996) Microbial lipases: production and applications. *Sci. Prog.* **79**, 119-157.
- Gill I., Valivety R. (1997a) Polyunsaturated fatty acids: Part 1. Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* **15**, 401-409.
- Gill I., Valivety R. (1997b) Polyunsaturated fatty acids: Part 2. Biotransformations and biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* **15**, 470-478.
- Godfrey T., West S. (1996) Introduction to industrial enzymology, pp. 1-8, Stockton Press, New York, USA.
- Godtfredsen S. E. (1990) Microbial lipases. In *Microbial enzymes and biotechnology* (Fogarty W. M., Kelly E. T., ed.), pp. 255-274, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Graham D. L., Ferreira H., Bernardo J., Freitas P. P., Cabral J. M. S. (2002) Single magnetic microsphere placement and detection on-chip using current line design with integrated spin valve sensors: Biotechnological applications. *J. Appl. Phys.* **91**, 7786-7788.
- Gray G. L., Poulouse A. J., Power S. D., Stanislow A. G., Wiersema R. J. (1988) Enzymatic per hydrolysis system for *in situ* peracid generation - contg. A *Pseudomonas putida* hydrolase, a substrate and a source of per oxygen. EP 268456.
- Gu L., Park J. H., Duong K. H., Ruoslagti E., Sailor M. J. (2010) Magnetic Luminescent Porous Silicon Microparticles for Localized Delivery of Molecular Drug Payloads. *Small* **6**, 2546-2552.
- Gupta R., Gupta N., Rathi P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 763-781.
- Hasan F. Shah A. A., Hameed A. (2009) Methods for detection and characterization of lipase: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* **27**, 782-798.
- Hermanson G. T., Pallia A. K., Smith P. K. (1992) Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press, San Diego, USA.
- Higaki S. (2003) Lipase inhibitors for the treatment of acne. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **22**, 377-384.
- Hill C. R., Thompson L. G., Kenney A. C. (1989) Immunopurification. In *Protein Purification Methods* (Harris E. L. V., Angal S., ed.), pp. 282-292, IRL Press, New York, USA.

- Hong J., Gong P., Xu D., Dong L., Yao S. (2007) Stabilization of α -chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. *J. Biotechnol.* **128**, 597-605.
- Horák D., Babič M., Macková H., Beneš M. J. (2007) Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *J. Sep. Sci.* **30**, 1751-1772.
- Hromádko J., Hromádko J., Miler P., Hönig V., Cindr M. (2010) Technologie výroby biopaliv druhé generace. *Chem. Listy* **104**, 784-790.
- Hsing I. M., Xu Y., Zhao W. T. (2007) Micro- and nano- magnetic particles for applications in biosensing. *Electroanalysis* **19**, 755-768.
- Hu B., Pan J., Yu H. L., Liu J. W., Xu J. H. (2009) Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate. *Process Biochem.* **44**, 1019-1024.
- Huge-Jensen B., Galluzzo D. R., Jensen R. G. (1987) Partial-purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. *Lipids* **22**, 559-565.
- Hyeon T., Lee S. S., Park J., Chung Y., Bin Na H. (2001) Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12798-12801.
- Chowdary G. V., Ramesh M. N., Prapulla S. G. (2001) Enzymatic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: multivariate analysis. *Process Biochem.* **36**, 331-339.
- Iizumi T., Nakamura K., Fukase T. (1990) Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* **545**, 1253-1258.
- Iso M., Shirahase T., Hanamura S., Urushiyama S., Omi S. (1989) Immobilization of enzyme by microencapsulation and application of the encapsulated enzyme in the catalysis. *J. Microencap.* **6**, 165-176.
- Iwai M., Fukumoto J., Tsujisaka Y. (1964) Studies on lipase .2. hydrolytic + esterifying actions of crystalline lipase of *Aspergillus niger*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **10**, 13-22.

- Jaeger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Vanheuver M., Misset O. (1994) Bacterial lipase. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 29-63.
- Jaeger K. E., Reetz T. M. (1998) Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**, 396-403.
- Janssen E. M., Sjurenes J. B., Vakurov A. V., Halling P. J. (1999) Kinetic of lipase-catalyzed esterification in organic media: correct model and solvents effects on parameters. *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 463-470.
- Janssen P. H. Monk C. R. Morgan H. W. (1994) A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its *p*-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **120**, 195-200.
- Jeong J., Ha T. H., Chung B. H. (2006) Enhanced reusability of hexa-argine-tagged esterase immobilized on gold-coated magnetic nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **569**, 203-209.
- Jia W. J., Liu J. G., Zhang Y. D., Wang J. W., Wang J., Sun C. Y., Pan Y. F., Yu C., Li G. Z., Zhang H., Gou M. L., Tu M. J., Qian Z. Y. (2007) Preparation, characterization, and optimization of pancreas-targeted 5-Fu loaded magnetic bovine serum albumin microspheres. *J. Drug Targeting* **15**, 140-145.
- Kaminski M. D., Xie Y. M., Mertz C. J., Finck M. R., Chen H. T., Rosengart A. J. (2008) Encapsulation and release of plasminogen activator from biodegradable magnetic microcarriers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **35**, 96-103.
- Kazlauskas R. J., Bornscheuer U. T. (1998) Biotransformations with lipases. In *Biotechnology, Vol. 8* (Rehm H. J., Pihler G., Stadler A., Kelly P. J. W., ed.), pp. 37-192, VCH, New York, USA.
- Klibanov A. M. (1990) Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc. Chem. Res.* **23**, 114-20.
- Klibanov A. M. (1997) Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.* **15**, 97-101.
- Kojima Y., Yokoe M., Mase T. (1994) Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1564-1568.

- Kordel M., Hofmann B., Schomburg D., Schmid R. D. (1991) Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. *J. Bacteriol.* **173**, 4836-4841.
- Krishnakant S., Madamwar D. (2001) Ester synthesis by lipase immobilized on silica and microemulsion based organo-gels (MBGs). *Process Biochem.* **36**, 607-611.
- Kuo C. H., Liu Y. C., Chang C. M. J., Chen J. H., Chang C., Shieh C. J. (2012) Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **87**, 2538-2545.
- Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L. V., Muller R. N. (2008) Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterization, and biological applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064-2110.
- Lee O. W., Koh Y. S., Kim K. J., Kim B. C., Choi H. J., Kim D. S., Suhartono M. T., Pyun Y. R. (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, 393-400.
- Lee W. M., Kim K. J., Kim M. G., Lee S. B. (1995) Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: effects of organic cosolvents and temperature. *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 613-615.
- Lei Z., Bi S., Hu B., Yang H. (2007) Combined magnetic and chemical covalent immobilization of pectinase on composites membranes improves stability and activity. *Food Chem.* **105**, 889-896.
- Lengsfeld D. H., Wolfer H. (1988) Inhibition of pancreatic lipase *in vitro* by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem. J.* **256**, 357-361.
- Levisson M., Oost J., Kengen S. W. M. (2009) Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles* **13**, 567-581.
- Liese A., Kihumbu D., Wandrey C. (2000) Industrial biocatalysis: Past, present, and future. *Org. Process Res. Dev.* **4**, 286-290.
- Lin S. F., Chiou C. M., Yeh C., Tsai Y. C. (1996) Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1093-1095.

Liu J. W., Zhang Y., Chen D., Yang T., Chen Z. P., Pan S. Y., Gu N. (2009) Facile synthesis of high-magnetization γ -Fe₂O₃/alginate/silica microspheres for isolation of plasma DNA. *Colloids Surf., A* **341**, 33-39.

Lolis E., Petsko G. (1990) Transition state analogues in protein crystallography probes of the structural source of enzyme catalysis. *Annu. Rev. Biochem* **59**, 597-630.

Lopez-Gallego F., Betancor L., Mateo C., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Guisan J. M., Fernández-Lafuente R. (2005) Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J. Biotechnol.* **119**, 70-75.

Lotti M., Alberghina L. (2007) Lipases: molecular structure and function. In *Industrial Enzymes* (Polaina J., MacCabe A. P., ed.), pp. 263-281, Springer, Dept. of Biotechnology and Biosciences, University of Milano-Bicocca, Milano, Italy.

Louwrier A., Drtin G. J., Klivanov A. M. (1996) On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 1-5.

Lowry R. L., Tinsley I. J. (1976) Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **53**, 470-472.

Lupescu I., Groposila-Constantinescu D., Jurcoane S., Diguta C., Cozea A., Tcacenco L. (2007) Production of lipase by a strain of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* and isolation of crude enzyme. *Rom. Biotechnol. Lett.* **12**, 3261-3268.

Massart R. (1981) Preparation of aqueous magnetic liquids in alkalit and acidic media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247-1248.

Masse L., Kennedy K. J., Chou S. P. (2001) The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction fat particles in slaughterhouse wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **48**, 105-109.

Mateo C., Abian O., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M. (2000) Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 98-105.

Mateo C., Palomo J. M., Fenandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selektivty via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451-1463.

Menge U., Hecht H. J., Schomburg D., Schmid R. D. (1990) Crystallization and preliminary X-ray studie sof lipase from *Geotrichum candidum*. In *Lipases: Structure,*

Mechanism and Genetic Engineering (GBF Monographs) (Alberghina L., Schmid R. D., Verger R., ed.), pp. 59-62, VCH, Weinheim, The Germany.

Misset O., Gerritse G., Jaeger K. E., Winkler U., Colson C., Schanck K., Lesuisse E., Dartois Y., Blaawoo M., Ransac S., Dijkstra B. W. (1994) The structure function relationship of the lipases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Protein Eng.* **7**, 523-529.

Montero S., Blanco A., Virto M. D., Landeta C., Agud I., Rodolfo S., Lascaray J. M., Renobales M., Llama M. J., Serra J. L. (1993) Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 239-247.

Muraoka T., Ando T., Okuda H. (1982) Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. *J. Biochem.* **92**, 1933-1939.

Namdeo M., Bajpai S. K. (2009) Immobilization of α -amylase onto cellulose-coated magnetite (CMM) nanoparticles and preliminary starch degradation study. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **59**, 134-139.

Nardini M., Lang D. A., Liebeton K., Jaeger K. E., Dijkstra B. M. (2000) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the conformation – The prototype for family I. 1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **275**, 31219-31225.

Nawani N., Kaur J. (2000) Purification, characterization and thermostability of a lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Mol. Cell. biochem.* **206**, 91-96.

Pabai F., Kermasha S., Morin A. (1995a) Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 669-677.

Pabai F., Kermasha S., Morin A. (1995b) Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: partial purification, characterization and interesterification of butter fat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 42-51.

Patkar S. A., Bjorkling F. (1994) Lipase inhibitors. In *Lipases – their structure, biochemistry and applications* (Woodley P., Peterson S. B., ed.), pp. 207-224, Cambridge Univ. Press, Cambridge, Great Britain.

Pei W., Kumada H., Natusme T., Saito H., Ishio S. (2007) Study on magnetite nanoparticles synthesized by chemical method. *J. Magn. Mater.* **310**, 2375-2375.

- Phadtare S., Vinod V. P., Mukhopadhyay K., Kumar A., Rao M., Chaudhari R. V., Sastry M. (2004) Immobilization and biocatalytic activity of fungal protease on gold nanoparticles-loaded zeolite microspheres. *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 629-637.
- Pleiss J., Fisher M., Schmid R. D. (1998) Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding sites. *Chem. Phys. Lipids* **93**, 67-80.
- Pleva P. (2010) Inhibiční vliv monoacylglycerolů na bakterie rodu *Lactococcus*. pp. 15-20, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, ČR.
- Ponvel K. M., Lee D. G., Woo E. J., Ahn I. S., Lee C. H. (2009) Immobilization of lipase on surface modified magnetic nanoparticles using alkyl benzenesulfonate. *Korean J. Chem. Eng.* **26**, 127-130.
- Prabhune A., SivaRaman H. (1991) Immobilization of penicillin acylase in porous beads of polyacrylamide-gel. *App. Biochem. Biotechnol.* **30**, 265-272.
- Razak C. N. A., Salleh A. B., Musani R., Samad M. Y., Basri M. (1997) Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **3**, 153-159.
- Ren Y., Rivera J. G., He L., Kulkarni H., Lee D. K., Messersmith P. B. (2011) Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC Biotechnol.* **11**, 63.
- Riaz M., Shah A. A., Hameed A., Hasan F. (2010) Characterization of lipase produced by *Bacillus sp.* FH5 in immobilized and free state. *Ann. Microbiol.* **60**, 169-175.
- Sakaki K., Hara S., Itoh N. (2002) Optical resolution of racemic 2-hydroxy octanoic acid using biphasic enzyme membrane reactor. *Desalination* **149**, 247-252.
- Samsel P. A., Kiwiswa L., Erichsen J. T., Cross S. D., Morgan J. E. (2011) A Novel Method for the Induction of Experimental Glaucoma Using Magnetic Microspheres. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **52**, 1671-1675.
- Saxena R. K., Sheoran A., Giri B., Davidson W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases, *J. Microbiol. Methods* **52**, 1-18.
- Schmidt-Dannert C., Sztajer H., Stocklein W., Menge U., Schmid R. D. (1994) Screening purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1214**, 43-53.

- Smeltzer M. S., Hart M. E., Iandolo J. J. (1992) Quantitative spectrophotometric assay for *Staphylococcal* lipase. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2815-2819.
- Snellman E. A., Colwell R. R. (2008) Transesterification activity of a novel lipase from *Acinetobacter venetianus* RAG-1. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**, 621-625.
- Snellman E. A., Sullivan E. R., Colwell R. R. (2002) Purification and properties of the extracellular lipase, Lip A, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5881-5779.
- Stuer W., Jaeger K. E., Winkler U. K. (1986) Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **168**, 1070-1074.
- Sugihara A., Tani T., Tominaga Y. (1991) Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J. Biochem.* **109**, 211-216.
- Suzuki M., Yamamoto H., Mizugaki M. (1986) Purification and general properties of a metal – insensitive lipase from *Rhizopus japonicus* NR. 400. *J. Biochem.* **100**, 1207-1213.
- Svendsen A. (1994) Sequence comparisons within the lipase family. In *Lipases – their structure, biochemistry and applications* (Woodlley P., Peterson S. B., ed.), pp. 1-21, Cambridge Univ. Press, Cambridge, Great Britain.
- Sztajer H., Bryjak M. (1989) Capillar membranes for purification of *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Bioprocess Eng.* **4**, 257-259.
- Sztajer H., Lunsdorf H., Erdman H., Menge U., Schmid R. (1992) Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1124**, 253-261.
- Šafařík I., Šafaříková M. (2009) Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. *Chem. Pap.* **63**, 497-505.
- Šafaříková M., Šafařík I. (1995) Magnetic separations in biosciences and biotechnologies. *Chem. Listy* **89**, 280-287.
- Šebor G., Pospíšil M., Maxa D. (2006) Využití kapalných biopaliv pro pohon motorových vozidel. *Chem. Listy* **100**, 30-35.
- Tataru G., Popa M., Desbrieres J. (2011) Magnetic microparticles based on natural polymers. *Int. J. Pharm.* **404**, 83-93.

- Teply B. A., Tong R., Jeong S. Y., Luther G., Sherifi I., Yim C. H., Khademhosseini A., Farokhzad O. C., Langer R. S., Cheng J. (2008) The use of charge-coupled polymeric microparticles and micromagnets for modulating the bioavailability of orally delivered macromolecules. *Biomaterials* **29**, 1216-1223.
- Tsujisaka Y., Okumura S., Iwai M. (1977) Glyceride synthesis by 4 kinds of microbial lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **489**, 415-422.
- Undurraga D., Markovits A., Erazo S. (2001) Cocoa butter equivalent through enzymatic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochem.* **36**, 933-939.
- Uppenberg J., Patkar S., Bergfors T., Jones T. A. (1994) Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.* **235**, 790-792.
- Van Kampen M. D., Rosenstein R., Götz F., Egmond M. R. (2001) Cloning, purification and characterization of *Staphylococcus warneri* lipase 2. *Biochim. Biophys. Acta* **1544**, 229-241.
- Van Tilbeurgh H., Bezzine S., Cambillau C., Verger R., Carriere F. (1999) Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **1441**, 173-184.
- Veeraragavan K., Colpitts T., Gibbs B. F. (1990) Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1044**, 26-33.
- Vulfson E. N. (1994) Industrial applications of lipases. In *Lipases – their structure, biochemistry and applications* (Woodley P., Peterson S. B., ed.), pp. 271-288, Cambridge Univ. Press, Cambridge, Great Britain.
- Wang C. S., Dashti A., Downs D. (1999) Bile salt-activated lipase. In *Lipase and phospholipase protocols, Vol. 109 Methods in molecular biology* (Doolittle M. H., Reue K., ed.), pp. 71-79, Humana Press, Totowa, N.J.
- Wang X., Dou P. P., Zhao P., Zhao C. M., Ding Y., Xu P. (2009) Immobilization of Lipases onto Magnetic Fe(3)O(4) Nanoparticles for Application in Biodiesel Production. *ChemSusChem* **2**, 947-950.
- Winkler U. K., Stuckmann M. (1979) Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **138**, 663-670.

- Xie W., Wang J. (2012) Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. *Biomass Bioenergy* **36**, 373-380.
- Xin J. Y., Li S. B., Xu Y., Chui J. R., Xia C. G. (2001) Dynamic enzymatic resolution of Naproxen methyl ester in a membrane bioreactor. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **76**, 579-585.
- Yeoh H. H., Wong F. M., Lin G. (1986) Screening for fungal lipase using chromogenic lipid substrates. *Mycologia* **78**, 298-300.
- Zajoncová L., Pospíšková K. (2009) Membrány pro amperometrické biosenzory. *Chem. Listy* **103**, 291-301.
- Zhao J. Q., Wang Y. J., Luo G. S., Zhu S. L. (2011) Immobilization of penicillin G acylase on macro-mesoporous silica spheres. *Bioresour. Technol.* **102**, 529-535.
- Zheng M. M., Dong L., Lu Y., Guo P. M., Deng Q. C., Li W. L., Feng Y. Q., Huang F. H. (2012) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glykol dimethacrylate) polymer microsphere for synthesis of phytosterol esters of unsaturated fatty acids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **74**, 16-23.
- Zhong Z. C., Cheng R. H., Bosley J., Dowben P. A., Sellmyer D. J. (2001) Fabrication of chromium oxide nanoparticles by laser induced deposition from solution. *Appl. Surf. Sci.* **181**, 196-200.
- Zinterhofer L., Wardlaw S., Jatlow P., Seligson D. (1973) Nephelometric determination of pancreatic enzymes. II. Lipase. *Clin. Chim. Acta* **44**, 173-178.

6 Seznam použitých zkratek

ABS	alkylbenzensulfonát
AGE-EDMA	allyl(glycidyl)ether ethylenglykol dimethakrylát
APTES	3-aminopropyltriethoxysilan
CM	karboxymethyl
DEAE	diethylaminoethyl
GC	plynová chromatografie
GMA-MMA	glycidylmethakrylát methylemethakrylát
MCM	magnetické celulosové mikročástice Perloza MG 200
MK	mastné kyseliny
PAD	polyakrylamid
PAN	polyakrylonitril
PS	polysulfon
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
PVA	polyvinylalkohol
TAG	triacylglycerol
TEAE	triethylaminoethyl