

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Produkce a charakterizace L-asparaginasy iso 1 z *Paenibacillus thiaminolyticus* a možnosti její imobilizace

Autor: Anna Felcmanová

Škola: Gymnázium Na Zatlance, Na Zatlance 1330/11, 150 00 Praha 5 Anděl

Kraj: Praha

Vedoucí práce: Mgr. Renata Tomášková

Konzultant: Ing. Tomáš Podzimek, Ph.D.

Praha 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů. Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné. Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Praze, dne 10. 3. 2025

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila velké poděkování Ing. Tomáši Podzimekovi, Ph.D. za to, že mi poskytl tu úžasnou příležitost vypracovat svou práci v rámci Středoškolské odborné činnosti v laboratoři Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha a za odborné vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Renatě Tomáškové za její vstřícnost, trpělivost a cenné rady při zpracování této práce. Mé poděkování patří také vedení Gymnázia Na Zatlance za jejich podporu rozvoje zájmů studentů.

Anotace

L -Asparaginasa je enzym studovaný pro své četné využití v medicíně jako bioléčiva, v potravinářství jako látky zabraňující vzniku akrylamidu a v biosenzorech. Cílem této práce byla charakterizace rekombinantní L-asparaginasy ASN339Pt iso 1 z *Paenibacillus thiaminolyticus* a zkoumání možností imobilizace tohoto enzymu za účelem zvýšení jeho stability při skladování mimo mrazák a případné opakovatelnosti využití imobilizovaného enzymu. ASN339Pt iso 1 byla produkována v *Escherichia coli* LEMO 21 (DE3) a purifikována afinitní chromatografií na NiNTA agarose. Po purifikaci a odsolení byla pomocí metody využívající Nesslerovo činidlo určena její základní charakteristika. Nejvyšší aktivita enzymu byla naměřena za bazických podmínek, v oblasti pH optima 9, 5-10, a při teplotě mezi 40 až 45 °C. V průběhu měření závislosti počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu bylo zjištěno, že reakční rychlost enzymu klesá se zvyšující se koncentrací substrátu, což je pravděpodobně způsobeno substrátovou inhibicí.

Dále byly testovány různé metody imobilizace, včetně enkapsulace do alginátu sodného o různých koncentracích, adsorpce na filtrační papír, kovalentní vazby na nitrocelulóзовé membrány s rozdílnými velikostmi pórů a afinitní interakce na mikrotitrační destičky s NiNTA agarosou. Výsledky ukazují, že alginát sodný byl jako jediný z materiálů shledán vhodným pro opakovatelné využití se zachováním aktivity ASN339Pt iso 1. Z vybraných koncentrací alginátu vykazovala ASN339Pt iso 1 nejvyšší aktivitu v kuličkách 4% alginátu a to konkrétně 61 % oproti enzymu neimobilizovanému pátý den měření. U filtračního papíru a membrán z nitrocelulózy byla měřena aktivita imobilizovaného enzymu v průběhu skladování. U nitrocelulózy byla ze tří vybraných membrán shledána jako nejvhodnější nosič membrána Whatman® AE 100 s velikostí pórů 12 µm, kde po pátém dni skladování klesla enzymová aktivita imobilizované L -asparaginasy na 35 % oproti enzymu neimobilizovanému. U filtračního papíru pak klesala enzymová aktivita v průměru ještě rychleji. Destičky s NiNTA agarosou byly shledány jako zcela nevhodné pro imobilizaci ASN339Pt iso 1 z důvodu ztráty aktivity ihned po navázání enzymu. Tato práce tak rozšířila znalosti o možnostech imobilizace tohoto enzymu a jeho potencionálním využití.

Klíčová slova

L-asparaginasa, L-asparagin, enzym, imobilizace, kyselina L-asparagová, akrylamid, akutní lymfoblastická leukémie, enkapsulace, alginát, NiNTA agarosa

Annotation

L-Asparaginase is an enzyme studied for its numerous uses in medicine as a biopharmaceutical, in the food industry as a substance preventing the formation of acrylamide and in biosensors. The aim of this work was to characterize recombinant L-asparaginase ASN339Pt iso 1 from *Paenibacillus thiaminolyticus* and to investigate the possibilities of immobilization of this enzyme in order to increase its stability during storage outside the freezer and repeated use of the enzyme. The enzyme was produced in *Escherichia coli* LEMO 21 (DE3) and purified by affinity chromatography on NiNTA agarose. After purification and desalting, its basic characteristics were determined using the method with Nessler's reagent. The highest enzyme activity was measured under basic conditions, in the pH optimum range of 9.5-10, and at a temperature range of 40 to 45 °C. During the measurement of the dependence of the initial reaction rate on the substrate concentration, it was found that the reaction rate of the enzyme decreases with increasing substrate concentration, which is probably due to substrate inhibition. Furthermore, various immobilization methods were tested, including encapsulation in sodium alginate of different concentrations, adsorption on filter paper, covalent binding to nitrocellulose membranes with different pore sizes, and affinity interaction on microtiter plates with NiNTA agarose. The results show that sodium alginate was the only material found suitable for repeated use with preservation of ASN339Pt iso 1 activity. Of the selected alginate concentrations, ASN339Pt iso 1 showed the highest activity in 4% alginate beads, namely 61 % compared to the non-immobilized enzyme on the fifth day of measurement. The activity of the immobilized enzyme was measured during storage on filter paper and nitrocellulose membranes. For nitrocellulose, the most suitable carrier was found to be the Whatman® AE 100 membrane with a pore size of 12 µm, where after 5 days of storage the enzyme activity of immobilized L-asparaginase decreased to 35% compared to the non-immobilized enzyme. For filter paper, the enzyme activity decreased on average even faster. Plates with NiNTA agarose were found to be completely unsuitable for immobilization of ASN339Pt iso 1 due to the loss of activity immediately after enzyme binding. This work thus expands the knowledge about the possibilities of immobilization of this enzyme.

Keywords: L-Asparaginase, L-Asparagine, Enzyme, Immobilization, L-Aspartic Acid, Acrylamide, Acute Lymphoblastic Leukemia, Encapsulation, Alginate, NiNTA Agarose

Obsah

1. Úvod	7
2. Teoretická část	9
2.1 L-Asparaginasa	9
2.1.1 Charakterizace L-asparaginas	9
2.1.2 Asparagin	11
2.2 Praktické aplikace L-asparaginas	11
2.2.1 L-Asparaginasy a jejich využití při léčbě akutní lymfoblastické leukémie (ALL)	11
2.2.2 L-Asparaginasy a jejich využití v potravinářství	12
2.2.3 L-Asparaginasy a jejich využití v biosenzorech	17
2.3 Imobilizace	18
2.3.1 Význam imobilizace enzymů v biotechnologii	19
2.3.2 Metody imobilizace enzymů	19
3. Metodická část	23
3.1 Seznam použitých chemikálií	23
3.2 Roztoky, média a pufrý	24
3.3 Přístroje	27
3.4 Použité metody	27
3.4.1 Transformace buněk plasmidovou DNA	27
3.4.2 Kultivace buněk v tekutém médiu	28
3.4.3 Izolace a přečištění ASN339Pt iso 1	28
3.4.4 Analýza přečištění ASN339Pt iso 1 pomocí SDS-PAGE	29
3.4.5 Stanovení aktivity ASN339Pt iso 1	30
3.4.6 Biochemická charakterizace ASN339Pt iso1	30
3.4.7 Metody imobilizace ASN339Pt iso 1	31
4. Výsledky	33
4.1. Produkce rekombinantní	33
4.2. Biochemická charakterizace ASN339Pt iso1	34
4.3. Imobilizace do alginátu	37
4.4. Imobilizace na filtrační papír	39
4.5 Imobilizace na destičku s NiNTA	42
4.6. Imobilizace na membrány	42
5. Diskuze	46
6. Závěr	48
7. Seznam literatury	49

1. Úvod

Tato závěrečná práce se zaměřuje na charakterizaci enzymu L-asparaginasy ASN339Pt iso 1 získané z bakterie *Paenibacillus thiaminolyticus* a na zkoumání možností jeho imobilizace. L-asparaginasa je enzym s významnými aplikacemi v medicíně, zejména při léčbě akutní lymfoblastické leukémie a v potravinářství při snižování obsahu akrylamidu. Její využití je však často limitováno nedostatečnou stabilitou a možností opakovaného použití. Současný výzkum se proto soustředí na zlepšení vlastností tohoto enzymu pomocí různých metod imobilizace, které umožňují snadnější manipulaci, vyšší stabilitu a opakované využití.

Cílem této práce je produkce a detailní charakterizace enzymu L-asparaginasy ASN339Pt iso 1 a testování vybraných metod imobilizace pro vytvoření dlouhodobě skladovatelného biokatalyzátoru. Zkoumané metody imobilizace zahrnují: imobilizaci do alginátu, na filtrační papír, na nitroceluloseovou membránu a na mikrotitrační destičky s jamkami potaženými NiNTA agarosou.

Mé hlavní výzkumné otázky jsou:

1. Jaké jsou enzymové vlastnosti L-asparaginasy ASN339Pt iso 1? (konkrétně stanovit její aktivitu, optimální pH, teplotní optimum a hodnotu Michaelisovy konstanty)
2. Jaký vliv mají jednotlivé metody imobilizace na aktivitu a stabilitu enzymu?
3. Která z testovaných metod imobilizace je vhodná pro opakované použití biokatalyzátoru?
4. Je nějaký z vybraných nosičů pro imobilizaci ASN339Pt iso 1 vhodný pro dlouhodobé skladování enzymu mimo mrazák jakožto potencionální komponent pro vývoj biosenzorů detekující hladiny L-asparaginu?

Předpokládám, že imobilizacelepší stabilitu enzymu pro opakované použití a že každá z použitých metod imobilizace přinese odlišné výsledky z hlediska efektivity a praktického využití.

Praktická část zahrnovala produkci enzymu pomocí rekombinantních technik, jeho purifikaci a základní enzymovou charakterizaci. Následně byly provedeny experimenty imobilizace s využitím různých nosičů a vyhodnocena jejich účinnost na základě parametrů, jako je zbytková aktivita enzymu a počet opakovaných cyklů.

Práce je rozdělena do několika částí. Po úvodu následuje teoretická kapitola, která se věnuje L-asparaginasám a metodám imobilizace. Další kapitoly popisují použitou metodiku, prezentují výsledky a jejich interpretaci. V závěru jsou shrnuty hlavní poznatky a doporučení pro další výzkum.

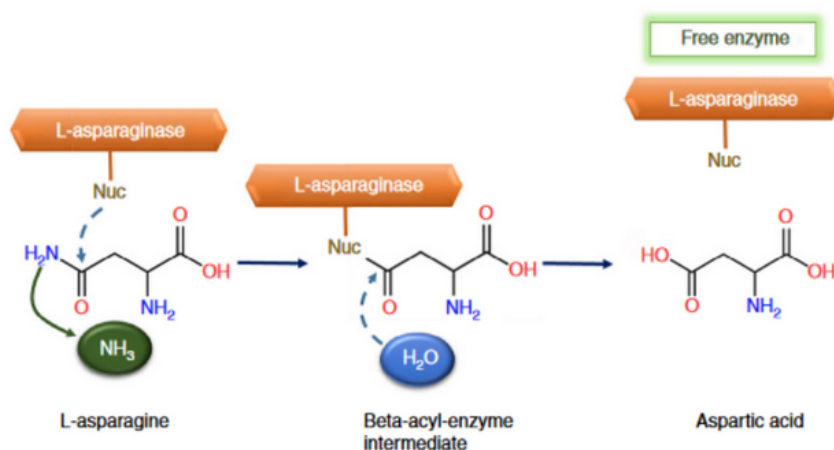
Volba tohoto tématu vychází z mého zájmu o biochemii a biologii, touhy vyzkoušet si práci v odborné laboratoři a snaha zodpovědět si na otázku, zda skutečně chci směřovat svou budoucí profesní kariéru tímto směrem. Praktická část této práce byla vypracována v Laboratoři biochemie proteinů s technologickým potenciálem Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha.

2. Teoretická část

2.1 L-Asparaginasa

2.1.1 Charakterizace L-asparaginas

L-Asparaginasa (zkráceně dále jen ASNasa) je enzym přirozeně se vyskytující v buňkách mnoha živočichů, rostlin a mikroorganismů. Spadá do skupiny deamidasy, enzymů, které dokážou z aminokyselin odštěpit aminovou skupinu (E.C. 3.5.1.1). ASNasa hydrolyzuje přeměnu neesenciální aminokyseliny L-asparaginu na kyselinu L-asparagovou a amoniak (Obrázek 1). Většina ASNas dokáže kromě L-asparaginu odštěpovat aminovou skupinu i z aminokyseliny L-glutaminu, která se tak přemění na kyselinu L-glutamovou, za uvolnění amoniaku.



Obrázek 1: Mechanismus štěpení aminokyseliny L-asparaginu na kyselinu asparagovou a amoniak pomocí enzymu L-asparaginas (Cachumba et al., 2016).

V současné době se ASNasy dělí na základě aminokyselinové sekvence, biochemických vlastností a struktury do tří tříd.

Třída I: Bakteriální typ L-asparaginas byl nalezen jak u grampozitivních, tak gramnegativních bakterií z mořského i suchozemského prostředí (Izadpanah et al. 2014). Z této třídy jsou nejstudovanější ASNasy pocházející z bakterie *Escherichia coli* a *Dickeya dadantii*, které se nejčastěji využívají pro terapeutické účely. Tato třída se následně dělí na

dva podtypy. Typ I (cytosolický, k substrátu se váže hůře) značený zkratkou EcAI a typ II (periplazmatický, k substrátu se váže lépe, díky tomu je medicínsky preferovanější) značený EcAII. EcAII je schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (anglicky Food and Drug Administration, FDA) jakožto hojně využívaný lék proti akutní lymfoblastické leukemii.

Třída II: Rostlinné L-asparaginasy můžeme rozdělit do dvou skupin, které jsou kódovány různými geny, a to na draslíku závislé a na draslíku nezávislé. Stabilita na draslíku nezávislých L-asparaginas je vyšší, a proto se ve výzkumu využívají častěji, přestože na draslíku závislá forma má vyšší afinitu k L-asparaginu. Patří do rodiny N-terminálních nukleofilních hydrolas. Na rozdíl od bakteriálního typu, tyto enzymy hydrolyzují jak L-asparagin, tak i isoaspartylové dipeptidy (Michaelska et al. 2006). Oproti Třídě I jsou v hydrolyze L-asparaginu méně účinné. Isoaspartylové dipeptidy vznikají při stárnutí proteinu nebo při stresu organismu. Právě díky tomuto mechanismu jsou objektem zájmu vědců. Oproti ASNasám bakteriálního typu mají však vysoké hodnoty K_M , což jim neumožňuje rozkládat L-asparagin, pokud je ho v daném prostředí málo. To je činí méně účinné jakožto přípravky proti akutní lymfoblastické leukemii (Beckett & Gervais, 2019). Rostlinné ASNasy jsou zvláště důležité (a hojné) v semenech, kde musí při klíčení dodávat NH_3 pro syntézu bílkovin (Loch, Jaskolski, 2021).

Třída III: Rhizobiální L-asparaginasy byly identifikovány u bakterie *Rhizobium Etli* vázající dusík, která se symbioticky sdružuje s luštěninou *Phaseolus vulgaris*. Vědci odhalili, že tato bakterie má dva typy L-asparaginas, které jsou označovány jako L-asparaginasa I a L-asparaginasa II. L-Asparaginasa I je charakteristická svou termostabilitou. L-Asparaginasa II je termolabilní ale na rozdíl od L-asparaginas I nemá L-glutaminasovou aktivitu, což může vést k jejímu potenciálnímu využití v medicíně. Nukleotidové sekvence ani jednoho z typů L-asparaginas z *R. etli* nevykazují žádný vztah k bakteriálním L-asparaginasám (Moreno-Enriquez et al. 2012; Alam et al. 2019, Loch, Jaskolski, 2021).

Nicméně toto dělení již neodpovídá všem současným poznatkům v biochemii. Asparaginasy jsou využívány již přes 60 let, a tak když toto rozdělení vznikalo, byly k dispozici pouze limitované informace o jejich primární a krystalografické struktuře. Enzymy všech strukturních tříd jsou tak ve skutečnosti distribuovány mezi různé taxonomické skupiny včetně mikroorganismů (například bakterií a hub), vyšších rostlin a zvířat. Lze tak předpokládat, že v dohledné době bude toto řazení pozměněno na základě dnes již mnohem podrobnějších informací o těchto proteinech. (Loch, Jaskolski, 2021; da Silva et al., 2021;)

2.1.2 Asparagin

Asparagin je neesenciální aminokyselina (značka Asn, D) a jedná se o první identifikovanou aminokyselinu. Název je odvozen od latinskému názvu chřestu (asparagus). Patří mezi jednu z dvaceti proteinogenních aminokyselin v lidském těle. Asparagin existuje ve dvou enantiomerních konfiguracích - D a L - a v bílkovinách se vyskytuje pouze v L-formě (Vodrážka, 1992). Díky charakteristice jejího postranního řetězce ji řadíme mezi polární aminokyseliny. Polární funkční skupina asparaginu umožňuje polární interakce, jako například tvorbu vodíkových můstků, a to jak mezi sebou, tak i s molekulami vody a jinými nízkomolekulárními látkami (Vodrážka, 1992). Také zvyšuje rozpustnost bílkovin ve vodě. Spolu s glutamátem tvoří zásobu NH_3 v lidském organismu, který je poté využíván k biosyntéze různých důležitých látek (Vávrová a Pešková, 2009).

2.2 Praktické aplikace L-asparaginas

2.2.1 L-Asparaginasy a jejich využití při léčbě akutní lymfoblastické leukémie (ALL)

ASNasy z bakterie *E. coli* nebo bakterie *D. dadantii* se v současnosti využívají v medicíně jako lék proti akutní lymfoblastické leukémii (ALL) (National Cancer Institute, 2025), a lymfoblastickému lymfomu, a to buď jako samostatný lék, nebo v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky (Vinmec International Hospital, 2025). Její terapeutický účinek je zapříčiněn deplecí L-asparaginu v krvi. Buňky ALL mají sníženou expresi asparaginsynthetasy (ASNS). Tento enzym je ve zdravých buňkách využíván k přeměně kyseliny L-asparagové na L-asparagin. Zdravé buňky mají expresi ASNS normální, a tak je asparagin pro zdravé buňky neesenciální. Většina buněk ALL si nedokáže L-asparagin následkem nedostatku ASNS vyrábět v potřebném množství pro své přežití, a tak jsou závislé na jeho příjmu z krve, ve které cirkuluje získaný převážně z potravy. Podáním léku obsahujícího ASNasu do krve dojde k rozštěpení L-asparaginu. Zdravé buňky si ho z kyseliny asparagové pomocí ASNS vytvoří, u rakovinných buněk, které mají nedostatek ASNS, bude mít vyčerpání extracelulárního asparaginu za následek neschopnost růstu, což potom může vést až k smrti těchto buněk (Chan a kol., 2019).

Jak bylo již zmíněno v předešlých kapitolách ASNasa dokáže kromě L-asparaginu v menším množství štěpit i aminokyselinu L-glutamin. Rozklad L-glutaminu tímto enzymem má však za následek mnoho nežádoucích vedlejších účinků tohoto typu léčby, kvůli kterému je mnohdy zapotřebí u pacienta přejít k jinému typu L-asparaginasy nebo následně přejít na jiný léčebný protokol. Proto je snaha o produkci ASNas s co nejnižší L-glutaminasovou aktivitou a snížit tak množství nežádoucích vedlejších efektů léčby (Lubkowski et al., 2018).

Pro objev antineoplastických účinků ASNasy byl klíčový rok 1922 (Pejšková et. al., 2023), ve kterém byla zjištěna přítomnost ASNasy v morčecím séru. Tato ASNasa byla poprvé úspěšně testována v roce 1966 u dětí trpících ALL (Ali et al., 2016). Přehled historicky i současně užívaných lékařských přípravků je uveden v tabulce 1.

Původ enzymu	Obchodní název preparátu (forma)	Schválení rok, instituce, region	Poznámka
<i>Escherichia coli</i>	Elspar® (cit. ³⁰) (nativní)	1978, FDA, USA	V roce 2012 ukončena výroba
	Kidrolase® (cit. ⁷⁷) (nativní)	1974, Francie	Generická forma přípravku Elspar®
	Oncaspar® (cit. ³⁵) (pegylovaná)	1994, FDA, USA 2016, EMA, Evropa ^a	Od 2006 doporučena FDA k užívání v první linii
	Leunase® (cit. ⁷⁸) (nativní)	1971, PMDA (od roku 2004), Japonsko	Generická forma přípravku Elspar®, od roku 2013 produkována v upraveném kmeni <i>E. coli</i> ⁷⁹
	Spectrila® (cit. ⁸⁰) (nativní, rekombinantní)	2015, EMA, Evropa ^a	
	Asparlas® (cit. ⁸¹) (pegylovaná)	2018, FDA, USA	
<i>Dickeya dadantii</i>	Erwinase® (cit. ^{82,83}) (nativní)	1985, MHRA, UK 2011, FDA, USA	Pro pacienty vykazující hypersenzitivitu na L-ASNasu z <i>E. coli</i>
	Rylaze® (cit. ⁸⁴) (nativní, rekombinantní)	2021, FDA, USA	Produkována v <i>Pseudomonas fluorescens</i>

Tabulka č. 1: Přehled komerčních léčiv obsahujících L-asparaginasu (Pejšková et. al., 2023)

2.2.2 L-Asparaginasy a jejich využití v potravinářství

L-Asparaginasy našly své využití i v potravinářském průmyslu jakožto enzymy zabráňující tvorbě pro člověka nebezpečné látky akrylamidu. Zároveň však zásadně neovlivňují kvalitu potravinářských produktů. Na rozdíl od lékařství, v potravinářství je ke komerčnímu užívání schváleno pouze několik přípravků. Od 11. 4. 2018 jsou provozovatelé potravinářských podniků povinni řídit se nařízením Komise EU 2017/2158, které stanovuje

opatření pro snížení přítomnosti akrylamidu v potravinách (Pejšková et al., 2023; Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2025; European Union, 2017).

Akrylamid (systematický název prop-2-enamid) je za běžných podmínek bílá krystalická látka bez vůně či zápachu. Vzniká při tepelném zpracování potravin za působení vysoké teploty (udává se teplota okolo 120 °C) a nízké vlhkosti spojením aminokyseliny L-asparaginu a redukujícího cukru v průběhu Maillardovy reakce. Během Maillardovy reakce dochází ke spojení volné karbonylové skupiny redukujícího cukru s aminoskupinou volných aminokyselin. Během této reakce vzniká mimo jiné i velké množství aromatických látek a melanoidů, které jsou zodpovědné za hnědé zbarvení a specifické aroma pro pečené a smažené produkty (EFSA, 2024; FDA, 2024).

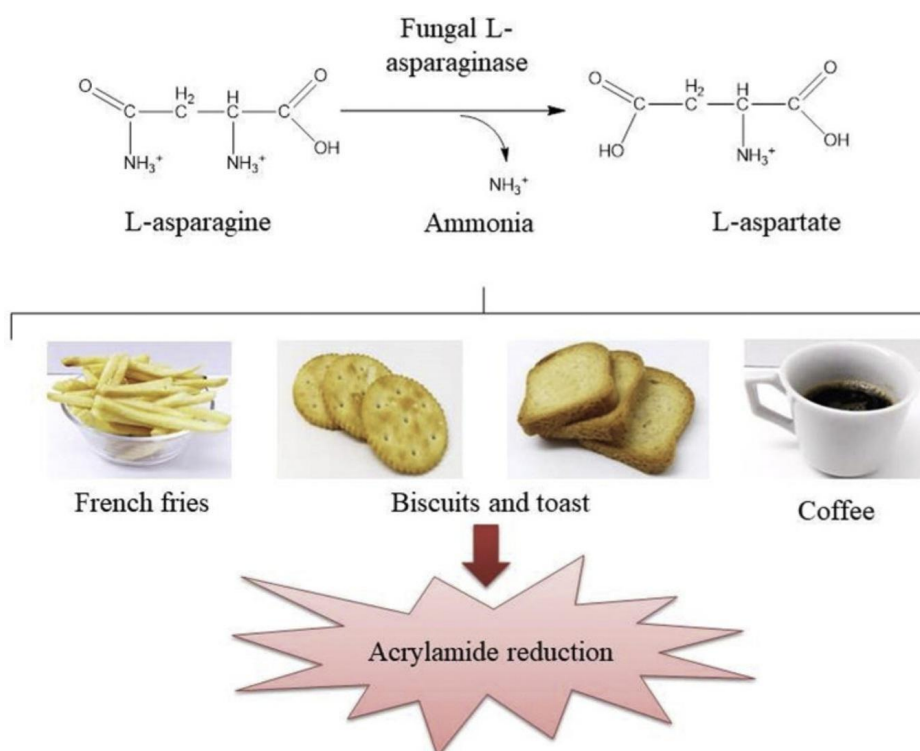
Bylo prokázáno, že akrylamid způsobuje rakovinu u zvířat (Rice, 2005). Studie probíhala konkrétně na myších, které byly vystaveny jeho velmi vysokým dávkám, a přestože neexistují žádné konzistentní epidemiologické důkazy o karcinogenitě akrylamidu u lidí, Národní toxikologický program USA, Společná organizace pro výživu a zemědělství i Expertní výbor Světové zdravotnické organizace pro potravinářská aditiva považuje akrylamid za problematický pro lidské zdraví. V současné době tak je akrylamid zařazen na seznamu potencionálních lidských karcinogenů kategorie 2 (FDA, 2024).

Mezi tepelné úpravy, které vedou ke vzniku potravin s vyšší koncentrací akrylamidu patří smažení, pečení či pražení. Příkladem běžně konzumovaných potravin, které obsahují vyšší množství akrylamidu jsou například smažené bramborové lupínky, hranolky, sušenky a káva.

2.2.2.1 Snižování množství akrylamidu v potravinách pomocí L-asparaginas

Z podstaty chemického děje, při kterém akrylamid vzniká ho nelze z potravinářských výrobků odstranit ve formě již vzniklé sloučeniny. Jde ale nejrozumnějšími metodami omezit jeho tvorbu a snížit tak jeho koncentraci ve výsledném produktu na zdravotně méně závadné množství.

Jedna z již využívaných metod je použití L-asparaginas. Ty dokážou během přípravy surovin rozložit přítomný L-asparagin, který tak během tepelné přípravy potravin nemůže reagovat s redukujícím cukrem za vzniku akrylamidu. Mechanismus, kterým je zabráňováno vzniku akrylamidu je popsán na obrázku 2.



Obrázek 2: Mechanismus zábrany vzniku akrylamidu za použití enzymu L-asparaginasa (Cunha et al., 2019)

V současné době jsou k průmyslovému využití schválené dva přípravky pod komerčním názvem AcrylAway® a PreventAse®.

AcrylAway je komerční název přípravku obsahující enzym L-asparaginasy z plísně *Aspergillus oryzae*. Optimální pH L-asparaginasy z *A. oryzae* se pohybuje mezi 6 a 8 a optimální teplota okolo 60 °C. (Crivelari da Cunha et al., 2019).

Je vyráběn a patentován dánskou společností Novozymes (roku 2024 sloučena se společností Chr. Hansen za vzniku společnosti Novonesis). Na trh byl uveden roku 2007. Od této firmy existuje dnes na trhu více typů přípravků s rozdílnou termostabilitou.

Ten nejvíce teplotně odolný produkt této firmy AcrylAway® HighT dokáže fungovat při teplotě okolo 80 až 100 °C. Dají se tak uplatnit i přímo během procesu tepelné úpravy surovin. Kvůli špatné prostupnosti enzymu přes povrch pevných surovin je vhodné přidávat AcrylAway spíše v případech, kdy lze enzym rovnoměrně zpracovat do směsi, například při hnětení těst. Vhodná předúprava surovin se však dá využít i při přípravě hranolků nebo kávy, kdy bylo prokázáno snížení obsahu akrylamidu o téměř 70 % (Xu, 2017; Porto a kol., 2019).

PreventAse® je komerční název pro přípravek obsahující ASNasu izolovanou z plísňe *Aspergillus niger* používaný ve smažených a pečených výrobcích. Jejím výrobcem je švýcarská společnost DKSH (Diethelm Keller SiberHegner) se sídlem v Curychu. Optimální pH pro aktivitu těchto přípravků se pohybuje obecně v kyselější oblasti (pH 4 - 5) (Cunha et al., 2019). V současné době jsou na trhu dostupné následující typy produktů:

- PreventASe®M: granulát na bázi maltodextrinu, ideální pro přípravu větší škály produktů, hlavně tam, kde je zapotřebí suchá a snadno míchatelná forma enzymu.
- PreventASe®L: tekutý přípravek, vhodný pro specifické typy výrobního procesu, kde je enzym třeba dodávat v tekuté formě.
- PreventASe®W: granulát na bázi pšeničné mouky, vhodný pro pečené výrobky.
- PreventASe®XR: vytvořena pro reakce při vyšších hodnotách pH, dá se tak využít v širší škále reakcí bez nutnosti pH upravovat.

Použitím těchto přípravků lze docílit až 95% poklesu koncentrace akrylamidu oproti neošetřeným produktům. Jejich účinnost úzce souvisí s vhodně zvoleným způsobem přípravy a předpřípravy zpracovávaných surovin (QORES, 2021; DSM, 2018).

2.2.2.2 Další metody snižování tvorby akrylamidu v potravinách

Kromě využití enzymů lze dosáhnout snížení akrylamidu i dalšími metodami. Mezi ty nejčastěji využívané patří metody níže vypsane.

Pomocí genetické modifikace rostlin lze vyšlechtit odrůdy, jejichž obsah L-asparaginu či redukujících cukrů je oproti klasickým odrůdám několikanásobně nižší. Geneticky modifikované rostliny jsou však v EU podřízeny přísným regulacím a jejich užívání je zde velice omezené (European Commission, 2015).

U výběru surovin je třeba dbát na co nejmenší obsah redukujících cukrů v plodinách a snažit se tyto nízkosacharidové plodiny pěstovat s ohledem na lokální zemědělské podmínky a využívané zemědělské postupy dané lokality (Food Drink Europe, 2019).

Při výběru brambor je zapotřebí, aby byly v době sklizení a zpracovávání dostatečně zralé. Nezralé hlízy totiž obsahují větší množství cukrů, což je při zpracovávání z výše zmíněných důvodů nežádoucí. Tomuto lze dobře předejít pečlivým vytříděním brambor dle jejich zbarvení. Velice důležité je pak u sklizených brambor dbát na jejich správné uskladnění. Při dlouhodobém skladování by měla být teplota minimálně okolo 4-6 °C. U brambor skladovaných za nižších teplot by pak mělo být dohlédnuto na regeneraci po dostatečně dlouhou dobu. Při skladování brambor v mrazivých podmínkách totiž dochází k enzymatickému štěpení škrobu na jednodušší sacharidy, zejména na glukosu a fruktosu, které jsou prekursory pro vznik akrylamidu (Lin, Y. et al., 2015). Studie ve Švýcarsku učinila zajímavý objev, konkrétně že u prefabrikátů pro hranolky skladovaných při teplotě 4 °C bylo v porovnání s prefabrikáty hluboce zmraženými, naměřeno vyšší množství redukujících cukrů. (Food Drink Europe, 2019). Podle autora této studie to má na svědomí enzym α -amylasa, která je při nižších teplotách aktivnější v rozkládání škrobu na jednodušší cukry, než pokud se nachází v prostředí zcela zmrzlém.

Kromě obsahu redukujících cukrů je třeba také vzít v potaz obsah L-asparaginu, který je také prekurzorem tvorby akrylamidu. Jeho obsah se v rámci jednotlivých druhů obilovin značně liší. Nejméně z uvedených ho obsahuje rýže, více pak kukuřice, nadále pšenice, oves a nejvíce žito. Tento fakt je potřeba brát v ohled zejména pro výběr surovin na přípravu dětských křupek a sušenek (Food Drink Europe, 2019).

Zamezení tvorby akrylamidu lze také zabránit pomocí různých technik ještě před finálním zpracováním produktu. Mezi takové techniky patří například blanšírování. Blanšírování je kuchařská technika, při které se zelenina krátce spaří ve vroucí osolené vodě a následně prudce ochladí v ledové lázni. Krátkodobým působením vysoké teploty se částečně naruší rostlinné tkáně. Díky tomuto narušení rostlinné tkáně dochází k částečnému vymytí cukrů, které tak nemohou reagovat při Maillardově reakci. Tento postup se však nedoporučuje při přípravě pochutin z celých brambor, neboť narušením jejich struktury se zvyšuje množství tuků, které jsou schopné pojmout. Blanšírování se spíše doporučuje pro přípravu těst (Food Drink Europe, 2019).

U některých odrůd brambor bylo také prokázáno, že se velká část redukujících cukrů uchovává ve slupce. Jejich množství je tak možno snížit oloupáním. Dále se ukázalo účinné přidávání solí vápníku a hořčíku (méně vhodný pro nepříznivou chuť) na redukci množství akrylamidu. Ca^{2+} ionty se totiž dokážou navázat na kyslík L-asparaginu a znemožní mu tak dále vstoupit do Maillardovy reakce (Kretsinger, 2013).

Další z osvědčených metod je snížení obsahu plochy připravovaných produktů (tvorba robustnějších hranolek, chipsů, sušenek). Dochází tak k menšímu vystavení povrchu vysokým teplotám. (Food Drink Europe, 2019).

Teplota, při které akrylamid vzniká, se uvádí okolo hodnoty 120 °C. Pro přípravu spotřebitelsky žádaných produktů, jako jsou bramborové lupínky či hranolky je však tato teplota nedostatečná.

Celkově se však doporučuje při přípravě bramborových lupínků nepřekračovat teplotu 168 °C, u přípravy křupek a sušenek z bramborového těsta pak udržet teplotu pod 175 °C. Dále také lze pro přípravu využít vakuového smažení, u kterého je díky rychlejšímu vypařování vody z produktu zapotřebí nižší teplota k přípravě požadovaného produktu. Výrobky jsou ale sušší a spotřebitelsky méně vítané. Tato metoda je také nákladná a nedokáže pojmout potřebné množství pro velkovýrobu. Při klasické úpravě se také doporučuje udržet minimální vlhkost u snacků a bramborových lupínků vyráběných z bramborového těsta nad hodnotou 1,0 % (Food Drink Europe, 2019).

2.2.3 L-Asparaginasy a jejich využití v biosenzorech

V posledních letech je také L-asparaginas používána k vývoji biosenzoru, který by mohl sloužit k měření hladiny L-asparaginu v krvi pacientů s leukémií nebo i k měření hladin L-asparaginu ve zdrojích sloužících k výrobě potravin (Verma et al., 2012).

Jelikož jsou v současné době používané metody pro měření L-asparaginu zdoluhavé a nákladné, mohl by vývoj nové metody s využitím biosenzoru poskytnout rychlejší a podstatně levnější alternativu měření (Batoole et al., 2016).

Biosensor s L-asparaginasou by mohl být využit například při monitorování koncentrace L-asparaginu v krvi u pacientů s ALL při sledování účinků léčby pomocí léčiv na bázi L-asparaginas. Jejich pomocí by také bylo možné sledovat množství volného L-asparaginu v potravinách před tepelným zpracováním vzhledem k nutnosti dodržení předepsaných hladin koncentrace akrylamidu ve finálních produktech určených ke konzumaci (Nunes et al., 2021).

Vzhledem k rozličné povaze vzorku, u kterého je třeba určit koncentraci L-asparaginu je zřejmé, že jde o komplexní problematiku, kde pravděpodobně nelze najít univerzální podobu pro daný biosenzor, který by byl vhodný ve stejné míře jak pro potravinářský

průmysl, tak pro medicínské účely. Při vývoji je tak nutné myslet na to, pro jakou matici bude biosenzor určen, který z fyzikálně chemických principů bude využit, jaké bude mít senzor rozmezí detekce, jak bude ASNasa imobilizována a která konkrétní ASNasa bude vzhledem ke svým vlastnostem vhodná. Samozřejmě je také nutné myslet na to, aby bylo sestrojení a využití vyvíjeného biosenzoru ekonomicky výhodné.

Předmětem výzkumu je, jak vhodně ASNasu imobilizovat, např. aby nebyla ztracena její aktivita, aby byla prodloužena její stabilita a skladovatelnost a aby mohla být použita opětovně. S cílem najít ideální způsob imobilizace proběhlo a stále probíhá mnoho studií, při kterých byly různé typy L-asparaginas nanášeny například na silikonový gel, agar, agarosu či na želatinu (Nunes et al., 2021).

2.3 Imobilizace

Imobilizace je označení metody, kdy jsou enzymy fyzicky pohybově omezené nebo lokalizované v určité definované části prostoru. Nejčastěji jsou navázány na nosič nebo zachyceny v něm.

Nejčastěji se jedná o imobilizaci enzymu se zachováním jeho katalytické aktivity. Imobilizované enzymy tak nejsou přítomny v celém objemu reakční směsi a nejsou v ní rozpuštěny (Maghraby et al., 2023; Korecká, 2020).

2.3.1 Význam imobilizace enzymů v biotechnologii

Využití imobilizovaných enzymů výrazně sníží jejich spotřebu, čímž se zároveň také sníží celkové náklady na jeho opakovanou syntézu. To je obzvláště u enzymů nákladných na výrobu velmi vítané (Cao, 2011).

Enzymy jsou okem nepozorovatelné molekuly a je tak při jejich reakci se substrátem v tekutém stavu složité takovouto reakci regulovat nebo zastavit, aniž by došlo k jejich degradaci. S enzymy navázanými na nosič probíhá regulace mnohem snadněji, jelikož jde jakožto celek kdykoli vyjmout, nebo přidat do reakční směsi.

U imobilizovaných enzymů také odpadá potřeba přечиštění reakční směsi (tzv. purifikace), aby se získal čistý a ničím nekontaminovaný produkt, protože v ideálním případě

by po vyjmutí imobilizovaného enzymu nemělo v reakční směsi zbýt nic jiného než substrát a produkt (Korecká, 2020).

Výběr vhodného nosiče také může napomoci zvýšit stabilitu enzymů vůči okolním vlivům, jako je například pH nebo teplota (Maghraby et al., 2023).

2.3.2 Metody imobilizace enzymů

Hlavní využívané imobilizační techniky dělíme na dvě hlavní skupiny podle způsobu vázání enzymu na daný nosič, a to na reverzibilní (vratné) a ireverzibilní (nevratné) (Yasmin et. al., 2023).

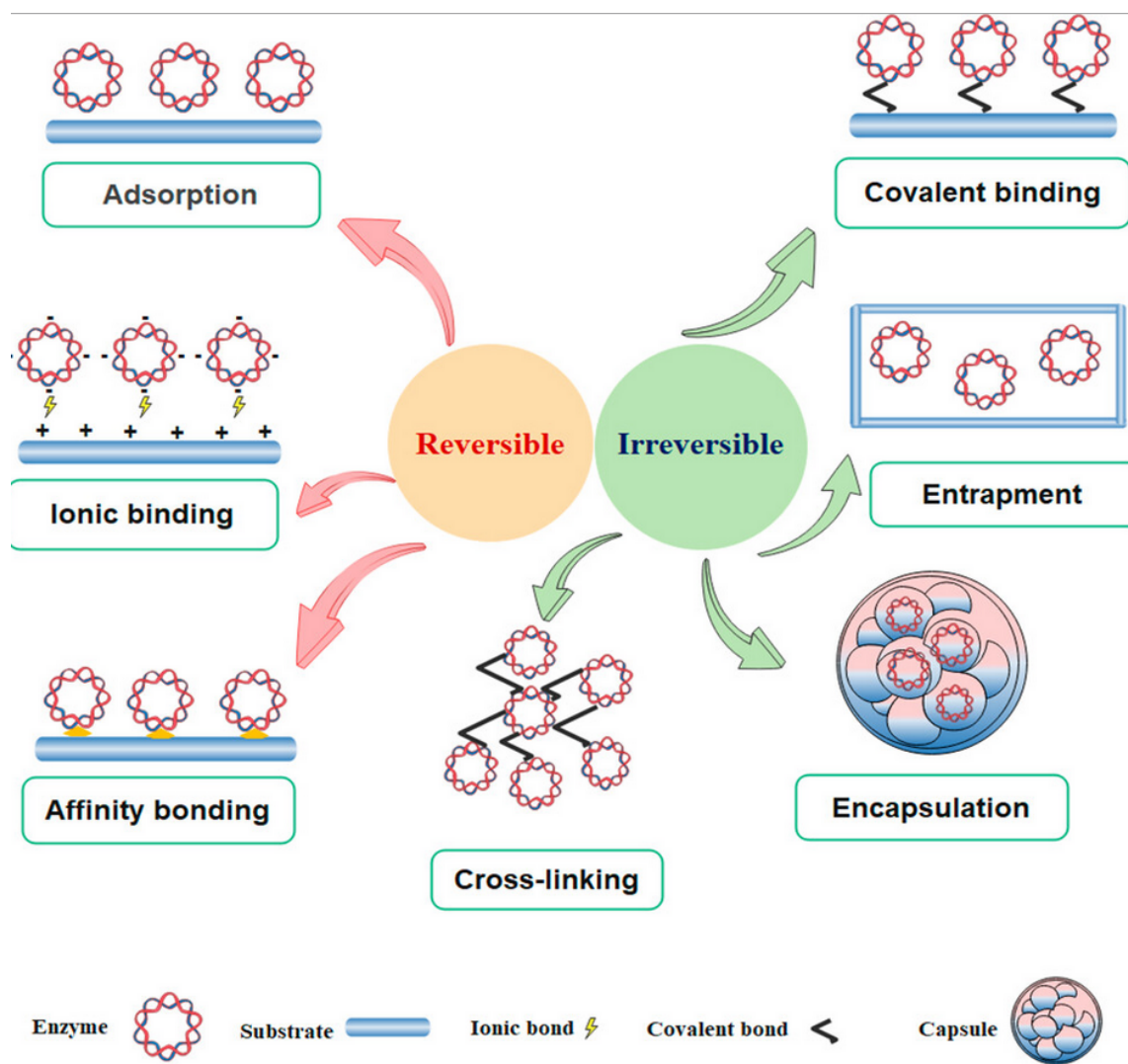
Mezi nevratné řadíme:

- kovalentní vazbu
- zachycení
- zapouzdření
- zesíťení

Mezi vratné řadíme:

- adsorpci
- iontovou vazbu

Grafický přehled imobilizačních metod lze vidět na obrázku 3.



Obrázek 3: Obrazové znázornění hlavních metod imobilizace enzymů. Reverzibilní metody zahrnují adsorpci, iontovou vazbu a afinitní vazbu. Nevratné metody zahrnují kovalentní vazbu, zachycení, enkapsulaci a zesíťování (Maghraby et al., 2023).

Imobilizace pomocí kovalentní vazby

Této imobilizace se dosahuje vytvořením kovalentní vazby mezi enzymem a povrchem nosiče. Díky stabilitě vazby enzym drží pevně na nosiči a nedochází tak téměř k jeho vyplavování do reakční směsi. Zvyšuje se i jeho odolnost vůči denaturaci způsobené reakční směsí nebo pufrý. Je velice důležité, aby se na enzymu vybralo vhodné vazebné místo. Pokud se enzym na nosič naváže ve špatné orientaci, může dojít k omezení nebo úplnému zastavení jeho katalytické aktivity. Aby se enzym mohl na určitý nosič navázat, je v některých případech třeba na něm provést určité modifikace a také zajistit, aby se navázal ve správné orientaci. Tyto modifikace mohou v určitých případech také snížit schopnost enzymu

vázat substrát. K vytvoření kovalentní vazby se využívají reaktivní skupiny vybraných nosičů jako například skupiny elektrofilní a epoxyskupiny. Na enzymu jsou zase pro vznik vazby důležité ionizovatelné postranní řetězce aminokyselin lysinu, argininu, histidinu, cysteinu, tyrosinu, kyseliny asparagové a glutamové (Zucca a Sanjust, 2014), (Korecká, 2020).

Imobilizace pomocí zesítění

Tato metoda využívá bifunkčních činidel (glutaraldehyd, bisdiazobenzidin, hexamethylen diisokyanát), která jsou schopná tvořit mezi enzymy kovalentní vazby, dojde tak k jejich prokřížení a následnému shluknutí, které na pohled může působit, jakoby se enzym vysrážel. Na rozdíl od ostatních způsobů imobilizace zde není nutný žádný specifický drahý nosič. Zesítěný enzym je ve vodě nerozpustný a vykazuje vyšší stabilitu při skladování a při jeho aplikaci. K vytvoření této sítě je třeba mít enzym v co nejčistší podobě. Toho je poměrně složité dosáhnout. Tato metoda dovoluje vytvoření agregátů i více typů enzymů zároveň. Manipulace s takto imobilizovaným enzymem je ale kvůli absenci pevného nosiče obtížná (Govardhan, 1999).

Imobilizace pomocí zapouzdření

Zapouzdření spočívá v zachycení větších enzymů v kapalině, která je obalená semipermeabilní membránou, ta je udržuje v určitém vymezeném prostoru a zároveň je chrání před okolním prostředím, které by je mohlo poškodit. Aby tato metoda byla funkční, membrána musí umožnit průchod substrátu dovnitř a z produktu ven, ale zároveň nemůže dovolit enzymu procházet ven z vytvořené kapsule. Je vytvořena několika nosnými materiály (např. nitrátem celulózy a nylonem). Její propustnost lze ovlivnit výběrem velikostí otvorů v membráně. V případě potřeby je možné prostředí v kapsuli upravit za účelem dosažení co nejvyšší aktivity enzymu. Další výhodou této metody je, že po přestupu přes membránu není molekulám substrátu kladen téměř žádný odpor, jako tomu je například u enkapsulace. Také umožňuje mít v jedné kapsli dohromady i více různých enzymů. Problém tu činí difúze, když se větší množství produktu nachází najednou uvnitř kapsule. To potom může způsobit prasknutí kapsle. Rozpouštědlo totiž může vlivem osmotického tlaku proudit dovnitř kapsule, ve které jsou enzymy zapouzdřené (Maghraby et al., 2023), (Korecká, 2020).

Imobilizace metodou enkapsulace

K imobilizaci enzymu se využívají polykationtové nebo polyaniontové polymery, které po přidání iontů vytvoří gel. Mezi jedny z nejčastěji používaných polymerů patří

alginát, polysacharid získávaný z buněčných stěn hnědých mořských řas a z pouzder určitých druhů bakterií. Přítomnost alginátu ve stěnách chrání řasy před poškozením tím, že jim dodává potřebnou pružnost a pevnou strukturu. U bakterií napomáhá k tvorbě biofilmu. Je netoxický a díky svému snadnému biologickému odbourání v těle a schopnosti tvořit hydrogel je od svého objevu roku 1881 znám jako zahušťovadlo, stabilizátor, gelující činidlo a emulgátor. Skládá se ze zbytků vázané vazbou β 1,4 kyseliny D-mannuronové (M) a vazbou α 1,4 kyseliny L-guluronové (G). Tyto zbytky jsou v alginátech řazené za sebou po blocích. Bloky se skládají z po sobě jdoucích G zbytků (GGGGGG), po sobě jdoucích M zbytků (MMMMMM) a střídajících se M a G zbytků (MGMGMG). Na zesítnění pomocí dvojmocných iontů (např. Ca^{2+} ionty) za následné tvorby hydrogelu se podílí pouze G bloky. Obsah M a G zbytků se u alginátů z různých zdrojů liší. Jejich poměr také udává fyzikální vlastnosti výsledného gelu jako je například míra tuhosti (Raus a kol., 2021).

Polymer s enzymem nereaguje, pouze svým zesítněním omezí pohyb enzymu, který tak z něj nevyplavuje. Zároveň jsou v celém objemu gelu póry, které umožňují průchod substrátu dovnitř a produktu vně z buňky. Velikost těchto pórů závisí na koncentraci a druhu daného polymeru. Další výhodou této metody je možnost upravení mikroprostředí uvnitř gelu za účelem co nejvyšší efektivity enzymu.

Tato metoda není vhodná pro takové typy reakcí, kdy je enzym a substrát podobné velikosti, nebo pokud je reaktant větší než samotný enzym. Další nevýhodou je zpomalení proudění enzymu skrz gel a možné zpomalení celé chemické reakce, či omezení reakční schopnosti enzymu. Také zde může docházet v některých případech k určitému stupni úniku, většímu než u metod, jako je například síťování nebo kovalentní interakce. Výhodou naopak je dostupnost a biologická odbouratelnost polymerů (Hanzuchová, 2014; Maghraby et al., 2023).

Imobilizace pomocí adsorbce

Při imobilizaci za pomoci adsorbce je využíváno k vazbě mezi enzymem a nosičem fyzikálních sil jako jsou vodíkové můstky, Vander-Waalsovy interakce nebo hydrofobní interakce. Jde o síly poněkud slabé, obzvláště v porovnání s výše zmíněnou kovalentní vazbou. Enzymy tak mohou poměrně snadno z nosiče unikat. Dalším úskalím této metody je, že ne každý enzym lze imobilizovat na jakýkoliv nosič. Pro správnou adsorpci musí být splněny určité podmínky, a to konkrétně aby enzym s nosičem interagovaly. Úspěšná adsorpce je zaručena přítomností specifických aktivních skupin, které jsou přítomny na

nosném materiálu. Pokud na materiálu nejsou přítomny, mohou být tyto interakce vytvořeny přidáním modifikátorů nosičů, které umožňují spojení mezi enzymy a nosiči. Výhoda této metody je, že je oproti většině velice levná a snadná na výrobu (Jesionowski et al., 2014; Korecká, 2020).

Imobilizace pomocí iontové vazby

K imobilizaci za pomoci iontové vazby jsou použity enzymy, které jsou opačně nabitě, než je vybraný nosič. Dojde tak k vytvoření iontové vazby. Ta je zpravidla pevnější než vazba pomocí adsorbce, ale stále méně stabilní než vazba kovalentní. Enzymy jsou z povrchu nosiče snadno vyvazatelné. Výskyt náboje na nosiči může způsobit nežádoucí změny ve struktuře a fungování enzymu. Pro tuto metodu je tak nutné zvolit pouze takové enzymy, které budou schopny iontové interakce s nosiči vytvářet (Maghraby et al., 2023).

3. Metodická část

3.1 Seznam použitých chemikálií

Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin	
Alginát Sodný	Sigma-Aldrich, USA
L-Asparagin	Carl Roth, Německo
Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid sodný (NaCl)	Lach-Ner, ČR
Dodecylsírán sodný (SDS)	Carl Roth, Německo
Dithiotreitol (DTT)	Duchefa Biochemie, Nizozemsko
Ethanol	Lach-Ner Group,
Hydroxid sodný	Penta, ČR
Isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Serva, Německo
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina chlorovodíková	Penta, ČR
Kyselina trichloroctová (CCl_3COOH)	VWR International, Německo
Nesslerovo činidlo	Supelco

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
Peroxodisíran amonný (APS)	BioFroxx, Německo
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
PureCube 100 NiNTA Agarosa	Cube Biotech, Německo
Trisma base (Tris)	Sigma-Aldrich, USA
Tris-borátový pufr obsahující EDTA (TBE)?	Fluka (Sigma-Aldrich), USA

K produkci ASN339Pt iso 1 byl použit plasmid pET16bASN339Pt iso 1 a buněčná kultura *Escherichia coli* LEMO 21 (DE3) poskytnuté Laboratoří biochemie proteinů s technologickým potenciálem VŠCHT Praha.

3.2 Roztoky, média a pufr

Luria-Bertani medium (LB medium)

Na 1 litr média:

- 5 g NaCl
- 5 g kvasničného extraktu
- 10 g tryptonu

Při přípravě pevného LB média bylo k 1 litru LB média přidáno 15 g agaru. K přípravě LBA média byl k LB médiu přidán ampicilin do výsledné koncentrace 0,1 mg/l. Po smíchání bylo médium sterilováno v autoklávu.

Roztoky na Britton-Robinsonovy pufr

Roztok A:

- 0,04 M kyselina boritá
- 0,04 M kyselina fosforečná
- 0,04 M kyselina octová

Roztok B:

- 0,2 M hydroxid sodný

Namícháním různých poměrů roztoků A a B byla připravena série roztoků o různých hodnotách pH.

Tris-HCl pufr (1 litr pufru)

100 mM Tris-HCl pufr (pH 8)

12,114 g Trizma® base

100 mM Tris-HCl pufr (pH 9)

12,114 g Trizma® base

50 mM Tris-HCl pufr (pH 7,5)

6,057 g Trizma® base

Pufry pro afinitní chromatografii na koloně s Ni-NTA agarosou

Pufr A:

50 mM Tris-HCl pH 7,5 s 10 mM imidazolem, pH 7,5

Pufr B:

50 mM Tris-HCl pH 7,5 s 40 mM imidazolem, pH 7,5

Eluční pufr:

50 mM Tris-HCl pH 7,5 s 250 mM imidazolem, pH 7,5

Roztok Coomassie Brilliant Blue (0,5 litru roztoku)

1,25g Coomassie Brilliant Blue R-250

50 ml kyselina octová

250 ml ethanol

Odbarvovací roztok

9% kyselina octová

25% ethanol denaturovaný

Po navážení a rozpuštění byl roztok doplněn na objem destilovanou vodou.

2% roztok CaCl_2 (1 litr roztoku)

20 g CaCl_2

Po navážení a rozpuštění byl roztok doplněn na požadovaný objem destilovanou vodou.

Elektrodový pufr (hodnoty na 1 litr)

18,8g glycin

3,02g Tris

1g SDS

Po navážení a rozpuštění byl roztok doplněn na požadovaný objem destilovanou vodou.

10% dělicí gel na SDS-PAGE (hodnoty na 5 ml)

1,9 ml destilovaná voda

1,7 ml 30% (akrylamid:bisakrylamid v poměru 29:1)

1,3 ml TRIS-HCl, pH 8,8

0,05 ml 10% SDS

0,05 ml 10% APS

0,002 TEMED

5% zaostřovací gel pro SDS-PAGE (hodnoty na 2 ml)

1,4 ml destilovaná voda

0,33 ml 30% (akrylamid:bisakrylamid v poměru 29:1)

0,25 ml TRIS-HCl, pH 6,8

0,02 ml 10% SDS

0,02 ml 10% APS

0,002 ml TEMED

Roztoky alginátu sodného pro imobilizaci (100 ml roztoku)

2% alginátový roztok

2 g alginát sodný

4% alginátový roztok

4 g alginát sodný

6% alginátový roztok

6 g alginát sodný

Směs byla za stálého míchání zahřívána na 50 C°, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění alginátu.

Po rozpuštění byl roztok doplněn destilovanou vodou na požadovaný objem.

3.3 Přístroje

• Aparatura pro polyakrylamidovou elektroforézu	Bio-Rad, USA
• Analytické váhy ALJ 200-5DA	Kern, Německo
• BioSan 3D Sunflower Mini Shaker	BioSan, Lotyšsko
• Centrifuga Avanti® J-26 XPI	Beckman Coulter Inc., USA
• Centrifuga MPW 352R	Med. Instruments, Polsko
• Destičkový spektrofotometr Epoch 2	Biotek, USA
• Dávkoč Linomat 5	CAMAG®, Švýcarsko
• Magnetická míchačka IKA RCT basic	Schoeller Instruments, ČR
• Homogenizátor OneShot Cell Disruptor	Constant Systems, UK
• ThermoStat plus	Eppendorf, Německo
• Thermomixer Comfort	Eppendorf, Německo
• pH metr 50+ DHS	XS Instruments, Itálie
• Roto-Shake Genie	Schoeller Instruments, ČR
• Spektrofotometr SmartSpec™ 3000	Bio-Rad, USA
• Vortex ZX4 VELP	Scientifica, Itálie
• Lyofilizátor	Labconco, X

3.4 Použité metody

3.4.1 Transformace buněk plasmidovou DNA

Suspenze buněk *Escherichia coli* LEMO 21 (DE3) byly po vyjmutí z mrazáku ponechány 20 minut v nádobě s ledem, aby došlo k jejich rozmrazení. Z mrazáku byl v mezičase také vyjmut plasmid pET16b ASN339Pt iso 1. Po jeho rozmrazení byl 1 µl plasmidu pipetován do zkumavky s již rozmraženými buňkami. Vše bylo pečlivě promícháno. Následně byla zkumavka vložena na 90 vteřin do inkubátoru zahřátém na 42 °C. Poté bylo k buňkám přidáno 600 µl LB média. Následně se zkumavka přemístila opět do inkubátoru, který byl nastaven tentokrát na 37 °C. Tam se buňky nechaly po dobu jedné

hodiny regenerovat. Po hodině v inkubátoru bylo 200 µl obsahu zkumavky rovnoměrně rozetřeno na LBA misku (koncentrace ampicilinu 100 µg/ml). Miska byla inkubována po dobu 16 hodin při 37 °C.

3.4.2 Kultivace buněk v tekutém médiu

Ve sterilním prostředí byly do zkumavky pipetovány 4 ml LB média a 4 µl ampicilinu (výsledná konc. 100 µg/ml). Následně byla z misky, na které narostly kolonie transformovaných buněk *Escherichia coli* LEMO21 (DE3), na špičku nabrána jedna kolonie a špička byla vložena do zkumavky s médiem. Zkumavka byla inkubována při 37 °C za stálého třepání při 130 RPM přibližně 16 hodin.

Narostlé inokulum bylo použito pro očkování do většího objemu LB média. Do 200 ml LB média v 500 ml Erlenmeyerově baňce byly přidány 2 ml narostlého inokula z předešlého dne. Baňka byla umístěna do orbitální třepačky, kde byla při 37 °C za stálého třepání při 200 RPM ponechána po dobu 4 hodin. Pro ověření, zda buňky narostly do potřebného množství, bylo provedeno měření optické denzity pomocí spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Při OD = 0,5 byl přidán induktor genové exprese IPTG v konečné koncentraci 0,3 mmol/l. Suspenze buněk byla odstředěna při 10000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Výsledná peleta byla skladována při -20 °C.

3.4.3 Izolace a přečištění ASN339Pt iso 1

ASN339Pt iso 1 byla přečištěna pomocí afinitní chromatografie s použitím NiNTA agarosy. Stacionární fáze kolony byla promyta 10 ml ekvilibračního pufru 100 mM TRIS s 10 mM imidazolem, pH 9. Následně byl nanesen vzorek. Po protečení vzorku následovalo promytí 2x5 ml ekvilibračního pufru. Poté byla kolona promyta 2x5 ml promývacího pufru 100 mM TRIS pH 9 (konc. imidazolu 40 mmol/l). Následovala eluce 2x5 ml elučního pufru 100 mM TRIS pH 9 (konc. imidazolu 250 mmol/l). Přečištěný vzorek bylo nutné zbavit vysoké koncentrace imidazolu. To bylo provedeno odsolením pomocí gelové chromatografie na koloně PD10. Kolona byla promyta 10 ml 100 mM TRIS pufru, pH 9. Následně bylo

naneseno 2,5 ml vzorku, který protekl kolonou, poté bylo přidáno 3,5 ml TRIS pufru, který byl jímán. Koncentrace přečištěného enzymu byla stanovena pomocí Pierce[™] BCA Protein Assay Kit.

3.4.4 Analýza přečištění ASN339Pt iso 1 pomocí SDS-PAGE

Pro analýzu přečištění enzymu pomocí SDS-elektroforézy bylo připraveno 5 ml 10% dělicího gelu, který byl nalit mezi skla aparatury, který se nechal polymerovat po dobu 20 minut za nepřítomnosti vzduchu. Následně byly připraveny 2 ml 5 % zaostřovacího gelu, do kterého byl vtlačen hřebínek. Gel byl ponechán 20 minut polymerovat. Následně byl hřebínek z gelu vyjmut a vytvořené jamky byly promyty elektrodovým pufrem. Elektrodovým pufrem byla také vyplněna vnitřní i vnější komora aparatury, aby byl ponořen spodní okraj gelu a platinový drátek tvořící elektrodu.

Následně byly připraveny vzorky pro SDS-PAGE (vzorek pelety byl resuspendován pomocí 6 ml 100 mM TRIS pH 9) smícháním 15 μ l vzorku a 15 μ l PLB (Protein Loading Buffer). Vzorky byly povařeny po dobu 6 minut. Následně byly vzorky na ledu opět zchlazeny a odstředěny na stolní centrifuze. Vzorky byly do jamek gelu naneseny v tomto pořadí:

M –NZYBlue Protein Marker (8 μ l)

1 – peleta po rozbití buněk (2 μ l)

2 – supernatant po rozbití buněk (2 μ l)

3 – vzorek po protekci kolonou (2 μ l)

4 – promytí pufrem s 10mM imidazolem (2 μ l)

5 – promytí pufrem s 10mM imidazolem (10 μ l)

6 – promytí pufrem se 40mM imidazolem (10 μ l)

7 – promytí pufrem se 40mM imidazolem (15 μ l)

8 – eluce pufrem s 250mM imidazolem (15 μ l)

9 – eluce pufrům s 250mM imidazolem (15 μ l)

Jako standard molekulových hmotností byl použit NZYBlue Protein Marker. Dělení proteinů probíhalo při 180 V. Výsledný gel byl po vyjmutí z aparatury pro SDS-PAGE umístěn do roztoku Coomassie Brilliant Blue, kde byl gel po dobu 20 minut inkubován na třepačce. Následně byla Coomassie Brilliant Blue odlita a gel byl zalit odbarvovacím roztokem, kde byl na třepačce ponechán po dobu 15 minut, kdy došlo k výměně odbarvovacího roztoku. Odbarvování probíhalo, dokud nebyly proužky na gelu zřetelně viditelné. Nakonec byl pořízen sken gelu.

3.4.5 Analýza přečištění ASN339Pt iso 1 pomocí SDS-PAGE

Do 1,5 ml zkumavky s 290 μ l 10 mM roztoku asparaginu v 100 mM TRIS pH 9 bylo pipetováno 10 μ l enzymu o konc. 1,5 mg/ml. Obsah zkumavky byl promíchán pomocí vortexu. Reakce probíhala po dobu 10 minut při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 15 μ l 1,5 M TCA. Po zastavení reakce bylo přidáno 36 μ l Nesslerova činidla, které ve zkumavce účinkovalo po dobu 10 minut za pokojové teploty. Následně bylo 200 μ l směsi ze zkumavky pipetováno do mikrotitrační destičky. Destička byla vložena do spektrofotometru, kde byla měřena absorbance při vlnové délce 436 nm. Pro kvantifikaci množství uvolněného amoniaku byla sestavena kalibrační křivka. K sestavení kalibrační křivky byly připraveny roztoky síranu amonného o koncentraci 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3 a 0,4 mM. K 290 μ l roztoku bylo přidáno 15 μ l TCA a 36 μ l Nesslerova činidla a směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byla u těchto roztoků měřena jejich absorbance při vlnové délce 436 nm.

3.4.6 Biochemická charakterizace ASN339Pt iso1

Pro stanovení pH optima byla připravena série roztoků Britton-Robinson pufrů s 10 mM asparaginem o pH hodnotě 7,8; 8,64; 8,97; 9,22; 9,47; 9,96; 10,81 a 11,21. Aktivita enzymu byla stanovena způsobem popsaným výše.

Pro stanovení teplotního optima byla provedena série měření její aktivity při teplotě 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 a 60 °C. Jako substrát byl použit roztok 10 mM asparaginu ve 100 mM pufru TRIS pH 9. Aktivita enzymu byla stanovena způsobem popsáným výše.

Pro stanovení hodnoty Michaelisovy konstanty byla připravena série roztoků asparaginu o koncentraci 2, 5, 10, 15, 25, 35, 60, 90, 120 a 150 mmol/l. Asparagin byl rozpuštěn ve 100 mM pufru TRIS pH 9. Aktivita enzymu byla stanovena způsobem popsáným výše.

Naměřené hodnoty absorbance byly převedeny na koncentraci uvolněného amoniaku na základě kalibrační křivky. Získané hodnoty byly použity k výpočtu aktivity asparaginasy při jednotlivých koncentracích asparaginu. Hodnoty byly proloženy křivkou v programu GraphPad Prism 7. Pro proložení hodnot byla použita rovnice pro substrátovou inhibici (rovnice 1) a její modifikovaná varianta (rovnice 2) (Baprio *et. al.*, 2018),

$$V = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_m + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)} \quad \text{rovnice 1}$$

$$V = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_m + [S] \cdot \left(\frac{1 + [S]^n}{K_i^n}\right)} \quad \text{rovnice 2}$$

kde V_{lim} je maximální rychlost při saturaci substrátem, $[S]$ je koncentrace substrátu, K_M je Michaelisova konstanta, n je počet molekul substrátu a K_i je inhibiční konstanta.

3.4.7 Metody imobilizace ASN339Pt iso 1

Imobilizace byla provedena metodou enkapsulace enzymu do alginátových kuliček. Rozpuštěním alginátu v destilované vodě pomocí magnetické míchačky byly připraveny roztoky alginátu sodného v destilované vodě o koncentracích 2 %, 4 % a 6 %.

Roztok ASN339Pt iso 1 byl přidán k alginátovému roztoku v poměru 1:4 (v/v). V rámci experimentu bylo pipetováno 0,25 ml enzymového roztoku (hmotnost enzymu v roztoku = 0,725 mg) do 0,75 ml alginátového roztoku. Směs byla důkladně promíchána po dobu 1 minuty za použití vortexu. Připravená směs byla pomocí 1 ml stříkačky dávkována po kapkách do vychlazeného 2% roztoku chloridu vápenatého (CaCl_2) za nepřetržitého míchání. Proces síťování alginátu probíhal po dobu 20 minut. Po uplynutí stanovené doby byly alginátové kuličky přeneseny na filtrační papír, kde setrvaly po dobu 7 minut, aby došlo k odstranění přebytečného roztoku. Následně byly kuličky zváženy na analytických vahách. Pro měření enzymové aktivity byla každá kulička přidána do 2 ml zkumavky s rovným dnem (kvůli minimalizaci poškození při vyjímání alginátové kuličky) s 290 μl roztoku 10 mM asparaginu ve 100 mM pufru TRIS pH 9. Po uplynutí doby reakce byly kuličky ze zkumavky vyjmuty. Následně byly přemístěny na 10 min do 2 ml zkumavky obsahující 300 μl 100 mM pufru TRIS pH 9 pro odmytí substrátu i produktů z povrchu i z nitra kuličky. Poté byla kulička ze zkumavky opět vyjmuta a přemístěna do nové 2 ml zkumavky se 100 mM pufrům TRIS pH 9. V této zkumavce byla kulička uskladněna v lednici do doby dalšího měření aktivity.

Pro jednoduchou imobilizaci pomocí adsorpce na povrch byla jako nosič použita kolečka filtračního papíru. Na každé kolečko bylo pomocí pipety nanесeno 5 μl enzymového roztoku ASN339Pt iso 1 (na každý papírek připadlo 4,3 μg enzymu). Po nanесení enzymu byly papírky ponechány 20 minut při pokojové teplotě, aby došlo k odpaření kapaliny. Následně byla v časových intervalech 24 hodin měřena specifická aktivita papírků. Z důvodu nemožnosti využít tento imobilizační nosič k opakovanému využívání byla specifická aktivita enzymu u každého papírku měřena pouze jednou. Při každém měření byly použity 3 filtrační papírky a 5 μl neimobilizovaného enzymu ASN339Pt iso 1 pro porovnání. Mezi měřeními byly filtrační papírky uchovávány v Petriho miskách z důvodu zamezení kontaminace vnějšími polutanty. Petriho misky byly uchovávány v lednici při 5 °C.

Pro imobilizaci pomocí iontové vazby byla jako nosič použita nitrocelulosevá membrána Amersham ProtransTM 0,45 μm NC, Whatman AE 100 a Whatman AE 98 s póry o velikosti 0,45, 12 a 15 μm . Každá membrána byla rozdělena na obdélníky 4x12 mm. Do každého obdélníku bylo pomocí přístroje Linomat 5 nanесeno 5 μl ASN339Pt iso 1. Při prvním nanášení na membrány byla naměřená aktivita enzymu rovna nule. Nanášení pomocí Linomatu 5 bylo opakováno, tentokrát však pouze do 4 obdélníků membrán, které byly ihned

přeneseny k měření enzymové aktivity, aby se vyloučilo poškození enzymu dlouhou dobou nanášení. Aktivita těchto membrán se také po změření rovnala nule. Na základě těchto poznatků byl přístroj Linomat 5 shledán nevhodným pro nanášení ASN339Pt iso 1. Následně byla připravena nová sada membrán. Enzym byl na obdélníky membrán tentokrát nanášen pomocí pipety. Aby se docílilo toho, že na každém obdélníku bude pouze 5 μ l enzymu, membrána byla rozstříhána již před nanášením. Následně byla po dobu 5 dní měřena aktivita enzymu. Měření bylo prováděna v časových intervalech 24 hodin.

Pro imobilizaci pomocí afinitní interakce proteinu a nosiče byly použity mikrotitrační destičky s jamkami potaženými funkčními skupinami koordinující nikelnaté kationty (NiNTA). Byly připraveny enzymové roztoky s 11020 μ g, 204 μ g a 410,8 μ g (odpovídá ředící řadě enzymové směsi 1x, 5x a 25x). Do jedné jamky destičky bylo pipetováno vždy 200 μ l enzymu. Enzym o určité koncentraci byl nanesen pokaždé do 5 jamek destičky. Následně byl enzym v jamce inkubován při 20 °C po dobu 1 hodiny. Poté byla každá jamka 3x promyta 220 μ l 100 mM pufru TRIS pH 9 a z jamek byl odsát přebytečný pufr. Destička pak byla zchlazena na -80°C po dobu 2 hodin. Poté následovalo vysušení destičky pomocí lyofilizátoru. Lyofilizace probíhala při -50 °C po dobu 16 hodin. Následně bylo do každé jamky pipetováno 220 μ l 10 mM asparaginu ve 100 mM TRIS pH 9. Reakce probíhala po dobu 30 minut. Následně bylo z každé jamky odebráno do 1,5 ml zkumavky 200 μ l reakční směsi, ke které bylo pro zastavení reakce přidáno 10 μ l 1,5 M TCA. Následně bylo do zkumavky přidáno 24 μ l Nesslerova činidla. Nakonec byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru.

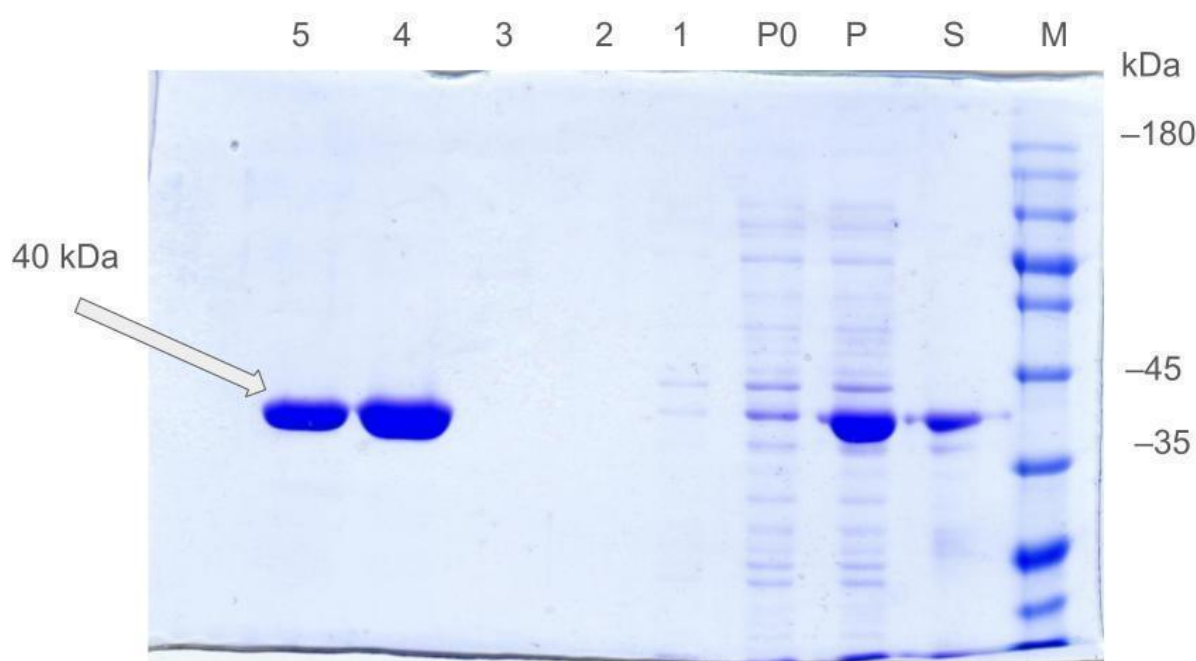
4. Výsledky

4.1. Produkce rekombinantní

Plasmid (pET16bAsp339Pt) kódující L-asparaginasu z *P. thiaminolyticus* byl použit k transformaci buněk *E. coli* LEMO 21 (DE3), ve kterých došlo k produkci ASN339Pt iso 1. Úspěšnost produkce rekombinantního enzymu při 37 °C byla zjišťována pomocí metody SDS-PAGE s následným barvením Coomassie Brilliant Blue. Na základě obrázku výsledného

gelu (Obrázek 4) bylo zjištěno, že molekulová hmotnost produkovaného proteinu odpovídá přibližně 40 kDa. Během promývacích kroků s 10 a 40 mM imidazolem téměř nebyl cílový protein detekován, což svědčí o jeho dobré vazbě na NiNTA kolonu. V první eluční frakci s 250 mM imidazolem (Obrázek 4, dráha 4) byla pozorována nejvyšší koncentrace cílového proteinu. Zároveň zde bylo pozorováno minimální množství kontaminujících proteinů, což svědčí o vysoké čistotě a úspěšné purifikaci vzorku.

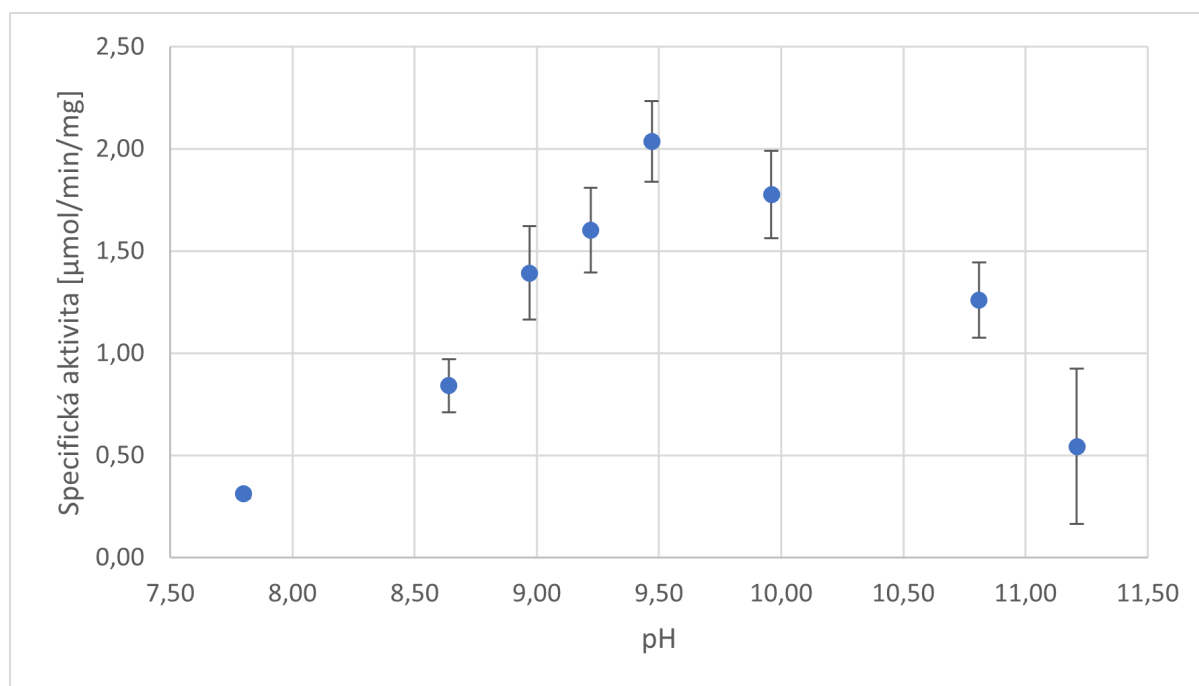
Na základě těchto výsledků lze tak konstatovat, že produkce cílového proteinu ASN339Pt iso 1 byla úspěšná a zvolená metoda afinitní chromatografie pomocí NiNTA agarosu vedla k jeho efektivní purifikaci. Koncentrace ASN339Pt iso 1 ve výsledném preparátu byla 0,86 mg/ml.



Obrázek 4: Polyakrylamidový gel po SDS-PAGE obarvený Coomassie Brilliant Blue. Vzorky po izolaci a purifikaci pomocí afinitní chromatografie na koloně s NiNTA agarosou. Jednotlivé dráhy obsahují: **M** NZYBlue Protein Marker, **S** supernatant po rozbití buněk, **P** peleta po rozbití buněk **P0** nezachycené proteiny proteklé kolonou, **1** první promytí 10 mM imidazolem, **2** druhé promytí 10 mM imidazolem, **3** první promytí 40 mM imidazolem, **4** první eluce 250 mM imidazolem, **5** druhá eluce 250 mM imidazolem.

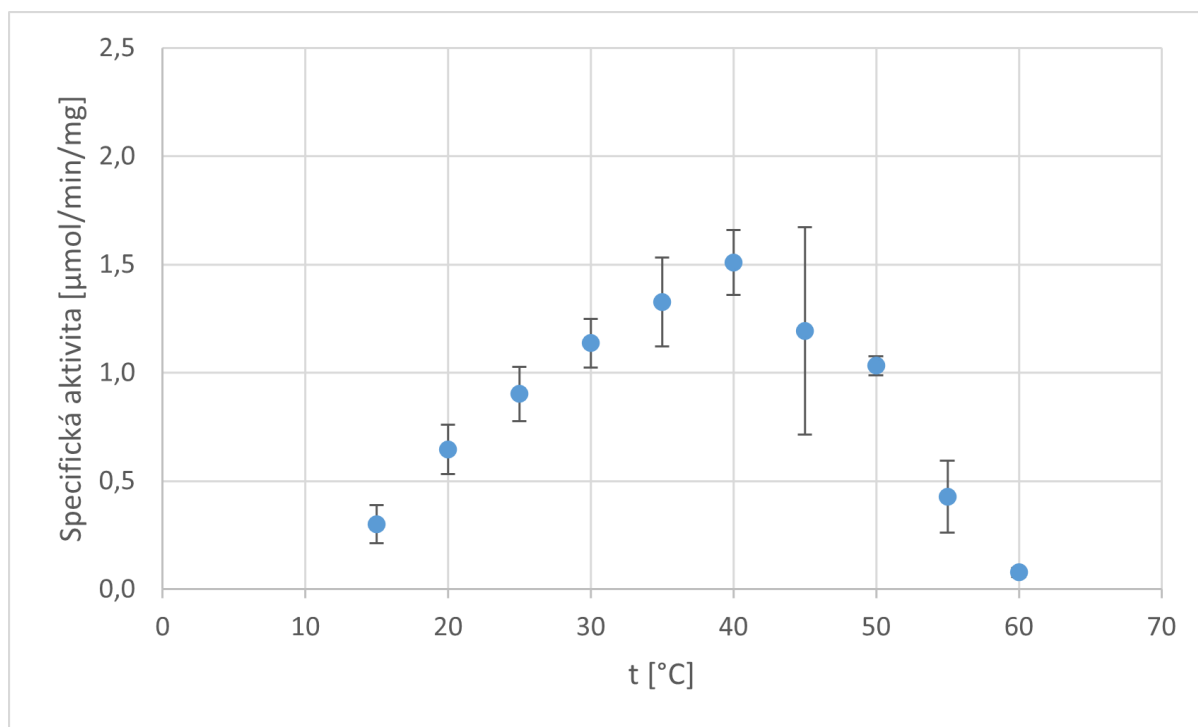
4.2. Biochemická charakterizace ASN339Pt iso1

Pro stanovení pH optima byla měřena aktivita L-asparaginasy v sérii Britton-Robinsonových pufrů s pH rozmezím 7,8 až 11,21. Nejvyšší průměrnou aktivitu vykazovala L-asparaginasa při hodnotě pH 9,47 (Graf 1). Z grafu je zřejmé, že je tento enzym aktivní v alkalické oblasti pH.



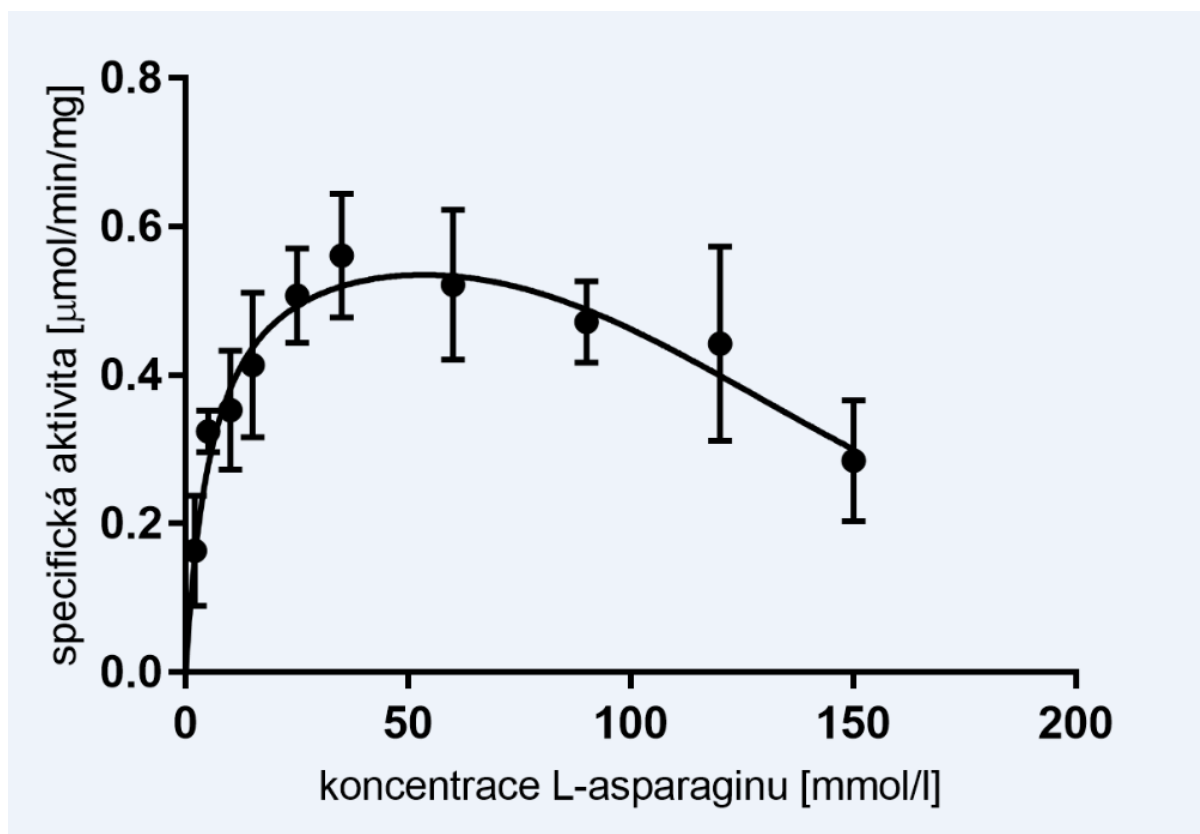
Graf 1.: Závislost specifické aktivity ASN339Pt iso 1 na pH

Pro stanovení teplotního optima byla měřena aktivita L-asparaginasy v teplotním rozmezí 15 až 60 °C, přičemž nejvyšší aktivitu vykazovala při 40 °C (Graf 2). Při vyšší teplotě začala aktivita vlivem denaturace enzymu klesat.



Graf 2. : Závislost specifické aktivity ASN339Pt iso 1 na teplotě

Na základě výsledků měření závislosti počáteční rychlosti na koncentraci substrátu je předpokládáno, že při vyšších hodnotách substrátu v reakční směsi dochází k inhibici reakce substrátem (Graf 3). Pomocí programu GraphPad Prism 7 byly zjištěny následující hodnoty kinetických parametrů: $K_M = (6,13 \pm 1,11)$ mmol/l, $V_{lim} = (0,62 \pm 0,03)$ umol/min/mg a $K_i = (150 \pm 10)$ mmol/l (obr. 3)

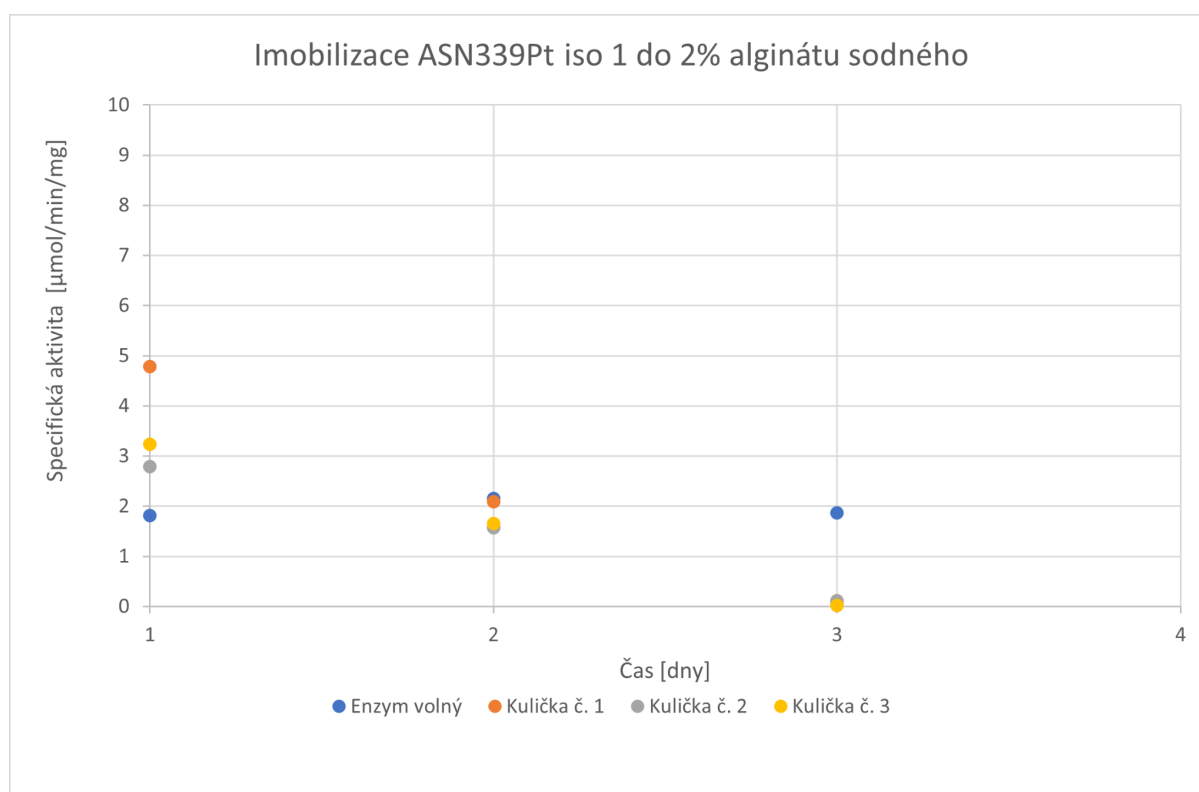


Graf 3: Závislost počáteční reakční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu při 37 °C. Data byla vyhodnocena programem GraphPad Prism 7.

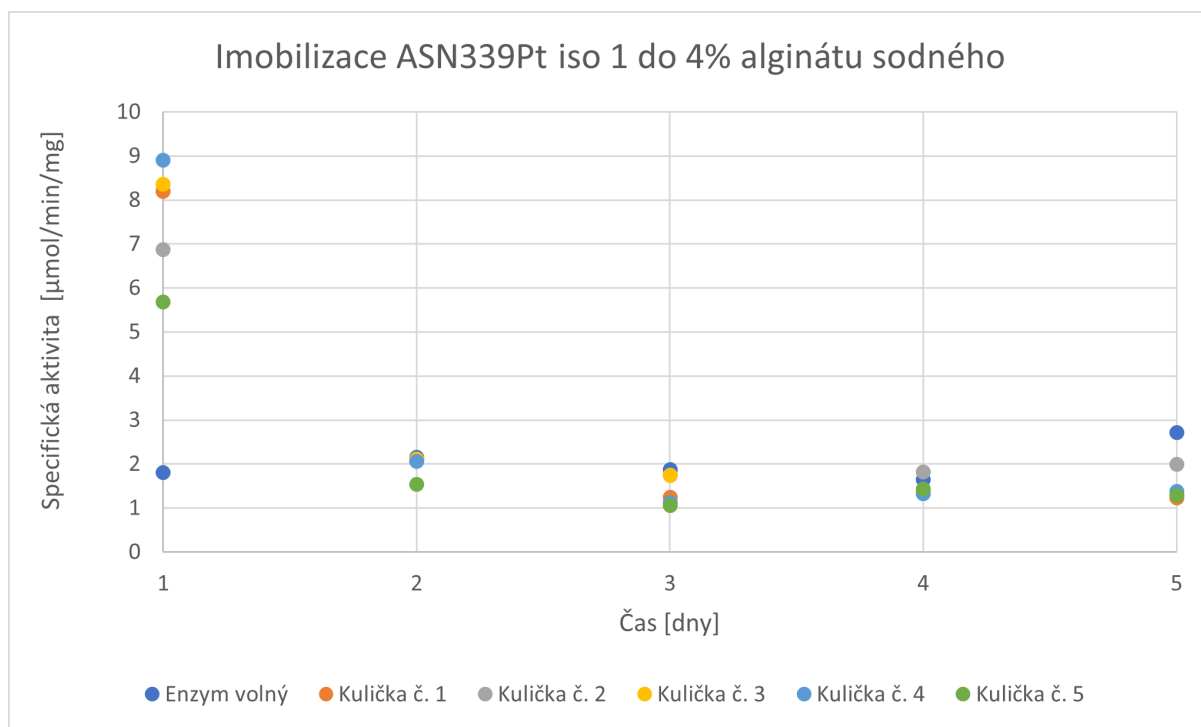
4.3. Imobilizace do alginátu

Pro imobilizaci do alginátu byly vytvořeny kuličky 2, 4 a 6 % alginátu sodného, obsahující ASN339Pt iso 1. Následně byla v časových intervalech 24 hodin měřena specifická aktivita každé kuličky. Při každé sérii měření kuliček byla pro porovnání měřena i aktivita neimobilizované ASN339Pt iso 1. Měření aktivity v kuličkách s 2% alginátem (Graf 4) bylo ukončeno po 3 dni měření, kdy specifická aktivita kuliček klesla téměř na nulu.

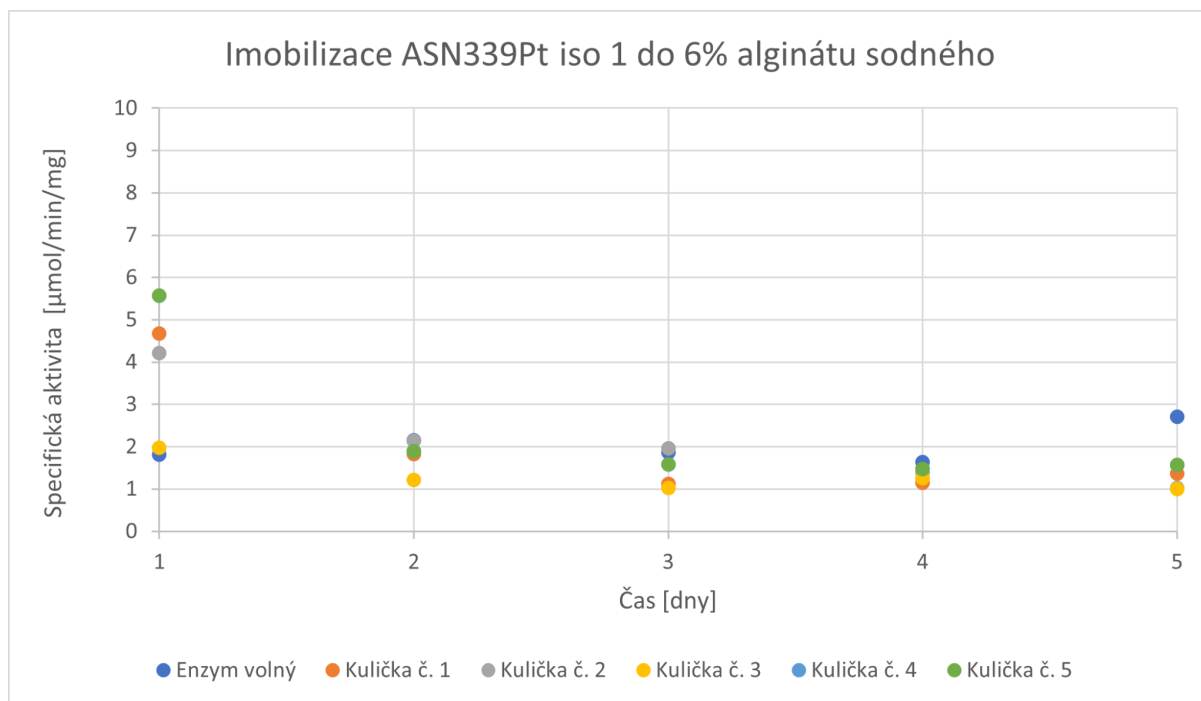
Pravděpodobně došlo k vyplavení enzymu z důvodu nízké hustoty alginátové sítě v kuličkách. Specifická aktivita v kuličkách s 4% alginátem byla při prvním měření až o 420 % vyšší než tomu bylo u neimobilizovaného enzymu (Graf 5). Následně jejich aktivita v průběhu měření rychle klesla na v průměru 100 % specifické aktivity enzymu neimobilizovaného. Poté se jeho specifická aktivita udržovala mezi 80-90 % a ke konci na 61 % specifické aktivity neimobilizovaného enzymu. Tento pokles mohl být taktéž důsledkem částečného uvolnění enzymu z alginátu, nebo degradací enzymu v průběhu času. Výsledky měření specifické aktivity kuliček se 6% alginátem (Graf 6) se pak až na počáteční, o 40 % nižší aktivitu než byla pozorována u 4% kuliček s předešlým měřením shodoval. V průměru pak po první dny sledování vykazovaly pouze o 4,5 % nižší hodnoty aktivit (Graf 6).



Graf 4: Graf změny specifické aktivity ASN339Pt iso 1 imobilizované do 2% alginátu v čase. Enzym volný představuje neimobilizovaný enzym pro porovnání.



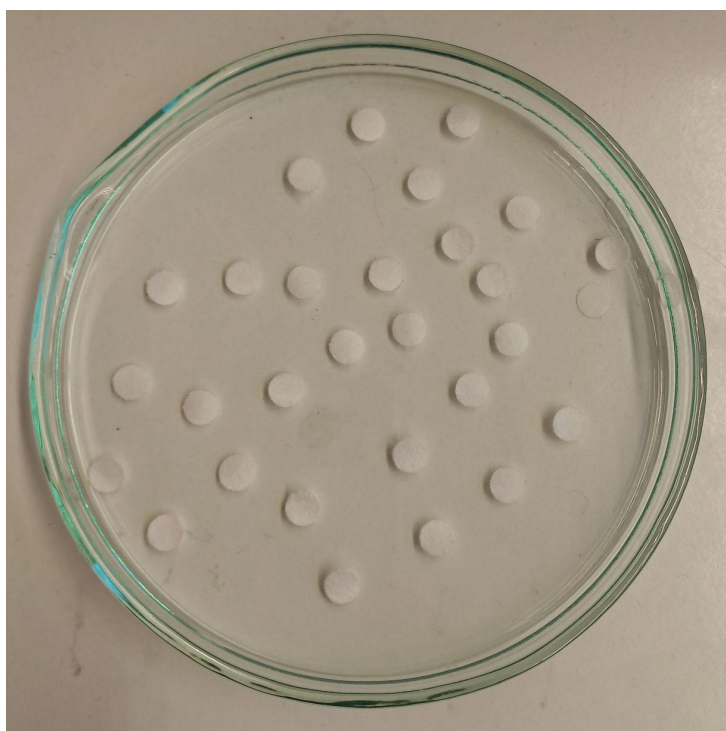
Graf 5: Graf změny specifické aktivity L-asparaginasy imobilizované do 4% alginátu v čase. Enzym volný představuje neimobilizovaný enzym pro porovnání.



Graf 6: Graf změny specifické aktivity L-asparaginasy imobilizované do 6% alginátu v čase. Enzym volný představuje neimobilizovaný enzym pro porovnání.

4.4. Imobilizace na filtrační papír

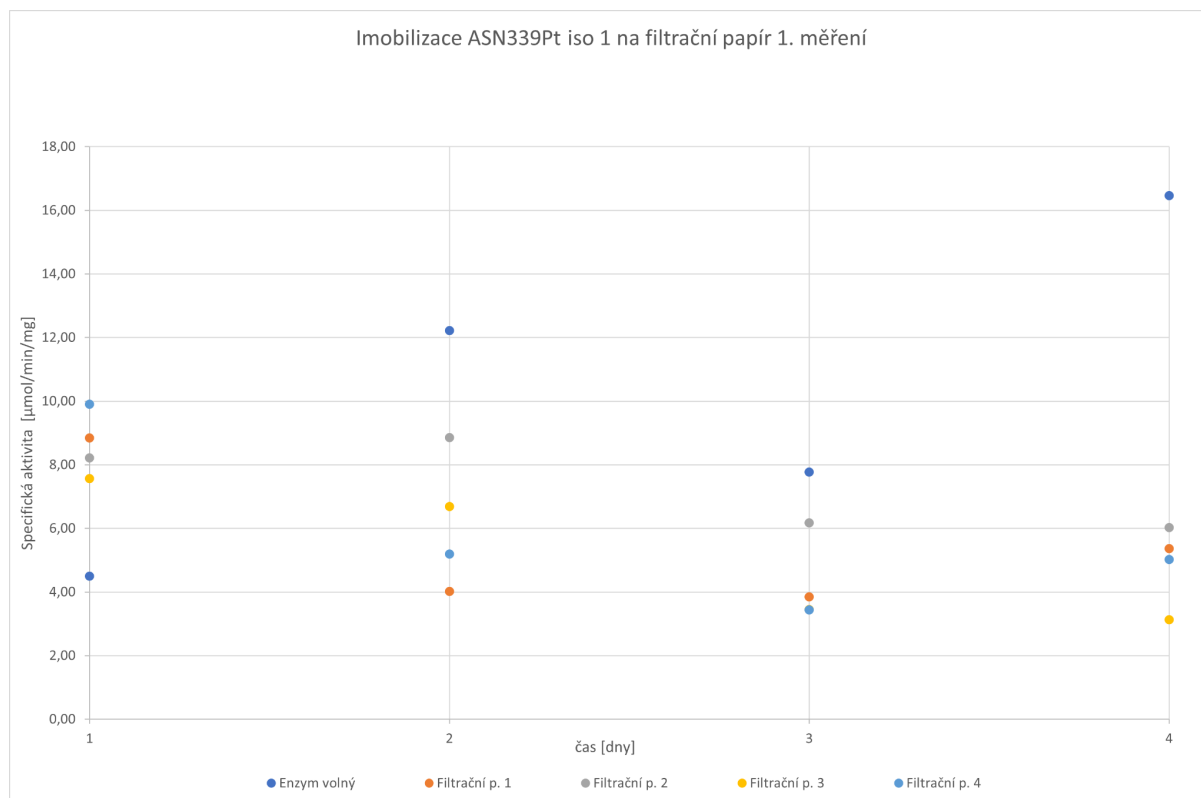
Pro imobilizaci L-asparaginasy na filtrační papír byla vytvořena pomocí kancelářské děrovačky sada koleček filtračního papíru (Obrázek 5). Na každé kolečko o poloměru 3 mm bylo nanášeno asi 4,3 μg enzymu. Byly provedeny dvě série měření, přičemž jednotlivé barevné body odpovídají měřením provedeným na jednotlivých kolečkách filtračního papíru (označené jako "Filtrační p. 1" až "Filtrační p. 4") a kontrolní měření volného enzymu (označené jako "Enzym volný").



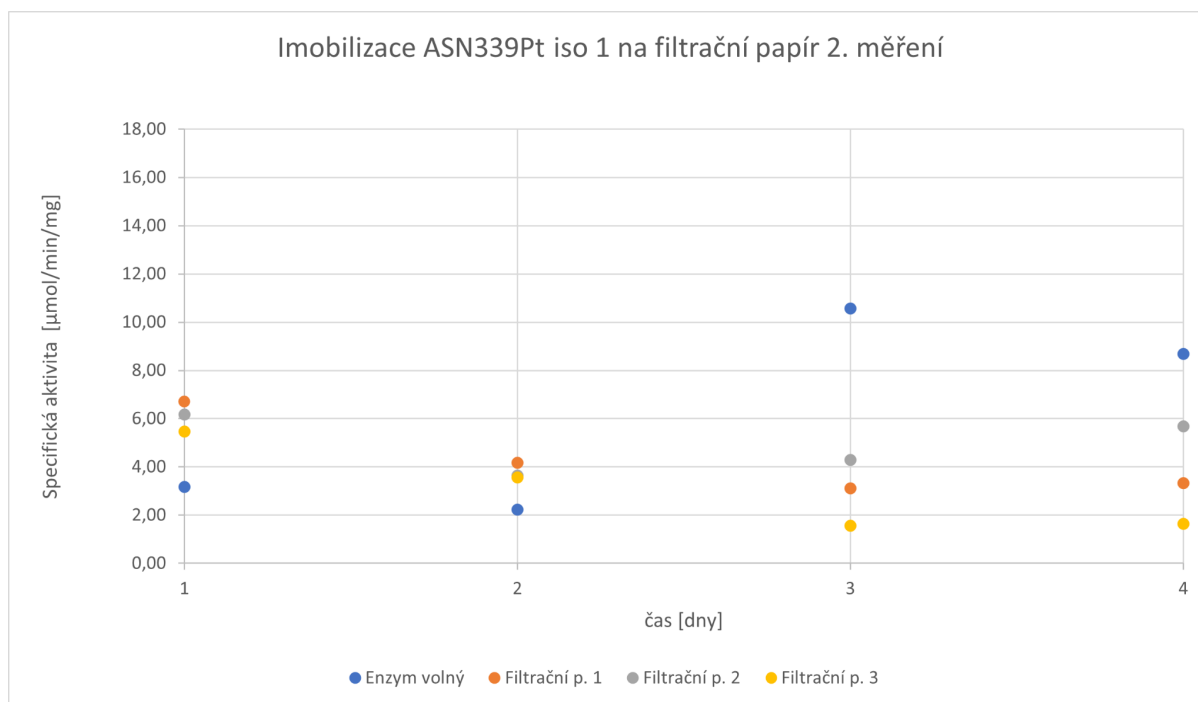
Obrázek 5: Sada koleček filtračního papíru připravena na nanášení enzymu.

Z dat měření vyplynulo, že při prvním měření vykazoval imobilizovaný enzym až 2x vyšší specifickou aktivitu, než tomu bylo u enzymu neimobilizovaného o stejné hmotnosti v reakční směsi. Následně v průběhu 1. série měření (Graf 7) začala aktivita enzymu pozvolna klesat, až v poslední den vykazoval imobilizovaný enzym 3x nižší aktivitu, než tomu bylo u enzymu neimobilizovaného. Z tohoto důvodu bylo měření ukončeno. Při 2. sérii měření (Graf 8) nebyl pozorován tak velký rozdíl ve specifických aktivitách enzymu na filtračním papíru a neimobilizovaném enzymu. Náhlé zvýšení specifické aktivity volného enzymu ve 3. a 4. dni mohlo být způsobeno nějakou chybou. Naměřené hodnoty

specifických aktivit tak byly celkově více konzistentní. Oproti 1. sérii měření (Graf 7) však byly celkové hodnoty aktivit imobilizovaného i volného enzymu nižší.



Graf 7: Graf závislosti měny specifické aktivity L-asparaginasy imobilizované na filtrační papír na čase – 1.série měření.



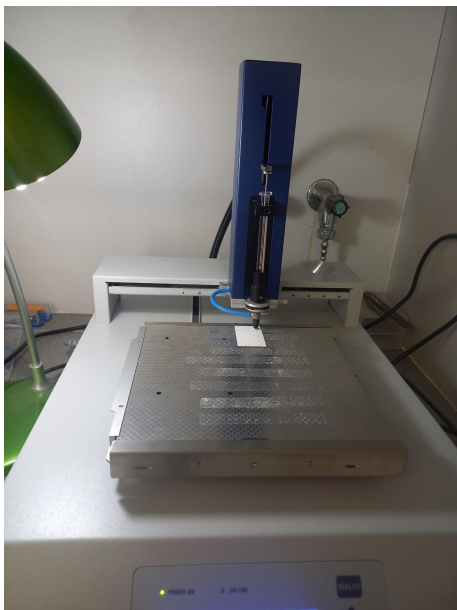
Graf 8: Graf závislosti specifické aktivity L-asparaginasy imobilizované na filtrační papír na čase - 2. série měření.

4.5 Imobilizace na destičku s NiNTA

Pro imobilizaci enzymu ASN339Pt iso 1 bylo 200 μl enzymové směsi pipetováno do jednotlivých jamek destičky, která se nechala inkubovat po 1 hodinu při teplotě 20 °C. Do jednotlivých jamek bylo nanášeno 1020 μg , 204 μg a 41 μg . Po 30-minutové reakci enzymu nebyla naměřena žádná L-asparaginase aktivita. Pokus byl následně opakován s novou destičkou, aby se vyloučil případný technický problém, výsledná aktivita enzymu však opět nebyla detekována. Kvůli vysoké ceně jednotlivých destiček tak nebyl pokus dále opakován.

4.6 Imobilizace na membrány

Jako nosiče pro imobilizaci ASN339Pt iso 1 byly použity tři druhy nitrocelulóзовých biomembrán. Konkrétně se jednalo o membránu Whatman® AE 98 s póry o velikosti 15 μm , membránu Whatman® AE 100 s póry o velikosti 12 μm a membránu Amersham™ Protran™0,45 μm NC s póry o velikosti 0,45 μm . Na membrány byl nanášen enzym pomocí přístroje Linomat 5 (Obrázek 6).

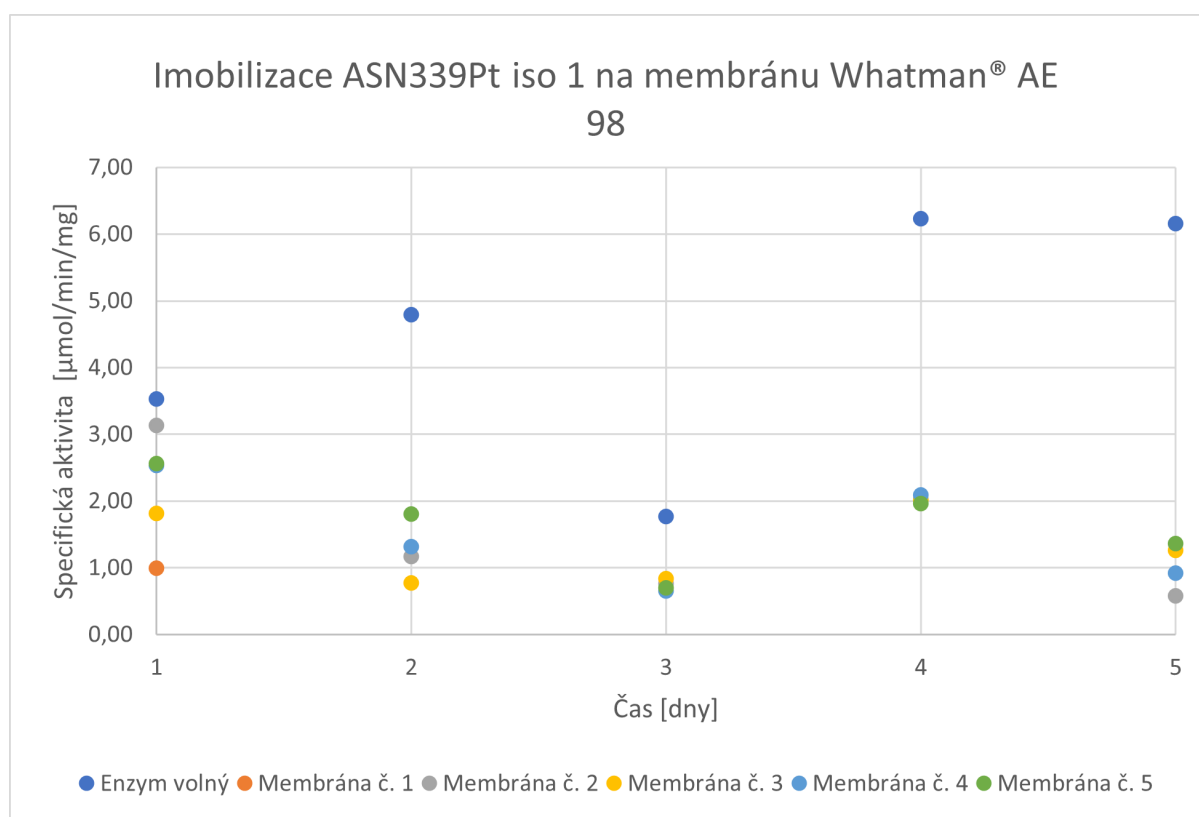


Obrázek 6: Přístroj CAMMAG® Linomat 5 nanášející roztok ASN339Pt iso 1 na membránu Amersham^{MT} ProtranTM0,45 µm NC.

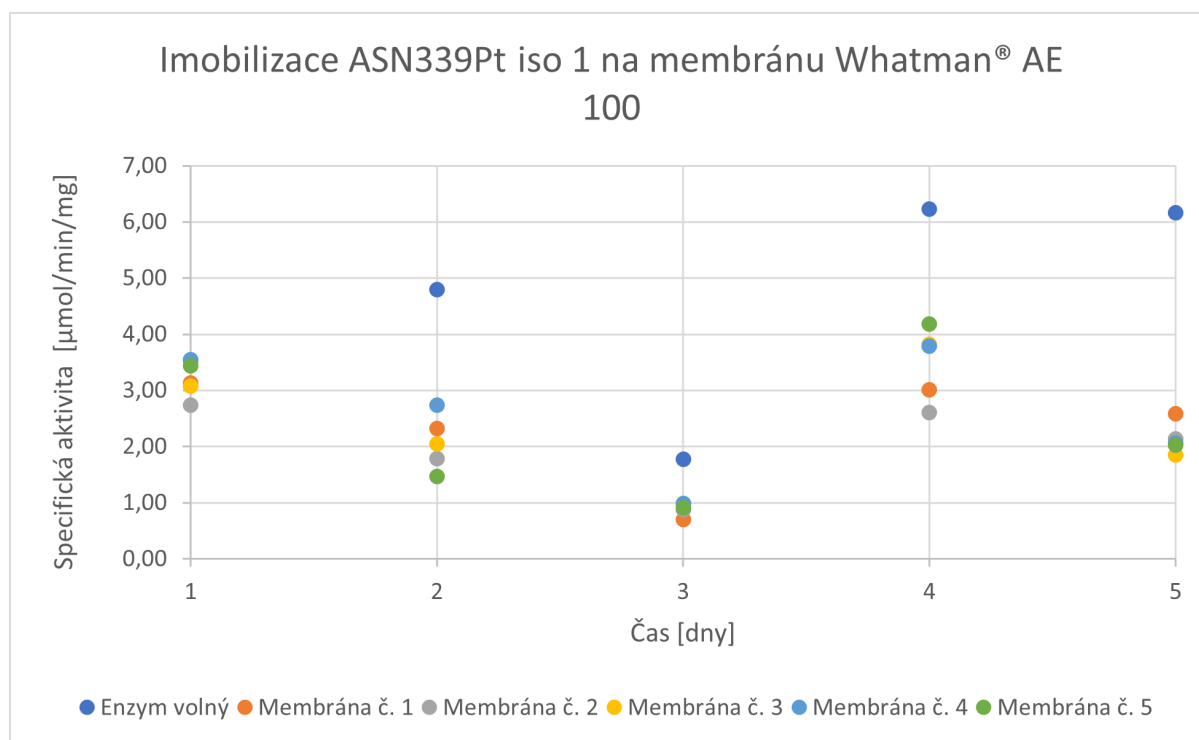
Výsledná aktivita enzymu u všech membrán byla po odečtení slepého vzorku nulová, přičemž kontrolní měření volného enzymu vykazovalo standardní hodnoty aktivity. To mohlo být způsobené dlouhým procesem nanášení enzymu při pokojové teplotě na membránu (celková doba nanášení trvala okolo hodiny) nebo došlo k ovlivnění enzymu při samotném procesu nanášení přístrojem. Nanášení pomocí Linomatu 5 bylo opakováno, tentokrát však pouze do 4 obdélníků membrán, které byly ihned přeneseny k měření enzymové aktivity, aby se vyloučilo poškození enzymu dlouhou dobou nanášení. Aktivita těchto membrán se také po měření rovnala nule.

Na základě těchto poznatků byl přístroj Linomat 5 shledán nevhodným pro nanášení ASN339Pt iso 1. Následně byla připravena nová sada membrán. Enzym byl na obdélníky membrán tentokrát nanášen pomocí pipety. Aby se docílilo toho, že na každém obdélníku bude pouze 5 µl enzymu, membrána byla rozstříhána již před nanášením. Z důvodu nemožnosti využít tento imobilizační nosič k opakovanému využívání byla specifická aktivita enzymu u každého kousku membrán měřena pouze jednou. Při každém měření byla měřena specifická aktivita 5 obdélníků všech 3 typů membrán a 5 µl neimobilizovaného enzymu ASN339Pt iso 1 pro porovnání. Mezi měřeními byly filtrační papíry uchovávány v Petriho miskách z důvodu zamezení kontaminace vnějšími polutanty při 5 °C. Z dat měření

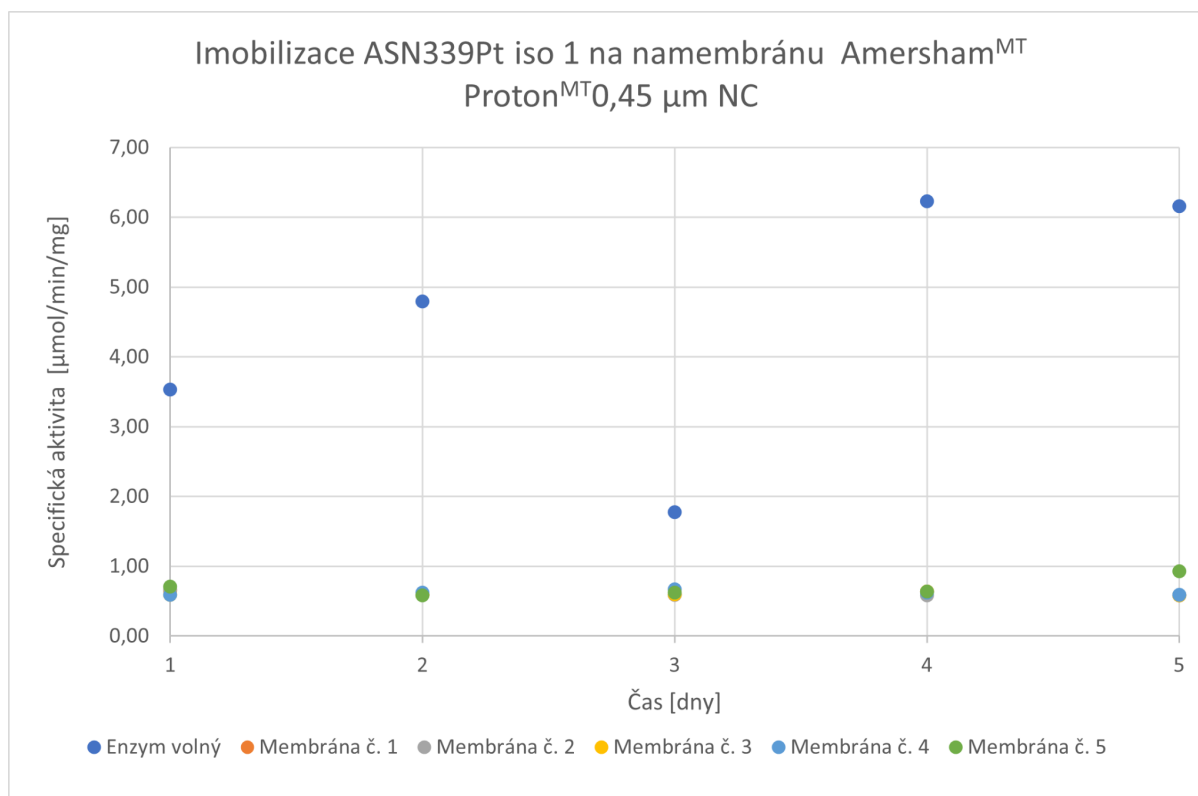
vyplynulo, že nejvyšší specifickou aktivitu vykazoval enzym nanesen na membránu Whatman® AE 100, jejíž velikost pórů činila 12 μm . (Graf 10). U enzymu na této membráně byly výsledky naměřených aktivit také v porovnání se zbylými dvěma nejvíce konzistentními a byl zde naměřen nejnižší rozdíl v porovnání s naměřenou specifickou aktivitou neimobilizovaného enzymu. Z 90% specifické aktivity v první den měření klesla 5. den specifické aktivity na 35 %. U měření enzymu naneseném na membráně Whatman® AE 98, s velikostí pórů 15 μm (Graf 9) byl pozorován, po naměřených vysokých hodnotách v prvním dni měření pokles aktivity při druhém dni měření. Po tomto poklesu však byly v průběhu dalších dní naměřené hodnoty specifické aktivity imobilizovaného enzymu velmi podobné a k poklesu již moc nedocházelo. Oproti membráně Whatman® AE 100 byly hodnoty specifické aktivity v průměru o 16% nižší. Velice překvapující pak byly výsledky enzymu naneseném na membráně AmershamTM ProtonTM0,45 μm NC, kdy byla naměřená aktivita i po nanášení enzymu pomocí pipety rovna téměř nule, přičemž tato hodnota byla naměřena v průběhu celé doby měření. (Graf 11). Nanášení na tuto membránu bylo opakováno 3x, aby se vyloučila chyba konkrétní části membrány, nebo nanesení enzymu bez aktivity. Naměřená absorbance po odečtení slepého vzorky byla vždy téměř nulová.



Graf č. 9: Graf změny specifické aktivity L-asparaginasy imobilizované na membráně Whatman® AE 98. Velikost pórů membrány je 15 µm. Na vodorovné ose (x ose) je zobrazen čas v dnech, zatímco na svislé ose (y ose) je uvedena specifická aktivita enzymu. Graf obsahuje více datových sérií, přičemž jednotlivé barevné body odpovídají měřením provedeným na jednotlivých obdélnících nitrocelulózové membrány (označené jako membrána č. 1" až "membrána č 5") a kontrolní měření volného enzymu (označené jako "Enzym volný")



Graf č. 10: Graf změny specifické aktivity L-asparaginasy imobilizované na membráně Whatman® AE 100. Velikost pórů membrány je 12 µm. Na vodorovné ose (x ose) je zobrazen čas v dnech, zatímco na svislé ose (y ose) je uvedena specifická aktivita enzymu. Graf obsahuje více datových sérií, přičemž jednotlivé barevné body odpovídají měřením provedeným na jednotlivých obdélnících nitrocelulózové membrány (označené jako membrána č. 1" až "membrána č 5") a kontrolní měření volného enzymu (označené jako "Enzym volný")



Graf 11: Graf změny specifické aktivity L-asparaginasy imobilizované na membráně Amersham^{MT} Proton^{MT}0,45 μ m NC. Velikost pórů membrány je 0,45 μ m. Na vodorovné ose (x ose) je zobrazen čas v dnech, zatímco na svislé ose (y ose) je uvedena specifická aktivita enzymu. Graf obsahuje více datových sérií, přičemž jednotlivé barevné body odpovídají měřením provedeným na jednotlivých obdélnících nitrocelulóзовé membrány (označené jako membrána č. 1" až "membrána č 5") a kontrolní měření volného enzymu (označené jako "Enzym volný").

5. Diskuze

L-Asparaginasy, pokud nejsou izolovány z teplomilných či chladomilných kmenů bakterií, mají teplotní optimum v teplotním rozsahu od 37 °C do 60 °C (Jia et al., 2021). Naměřené teplotní optimum zkoumané ASN339Pt iso 1 s teplotním optimem v hodnotách 40 až 45 °C zapadá do hodnot specifických pro tuto skupinu enzymů. Oproti rekombinantní L-asparaginase iso 2 izolované taktéž z *Paenibacillus thiaminolyticus* vykazuje ASN339Pt iso1 i vyšší rozsah teplotního optima o 5 °C (Gürlichová, 2023). I přesto však její teplotní optimum leží v nižší oblasti teplot, což může vést k určitým omezením při potenciálním využití tohoto enzymu v oblasti potravinářství, kdy se teplota při přípravě většiny výrobků, u

kterých hrozí vznik vyššího množství akrylamidu pohybuje nad 60 °C (FoodDrinkEurope, 2019).

Závislost enzymové aktivity na pH je dalším důležitým faktorem ovlivňujícím možnosti použití enzymu v praxi. pH optimum většiny L-asparaginas se nachází v bazických podmínkách v rozmezí pH 8-10. Příkladem mohou být L-asparaginasy izolované ze *Spirulina maxima* s pH optimum 8,5-9 (Abd El Baky, El Baroty, 2016) nebo ze *Streptomycesgulbargensis* s pH optimum 9 (Amena et al., 2010). U zkoumané ASN339Pt iso1 se pH optimum pohybuje také v bazické oblasti (9,5-10 pH), pro tuto skupinu enzymů typickou.

Hodnota Michaelisovy konstanty u L-asparaginas využívaných v medicíně je pro L-asparaginasu z *E. coli* 15 $\mu\text{mol}\times\text{l}^{-1}$ a pro L-asparaginasu z *D. dadantii* 48 $\mu\text{mol}\times\text{l}^{-1}$ (Nguyen et al., 2016). Z odhadované hodnoty Michaelisovy konstanty pro Asp339Pt iso1 z *P. thiaminolyticus* ($K_m = 6,13 \pm 1,11 \text{ mmol/l}$) vyplývá, že tento enzym není vhodný pro použití v medicíně, neboť je jeho konstanta moc vysoká. Ale mohl by se použít v potravinářství, kde K_m používaných enzymů se pohybují v řádu jednotek až desítek mmol/l. Například hodnota Michaelisovy konstanty pro komerčně využívaný *Aspergillus niger* je 1,4 $\text{mmol}\times\text{l}^{-1}$ (Dias et al., 2019).

Výsledná aktivita zkoumané L-asparaginasy z *Paenibacillus thiaminolyticus* imobilizovaná do alginátu sodného byla vyšší, než tomu bylo u stejného typu imobilizace L-asparaginasy získané ze *Streptomyces gulbargensis*, u které byla zachována aktivita 38% (Amena et al., 2010). U L-asparaginasy z *Paenibacillus thiaminolyticus* však nebyla kromě 2% alginátu v průměru nižší než 50 %, kdy první dny svou aktivitou imobilizovaný enzym i výrazně převyšovala. Prudký pokles aktivity 2% alginátových kuliček mohl být pravděpodobně způsoben únikem enzymu do pufru, ve kterém byl přes noc skladován, z důvodu nižší hustoty alginátové sítě kuliček. Díky poměrně vysoké hodnotě specifických aktivit imobilizovaného enzymu a jeho poměrně stabilním hodnotám aktivity při opakovaném používání byl roztok 4% alginátu sodného shledán vhodným pro imobilizaci ASN339Pt iso 1. Další výzkum tak může směřovat k efektivnější formě využití tohoto materiálu, než byly vybrané kuličky, které jsou kvůli svému tvaru pro běžné využívání nepraktické.

Imobilizace ASN339Pt iso 1 adsorpcí na celulóзовý filtrační papír se ukázala jako nevhodná pro opakované využití. Po ponoření enzymu do reakční směsi dochází totiž k

postupnému uvolňování enzymu z povrchu papíru. To je pravděpodobně způsobeno slabou interakcí enzymu s povrchem filtračního papíru. Celulosa, ze které je vyroben, není nijak zvlášť modifikovaná a neobsahuje pravděpodobně větší množství silně nabitých skupin, na které by se enzym ASN339Pt iso 1 mohl navázat. Tím se tak filtrační papír jeví jako nevhodný nosič pro imobilizaci, jelikož opakovatelnost využití je pro enzymový nosič při jeho výběru jedním z hlavních kritérií (Maghraby et al., 2023). Po zjištění, že enzym z filtračního papíru uniká, bylo měření modifikováno. Místo opakovaného měření změny aktivity u vybrané sady stále stejných kusů filtračního papíru od prvního dne byla pozorována změna aktivity enzymu za určitou dobu skladování. Při měření tak byla původně vytvořena sada mnoha kousků filtračních papírů, na které byl první den enzym nanesen a poté byl z této sady vždy vybrán určitý počet papírků, u kterých byla měřena specifická aktivita naneseného enzymu po skladování při 5 °C. Z dat měření vyplynulo, že specifická aktivita u naneseného enzymu klesá pomalu, čímž by mohl být filtrační papír vhodným nosičem pro biosenzory obsahující tento enzym. Filtrační papír je totiž poměrně levný a dostupný materiál. Nicméně slabá vazba enzymu na tento materiál je významnou překážkou.

U imobilizace ASN339Pt iso 1 na nitrocelulosové membrány byl pozorován stejný problém s jejich nemožností opakovatelného využití, podobně jako u filtračního papíru. Po zjištění, že enzym z membrán uniká, bylo měření upraveno. Stejně jako u filtračního papíru byla místo opakovaného měření stejných kusů membrán vytvořena sada mnoha kousků membrán, na které byla nanesena ASN339Pt iso 1. Po zjištění, že přístroj Linomat 5 není vhodným pro nanášení z důvodu dlouhého procesu nanášení, při kterém byl enzym vystaven pokojové teplotě, která pravděpodobně zapříčinila pokles aktivity enzymu, byl k nanášení využit mnohem rychlejší, avšak méně přesný postup, kdy se ASN339Pt iso 1 na membránu pouze nakapala pomocí pipety. To tak mohlo být jedním z důvodů kolísání aktivity u jednotlivých membrán jedné sady. Velmi překvapivé zjištění bylo, že ač byl enzym nanášen na 3 typy membrán, které byly všechny vyrobené z nitrocelulózy a lišily se pouze velikostí pórů (15, 12, 0,45 μm), aktivita naneseného enzymu na membránu s 0,45 μm póry byla, oproti zbylým dvěma membránám, vždy téměř nulová. Nanášení na tuto membránu se opakovalo mnohokrát pro vyloučení použití neaktivního enzymu, znečištěného kusu membrány či chybné koncentrace substrátu. U membrán s 15 μm póry po prvním dni měření, kdy se naměřená specifická aktivita pohybovala v průměru na 73 % oproti volnému enzymu, došlo k poklesu na pouhých 19 %. U membrány s 12 μm póry pak byla naměřená aktivita v průměru o celých 19 % vyšší. Je tak velmi zvláštní, že u membrány s 0,45 μm póry byla aktivita tak

mizivá. Jedno z možných vysvětlení je, že z důvodu vyšší koncentrace nitroskupin (více hustá membrána) mohlo s vyšší pravděpodobností dojít k interakci nitroskupiny s aktivním místem enzymu, což může vést k neaktivitě enzymu (Prabhakar et al., 2025). Také danou membránu vyrábí odlišná firma, než tomu je u předešlých dvou. Nicméně pokles specifické aktivity v průběhu času i u 12 a 15 μ m membrány byl znatelný, a tak nitrocelulosaová membrána nebyla shledána vhodným nosičem pro imobilizace, ani jako potenciální komponenta pro vývoj biosenzorů.

6. Závěr

- Produkce ASN339Pt iso 1 při 37 °C pomocí buněk *Escherichia coli* LEMO 21 (DE3) byla úspěšná
- ASN339Pt iso 1 byla purifikována pomocí afinitní chromatografie na koloně s NiNTA agarosou s výtěžkem 0,86 mg/ml.
- Charakterizace produkované ASN339Pt iso 1:
 - pH optimum: 9,5-10 pH
 - Teplotní optimum: 40-45 °C
 - K_M : 6,13 $\pm$ 1,11 mmol/l
 - V_{lim} : 0,62 $\pm$ 0,03 μ mol/min/mg
 - K_i : 150 $\pm$ 10 mmol/l
- 4% roztok alginátu sodného byl shledán vhodným nosičem pro imobilizaci ASN339Pt iso 1 z důvodu vysokého procenta zachované aktivity enzymu a možnosti opakovatelného použití spolu s jeho zdravotní nezávadností a nízkou pořizovací cenou.
- Destičky s NiNTA agarosou byly shledány jako nevhodný nosič pro imobilizaci ASN339Pt iso 1, z důvodu ztráty aktivity enzymu po nanesení enzymu na destičku.
- Filtrační papír byl shledán nevhodný pro imobilizaci ASN339. Byl také shledán nevhodným jako možný komponent biosenzorů pro detekci L-asparaginu.
- Biomembrány Whatman® AE 98, Whatman® AE 100 a membrána Amersham^{MT} Protran^{MT} 0,45 μ m NC byly shledány jako nevhodné pro imobilizaci ASN339Pt iso 1 kvůli nemožnosti opakovaného využití membrán, nízké aktivitě enzymu po nanesení a poměrně rychlým poklesem aktivity enzymu. Kvůli těmto faktům nebyla ani jedna z

membrán shledána vhodnou jako možný komponent biosenzorů využívající tento enzym.

7. Seznam literatury

ABD EL BAKY, Hanaa H.; EL BAROTY, Gamal S. a GARCÍA GIMÉNEZ, Dolores. Optimization of Growth Conditions for Purification and Production of L-Asparaginase by *Spirulina maxima*. Online. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016, roč. 2016, č. 1. ISSN 1741-427X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2016/1785938>. [cit. 2025-02-15].

AHMAD RAUS, Raha; WAN NAWAWI, Wan Mohd Fazli a NASARUDDIN, Ricca Rahman. Alginate and alginate composites for biomedical applications. Online. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021, roč. 16, č. 3, s. 280-306. ISSN 18180876. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.10.001>. [cit. 2025-02-15].

ALAM, Shahenvaz; PRANAW, Kumar; TIWARI, Rameshwar a KHARE, Sunil Kumar. Recent Development in the Uses of Asparaginase as Food Enzyme. Online. In: PARAMESWARAN, Binod; VARJANI, Sunita a RAVEENDRAN, Sindhu (ed.). *Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability*. Singapore: Springer Singapore, 2019, s. 55-81. ISBN 978-981-13-3262-3. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_5. [cit. 2025-03-09].

ALI, Usman; NAVEED, Muhammad; ULLAH, Abid; ALI, Khadija; SHAH, Sayed Afzal et al. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. Online. *European Journal of Pharmacology*. 2016, roč. 771, s. 199-210. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.023>. [cit. 2025-01-06].

AMENA, Seyda; LINGAPPA, Kattinami; VISHALAKSHI, Nandareddy et al. Immobilization and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Journal of Pure & Applied Microbiology*. 2010, roč. 4, č. 2, s. 623–628. ISSN: 0973-7510.

AMENA, Seyda; VISHALAKSHI, Nandareddy; PRABHAKAR, Mujugond et al. Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, roč. 41, č. 1, s. 173–178.

BAPIRO, Tashinga E.; SYKES, Andy; MARTIN, Scott; DAVIES, Michael; YATES, James W.T. et al. Complete Substrate Inhibition of Cytochrome P450 2C8 by AZD9496, an Oral Selective Estrogen Receptor Degradar. Online. *Drug Metabolism and Disposition*. 2018, roč. 46, č. 9, s. 1268-1276. ISSN 00909556. Dostupné z: <https://doi.org/10.1124/dmd.118.081539>. [cit. 2025-01-06].

BECKETT, Angela a GERVAIS, David. What makes a good new therapeutic l-asparaginase? Online. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019, roč. 35, č. 10. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2731-9>. [cit. 2025-01-06].

BATOOL, Tahira; MAKKY, Essam A.; JALAL, Muna a YUSOFF, Mashitah M. A Comprehensive Review on l-Asparaginase and Its Applications. Online. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2016, roč. 178, č. 5, s. 900-923. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1917-3>. [cit. 2025-03-10].

CACHUMBA, Jorge Javier Muso; ANTUNES, Felipe Antonio Fernandes; PERES, Guilherme Fernando Dias; BRUMANO, Larissa Pereira; SANTOS, Júlio César Dos et al. Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. Online. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, roč. 47, s. 77-85. ISSN 15178382. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004>. [cit. 2025-01-19].

CAO, L. Immobilized Enzymes. Online. In: *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, 2011, s. 461-476. ISBN 9780080885049. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00168-9>. [cit. 2024-12-13].

CHAN, Wai-Kin; HORVATH, Thomas D.; TAN, Lin; LINK, Todd; HARUTYUNYAN, Karine G. et al. Glutaminase Activity of L -Asparaginase Contributes to Durable Preclinical Activity against Acute Lymphoblastic Leukemia. Online. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2019, roč. 18, č. 9, s. 1587-1592. ISSN 1535-7163. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1329>. [cit. 2025-01-04].

CHAN, Wai-Kin; HORVATH, Thomas D.; TAN, Lin; LINK, Todd; HARUTYUNYAN, Karine G. et al. Glutaminase Activity of L -Asparaginase Contributes to Durable Preclinical Activity against Acute Lymphoblastic Leukemia. Online. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2019, roč. 18, č. 9, s. 1587-1592. ISSN 1535-7163. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1329>. [cit. 2025-02-18].

DA CUNHA, Marília Crivelari; DOS SANTOS AGUILAR, Jessika Gonçalves; DE MELO, Ricardo Rodrigues; NAGAMATSU, Sheila Tiemi; ALI, Faraat et al. Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. Online. *Food Research International*. 2019, roč. 126. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108658>. [cit. 2025-02-09].

DA CUNHA, Marília Crivelari; DOS SANTOS AGUILAR, Jessika Gonçalves; DE MELO, Ricardo Rodrigues; NAGAMATSU, Sheila Tiemi; ALI, Faraat et al. Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. Online. *Food Research International*. 2019, roč. 126. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108658>. [cit. 2025-03-09].

DIAS, Fernanda Furlan Gonçalves; SANTOS AGUILAR, Jessika Gonçalves dos a SATO, Helia Harumi. L-Asparaginase from *Aspergillus* spp: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. Online. *3 Biotech*. 2019, roč. 9, č. 7. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1814-5>. [cit. 2025-03-10].

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. *Acrylamide*. 2024. Dostupné: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/acrylamide>. [cit. 2025-03-1].

EUROPEAN UNION. *Commission Regulation (EU) 2017/2158 of 20 November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food*. 2017, [online] Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex%3A32017R2158>. [cit. 2025-02-28].

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Acrylamide*. 2024. Dostupné z <https://www.fda.gov/food/process-contaminants-food/acrylamide>. [citováno 2025-01-8].

FOOD DRINK EUROPE. *Acrylamide toolbox 2019* [online]. Food Drink Europe, 2019 Dostupné z: https://www.fooddrinkeurope.eu/wpcontent/uploads/2021/05/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019.pdf [cit.2025-02-26]

GOVARDHAN, Chandrika. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999, roč. 10, č. 4, s. 331-335.

GÜRLICHOVÁ, Veronika. *Produkce a charakterizace rekombinantní L-asparaginasy isoenzym 2 z Paenibacillus thiaminolyticus*. Bakalářská práce. Fakulta potravinářské a biochemické technologie. 2023.

HAZUCHOVÁ, Eva. *Enkapsulace různých typů enzymů do organických částic*. Online, Bakalářská práce, vedoucí Ivana Márová. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Centrum materiálového výzkumu, 2014. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/31384>. [cit. 2025-01-08].

IZADPANA, QESHMI, Farad. et. al. Persian Gulf is a bioresource of potent L-asparaginase producing bacteria: identification & molecular differentiating. *International Journal of Environmental Research*. 2014, roč. 8, č. 3, s. 813–818.

JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub a KRAJEWSKA, Barbara. Enzyme immobilization by adsorption: a review. Online. *Adsorption*. 2014, roč. 20, č. 5-6, s. 801-821. ISSN 0929-5607. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>. [cit. 2025-03-09].

KORECKÁ, Lucie. *Enzymy v cílené modifikaci a diagnostice biologicky aktivních látek*. Habilitační práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd. 2020. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/users/225/Korecka_hab.prace.pdf [cit. 2025-03-02].

KRETSINGER, Robert H. Calcium-Binding Proteins, Overview. Online. In: KRETSINGER, Robert H.; UVERSKY, Vladimir N. a PERMYAKOV, Eugene A. (ed.). *Encyclopedia of Metalloproteins*. New York, NY: Springer New York, 2013, s. 521-536. ISBN 978-1-4614-1532-9. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_63. [cit. 2025-03-09].

LUBKOWSKI, J. et. al. A novel L-Asparaginase with low L-Glutaminase coactivity. *Cancer Research*, 2018, [online], 78(6), 1549–1559 [cit. 2025-02-26]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2669. Dostupné z:

<https://aacrjournals.org/cancerres/article/78/6/1549/633153/A-Novel-L-Asparaginase-with-low-L-Glutaminase>)

LOCH, Joanna I. a JASKOLSKI, Mariusz. Structural and biophysical aspects of L-asparaginases: a growing family with amazing diversity. Online. *IUCrJ*. 2021, roč. 8, č. 4, s. 514-531. ISSN 2052-2525. Dostupné z: <https://doi.org/10.1107/S2052252521006011>. [cit. 2025-03-09].

MAGHRABY, Yasmin R.; EL-SHABASY, Rehan M.; IBRAHIM, Ahmed H. a AZZAZY, Hassan Mohamed El-Said. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. Online. *ACS Omega*. 2023, roč. 8, č. 6, s. 5184-5196. ISSN 2470-1343. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>. [cit. 2025-03-09].

MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ. *Více než třetina hygieniky kontrolovaných jídel přesáhla limity karcinogenního akrylamidu*. 2025, [online]. Dostupné z: <https://mzd.gov.cz/tiskove-centrum-mz/vice-nez-tretina-hygieniky-kontrolovanych-jidel-pres-ahla-limity-karcinogenniho-akrylamidu/> [cit. 2025-02-28].

MICHAELSKA, Karolina a JASKOLSKI, Mariusz. Structural aspects of l-asparaginases, their friends and relations. *Acta Biochimica Polonia*. 2006, roč. 53, č. 4, s. 627–640.

MORENO-ENRIQUEZ, Angelica et. al. Biochemical characterization of recombinant L-asparaginase (AnsA) from *Rhizobium etli*, a member of an increasing rhizobial-type family

of L-asparaginases. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, roč. 22, č. 3, s. 292–300.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. *Asparaginase*. NCI Drug Dictionary. 2025. [cit. 2025-02-28]. Dostupné z: (<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/asparaginase>)

NGUYEN, H. A., SU, Y. & LAVIE, A. Design and characterization of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase variants with diminished L-glutaminase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, č. 291, s.17664-17676.

PEJŠKOVÁ, L., K. LOUŽECKÁ, T. PODZIMEK a E. BENEŠOVÁ. L-Asparaginasy a jejich potenciál v medicíně a potravinářství. *Chemické listy* [online]. 2023, cit. [2025-02-28]. Dostupné z: (www.chemicke-listy.cz)

PORTO, Ana Carolina Vieira; FREITAS-SILVA, Otniel; SOUZA, Erika Fraga de a GOTTSCHALK, Leda Maria Fortes. Effect of Asparaginase Enzyme in the Reduction of Asparagine in Green Coffee. Online. *Beverages*. 2019, roč. 5, č. 2. ISSN 2306-5710. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/beverages5020032>. [cit. 2025-03-09].

RICE, Jerry M. The carcinogenicity of acrylamide. Online. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2005, roč. 580, č. 1-2, s. 3-20. ISSN 13835718. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.09.008>. [cit. 2025-03-09].

QORES. *An overview of how the innovative use of enzymes is driving the production of healthier and safer baked goods in response to growing concerns about Acrylamide and public health*. 2021. Dostupné z: <https://qores.it/en/enzymes-in-the-service-of-health-reducing-acrylamide-in-baked-goods/>. [cit. 2025-01-04].

VÁVROVÁ, Jaroslava a PEŠKOVÁ, Karolína. *Aminokyseliny*. ČSKB ČLS JEP. Pardubice: SEKK,s. r. o., 2005.

VERMA, Neelam; BASAL, Monika a KUMAR, Sachin. Whole cell based miniaturized fiber optic biosensor to monitor L-asparagine. *Advances in Applied Science Research*. 2012, č. 3, s 809-814.

VINMEC INTERNATIONAL HOSPITAL. *What are the uses of L-asparaginase?*. Vinmec International Hospital. 2025 [cit. 2025-01-10]. Dostupné z: (<https://www.vinmec.com/en/pharmaceutical-information/use-medicines-safely/what-are-the-uses-of-l-asparaginase>)

XU, Fei. *Acrylamide mitigation in coffee by asparaginase application*. PhD thesis, University of Reading. 2017.

MAGHRABY, Yasmin R.; EL-SHABASY, Rehan M.; IBRAHIM, Ahmed H. a AZZAZY, Hassan Mohamed El-Said. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. Online. *ACS Omega*. 2023, roč. 8, č. 6, s. 5184-5196. ISSN 2470-1343. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>. [cit. 2025-03-09].

ZUCCA, Paolo a SANJUST, Enrico. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules*. 2014, roč. 19 č. 9, s 14139-14194. Dostupné z: (<https://doi.org/10.3390/molecules190914139>)

