

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Vývoj, studium a využití imobilizovaných enzymů
a bioafinitních nosičů

HABILITAČNÍ PRÁCE

2023

Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.

Obsah

A. KOMENTÁŘ K SOUBORU PUBLIKACÍ

Úvod – Vývoj, studium a využití imobilizovaných enzymů a bioafinitních nosičů	1
Blok I – Magnetické enzymové nosiče k cílené modifikaci proteinů	7
Blok II – Magnetické enzymové a bioafinitní nosiče v mikrofluidním uspořádání	24
Blok III – Nanovláknenné nosiče enzymů v biomedicině	36
Reference	42

B. PŘÍLOHA – SOUBOR PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Blok I – Magnetické enzymové nosiče k cílené modifikaci proteinů.....	60
I-1 Bílková, Z., Slováková, M., Horák, D., Lenfeld, J., & Churáček, J. (2002). Enzymes immobilized on magnetic carriers: efficient and selective system for protein modification. <i>Journal of Chromatography B</i> , 770(1–2), 177–181. https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00037-5	61
I-2 Hromadkova, L., Kupcik, R., Vajrychova, M., Prikryl, P., Charvatova, A., Jankovicova, B., Ripova, D., Bilkova, Z., & Slováková, M. (2018). Kinase-loaded magnetic beads for sequential: In vitro phosphorylation of peptides and proteins. <i>Analyst</i> , 143(2), 466–474. https://doi.org/10.1039/c7an01508a	67
I-3 Slováková, M., Sedlák, M., Křížková, B., Kupčík, R., Bulánek, R., Korecká, L., Drašar, Č., & Bílková, Z. (2015). Application of trypsin Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ core/shell nanoparticles for protein digestion. <i>Process Biochemistry</i> , 50(12), 2088–2098. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.09.002	79
Blok II – Magnetické enzymové a bioafinitní nosiče v mikrofluidním uspořádání.....	91
II-1 Slováková, M., Minc, N., Bilkova, Z., Smadja, C., Faigle, W., Fütterer, C., Taverna, M., & Viovy, J.-L. (2005). Use of self assembled magnetic beads for on-chip protein digestion. <i>Lab on a Chip</i> , 5(9), 935. https://doi.org/10.1039/b504861c	92
II-2 Jankovicova, B., Rosnerova, S., Slováková, M., Zverinova, Z., Hubalek, M., Hernychova, L., Rehulka, P., Viovy, J.-L., & Bilkova, Z. (2008). Epitope mapping of allergen ovalbumin using biofunctionalized magnetic beads packed in microfluidic channels. <i>Journal of Chromatography A</i> , 1206(1), 64–71. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.062	101

II-3 le Nel, A., Minc, N., Smadja, C., Slováková, M., Bilkova, Z., Peyrin, J.-M., Viovy, J.-L., & Taverna, M. (2008). Controlled proteolysis of normal and pathological prion protein in a microfluidic chip. <i>Lab on a Chip</i> , 8(2), 294. https://doi.org/10.1039/b715238h	110
Blok III – Nanovláknenné nosiče enzymů v biomedicině	119
III-1 Srbová, J., Slováková, M., Křípalová, Z., Žárská, M., Špačková, M., Stránská, D., & Bílková, Z. (2016). Covalent biofunctionalization of chitosan nanofibers with trypsin for high enzyme stability. <i>Reactive and Functional Polymers</i> , 104, 38–44. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.05.009	120
III-2 Slováková, M., Köhlerova, R., Dvorakova, P., Vanova, V., Spackova, M., & Munzarova, M. (2022). Clostridial Collagenase Immobilized on Chitosan Nanofibers for Burn Healing. <i>Military Medical Science Letters</i> , 91(4), 324–334. https://doi.org/10.31482/mmsl.2022.012	128

A. KOMENTÁŘ K SOUBORU PUBLIKACÍ

Úvod – Vývoj, studium a využití imobilizovaných enzymů a bioafinitních nosičů

Enzymy jsou bioaktivní látky, nedílná a nezbytná součást všech buněk a živých organismů ve všech vývojových stadiích. Jedná se o proteiny s biologickou aktivitou, schopností katalyzovat přeměny substrátů na látky jiné. Jsou také označovány jako metabolické proteiny organismu. Jejich vlastnosti, vysoká katalytická účinnost, značná reakční a substrátová specifita a obvykle velmi mírné podmínky pro katalýzu (37 °C, pH přibližně 7) je možné využít i mimo organismus a jejich přirozené prostředí.

Enzymy jsou rozděleny do 6 tříd, podle typu katalyzované reakce – na oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerasy a ligasy. Jejich jedinečností je vysoká katalytická účinnost v poměru s nízkou koncentrací a zkrácením času potřebného pro katalyzovanou reakci. Enzymy jsou z těchto důvodů široce využívány v množství katalýz v základním biochemickém výzkumu, v průmyslu (katalýzy, biotechnologie), ve výrobě léků, diagnostických reagensů, v biomedicině (diagnostika, substituce ve formě biologické léčby) (Sun et al. 2006, Zlateski et al. 2014, Mazurenko et al. 2020, Guo et al. 2020).

Velkou výhodou je, že se dnes tyto bioaktivní proteiny vyrábí i rekombinantní technologií, ačkoliv i ta má ještě některé své slabiny. Přímý produkt translace je obvykle nefunkční a posttranslační modifikace (PTM) jako glykosylace, fosforylace, metylace, acetylace, nitrace jsou nutné. Produkční kmeny bakteriálních buněk anebo kvasinky a prvoci obvykle nejsou schopni posttranslační modifikace vyšších eukaryot zajistit, jak shrnuje např. (Rosano et al. 2014). Zajištění příslušné PTM pak spočívá v mnoha přístupech, často v enzymové katalýze (shrnutí v Sahdev et al. 2008).

Nejvýraznější nevýhody volných enzymů spočívají v jejich inaktivaci a degradaci mimo jejich fyziologické podmínky. Zároveň při časově náročných procesech je volná forma enzymů nestabilní a v závislosti na jejich zdroji se zvyšují náklady a omezují biotechnologické aplikace (Bilal et al. 2016). Vzhledem k proteinové povaze mohou změny v prostředí ovlivnit nativní strukturu enzymu, která postupně degraduje a enzym ztrácí biologickou aktivitu.

Snížení dopadu nevýhod volných enzymů se prokázalo jejich vazbou na nerozpustné, inertní nosiče (přehled v Berezin a Klesov, 1976), a to rozpoutalo expanzi článků popisujících vazbu, kinetiku a využití imobilizovaných enzymů. Mezi nejčastější vazby v dnešní době patří např. kovalentní imobilizace (Nuytten et al. 2010, Wang et al. 2019a, Yousefi et al. 2020), uchycení v materiálech metodou sol-gel (Bilal et al. 2016) a síťování enzymových agregátů (CLEA) také prostřednictvím BSA a polymerů (Asgher et al. 2018, Nguyen et al. 2017, Yamaguchi et al. 2018). Ve srovnání s volnými enzymy jsou imobilizované enzymy ve většině případů robustnější a odolnější vůči změnám prostředí, dochází ke

zlepšení enzymové aktivity a stability (Matosevic et al. 2010, Přikryl et al. 2012). Podobně jsou imobilizací na pevné nosiče stabilizovány proteázy (Pinto et al. 2015). Zvýšená teplotní a pH stabilita některých imobilizovaných enzymů umožňuje jejich zařazení do on-line analytického procesu (Korecká et al. 2005, Bílková et al. 2006, Song et al. 2014, Mukhopadhyay et al. 2015). Enzymy vázané na pevnou fázi jsou rychle separovány z reakčního média, bez kontaminace produktu molekulami enzymu. Vázané enzymy je možné použít opakovaně ve více cyklech (Sun et al. 2017, **I-2**). Hlavními faktory, které je třeba vzít v úvahu při imobilizačním procesu, jsou celková enzymová aktivita, způsoby deaktivace a reaktivace enzymu a inhibiční vliv imobilizačních činidel (Bílková et al. 2002, Shangguan et al. 2015, Chatzigeorgiou et al. 2023).

Imobilizované enzymy jsou dnes využívány v mnoha různých aplikacích - v proteomických studiích (**I-3**, Khaparde et al. 2020, Cornelio et al. 2018), v enzymem katalyzované degradaci proteinů (Mukhopadhyay et al. 2015), při hojení ran (Baidamshina et al. 2020, **III-1**), při zpracování odpadních vod a látek (Netto et al. 2018), v biotechnologické produkci látek (Rotková et al. 2009, Yaohua et al. 2019), v produkci a zpracování biopaliv (Rastian et al. 2016, Binhayeeding et al. 2022); a uspořádáních - v mikrofluidice (**II-1**, Kerby et al. 2006, **II-2**, **II-3**, Küchler et al. 2015, Wouters et al. 2017), v biosenzorech (Blanes et al. 2007, Sheng et al. 2012, El-Moghazy et al. 2016, Sys et al. 2020), v kaskádovitých enzymových reakcích (Nguyen et al. 2017, Zhou et al. 2022, Gottschalk et al. 2022). Imobilizované enzymy se objevují v bio/afinitní chromatografii, v biospecifických afinitních aplikacích (přehled v Łacki et al. 2020) a afinitní chromatografii ve screeningu inhibitorů a substrátů (Hogson et al. 2004, Wang et al. 2017, Cornelio et al. 2018). Bioafinitní chromatografie je založená na specifické a obvykle reverzibilní vazbě látek k pevně vázanému ligandu na nosiči, a slouží tím k izolaci a purifikaci enzymů (Korecká et al. 2008, Bayramoglu et al. 2014, Chen et al. 2018), i k jejich imobilizaci.

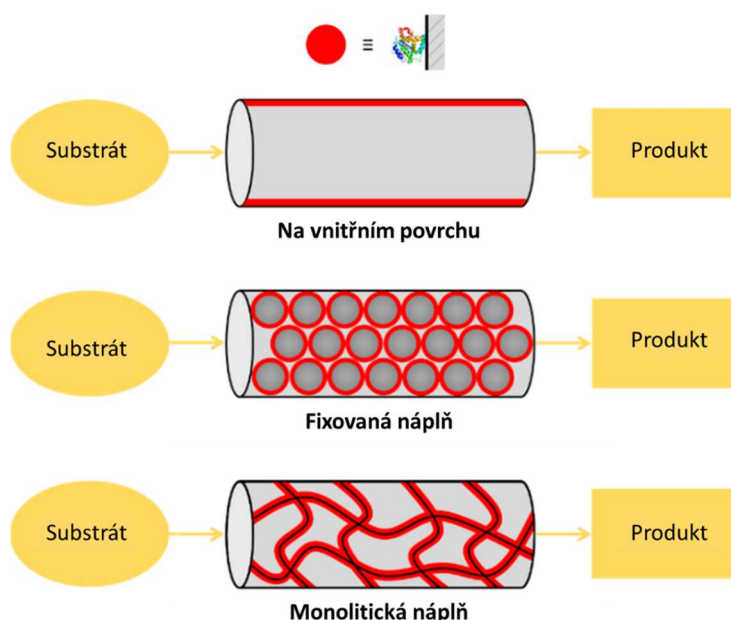
Tato habilitační práce je zaměřená na vývoj magnetických nosičů s imobilizovanými enzymy. Uvedené články v práci popisují, jak je možné tyto enzymové systémy použít v analýze proteinů a analýze jejich PTM (fosforylace), v peptidovém mapování alergenů a biomarkerů a v cílené modifikaci proteinů. To také ve spojení s mikrofluidikou. Část habilitační práce tvoří články popisující vývoj nanovláken s imobilizovanými proteasami pro oblast biomedicíny a enzymy zprostředkované hojení ran. Smyslem habilitační práce jsou příklady využití imobilizovaných enzymů v poměrně úzkých aplikacích, ale jsem si vědoma širší jejich možných dalších využití.

Principy imobilizace enzymu k pevné fázi a příprava biospecifického afinitního nosiče s ligandem, se v řadě parametrů řídí shodnými pravidly. Obě zahrnují imobilizaci kovalentní (Korecká et al. 2008, **II-3**, Wu et al. 2013, **I-3**, **III-2**), biospecifickou afinitní vazbu (Bílková et al. 1997, Turková et al. 1999, Holland-Nell et al. 2007, Khaparde et al. 2020), vazbu využívající principu afinitní chromatografie pomocí

imobilizovaných kovových iontů (Zatloukalová et al. 2004, I-2, Łacki et al. 2020), enkapsulační vazbu (Besanger et al. 2006, Guo et al. 2020) a někdy také adsorpci (Derwinska et al. 2008). Prostá sorpce enzymů na nosiče je pro katalýzu nevyužitelná, protože jejich uvolňování je nežádoucí.

Možností, jak použít nosič s vázaným enzymem ke katalýze je více. S ohledem na způsoby používané ve výzkumu a biomedicínských aplikacích, se zaměřujeme se na vsádková (tzv. batch) a kolonová uspořádání. Vysokou účinná kapalinová chromatografie je jednou z kolonových technik, která používá fixované imobilizované enzymové a afinitní reaktory (immobilized enzyme reactor, IMER a immobilized affinity reactor, IMAR), (Cornelio et al. 2018). Miniaturizací IMER a IMAR do mikroprůtočného uspořádání se zabývá mikrofluidika (II-1, Bílková et al. 2006, II-2, II-3, Ou et al. 2019). Na principu bioafinitní chromatografie jsou podobně založené afinitní monolitická chromatografie (Brne et al. 2009) a afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC) (Khaparde et al. 2020).

K vazbě enzymů se využívají nosiče a částice z různých materiálů, velikostí a stupněm porozity. Enzymová katalýza s mikrometrovými sférickými částicemi s různou porozitou jsou nejčastější v nízkotlakém kolonovém uspořádání (I-1, Bílková et al. 2002, Park et al. 2011, Kučerová et al. 2014) (Obr. 1). Neporézní částice (např. hydroxyetyl metakrylátové), vhodné k separaci látek, a částice s malou velikostí pórů, mohou být vhodnější ke studiu orientace imobilizovaného enzymu anebo aby se zabránilo kinetickému omezení enzymové hydrolýzy proteinu (Turková et al. 1999, Wu et al., 2006,

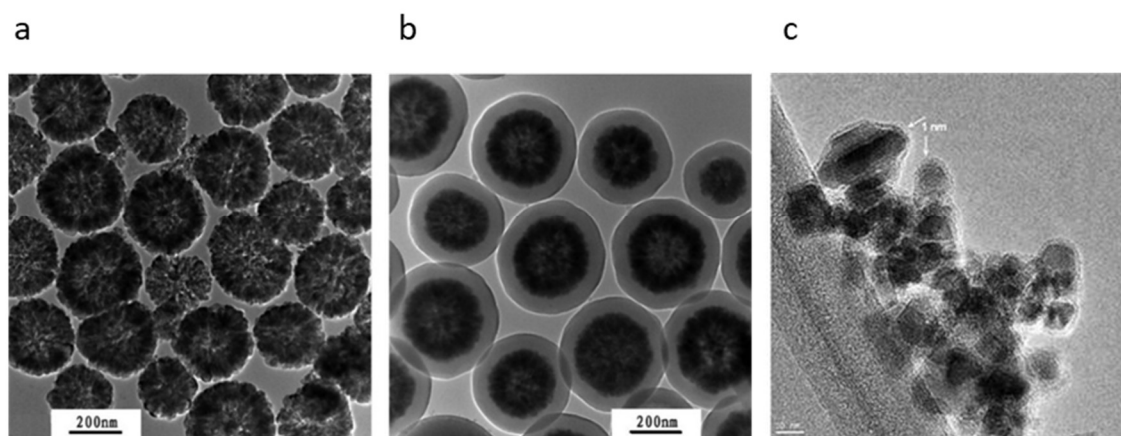


Obrázek 1. Typy enzymových reaktorů. Shora – enzym je imobilizovaný na vnitřním povrchu mikrokanálku nebo kapiláry. Uprostřed – kapilára s fixovanými částicemi s imobilizovaným enzymem. Dole – monolitický mikroreaktor, ve kterém je enzym imobilizován v pórech anebo kanálcích monolitického materiálu (převzato a upraveno podle Nagy et al. 2022).

Mohy Eldin et al. 2015, Çelebi, 2017). Vazba ligandů na neporézní částice je možná jen na vnější povrch částic. Ale se snižováním velikosti částic až na velikost nanočástic se zvyšuje velikost jejich specifického povrchu v poměru k objemu. Nanočástice se pro katalýzu v kolonovém uspořádání využívají málo, protože jejich použitím v průtočných systémech by bylo potřeba použít vysokých tlaků (Mohy Eldin et al. 2015). Jinou variantou jsou monolitické náplně kolon, tvořené souvislým porézním materiálem z akrylátových polymerů (Obr. 1) (Brne et al. 2009, Khaparde et al. 2020). Jejich vlastnosti a výhody jsou, mimo velký specifický povrch, založené na polymeraci *in situ*, odolných mechanických vlastnostech i zvýšeném přenosu hmoty (high mass transfer property).

V Bločích I a II habilitační práce jsou zařazeny články zaměřené na vývoj a aplikace enzymů vázaných na magnetické sférické mikro a nanočástice. Tyto částice jsou tvořené obalem a magnetickým jádrem, (Obr. 2). Povrchová vrstva částic nejenže kryje oxidy železa, ale přináší funkční skupiny ke kovalentní nebo afinitní vazbě ligandů (**II-1**, Chen et al. 2008, Kucerova et al. 2014, **I-2**). Typickou vlastností superparamagnetismu magnetických částic je možnost jejich fixování v magnetickém poli, zatímco mimo magnetické pole se jejich magnetismus neprojevuje.

Blok II se zaměřuje na práce popisující vývoj a aplikace IMER, tj. magnetických mikročástic s imobilizovanými enzymy aplikované do mikroprůtočného zařízení (**II-1**, Bílková et al. 2006) a IMAR, imobilizované afinitní reaktory s aplikacemi bioafinitní chromatografie (**II-2**, Korecká et al. 2008). Podobně jsou IMER a IMAR vyvíjeny a využívány v tzv. „magnetically-stabilized fluidized bed reactors“ a „magnetic fluidized bed reactors“ (Bayramoglu et al. 2014, Zhou et al. 2014, Chen et al. 2018, Hernandez-Neuta et al. 2018, Ou et al. 2019).

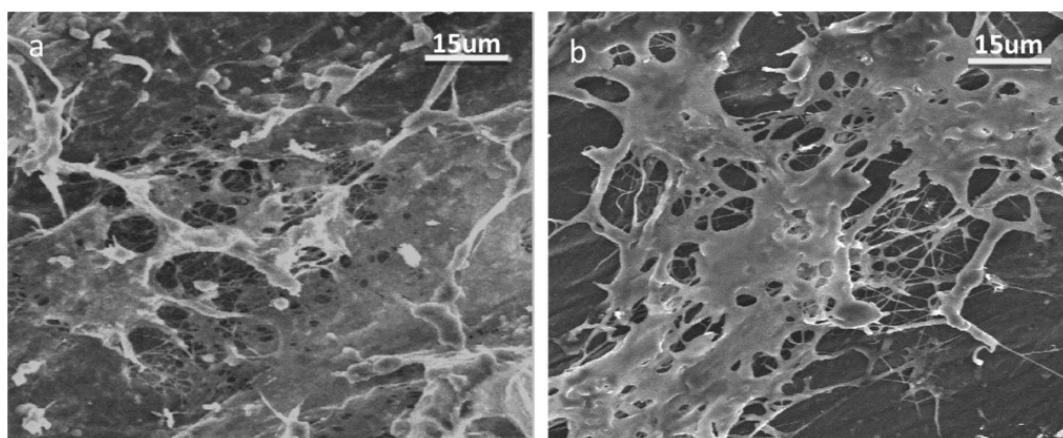


Obrázek 2. Snímek z transmisního elektronového mikroskopu: (a) magnetické mikročástice (b) po obalení do SiO₂ a velikostí přibližně 200 nm (Li et al. 2007), (c) magnetické nanočástice s obalem tvořeným dendrimerem polyamidoaminem s velikostí 16 ± 5 nm (Khodadust et al. 2013). Použito se souhlasem nakladatelů (American Chemical Society a Springer Nature).

Jinými nosiči pro vazbu enzymů, na které je v habilitační práci zaměřen **Blok III**, jsou polymerní nanovlákná. Objev přípravy zvlákněných polymerů do formy nanovláknenných membrán a nosičů/konstruktů umožnil využití imobilizovaných enzymů, například ve formě propustných filtračních membrán anebo nanovláknenných kompozitů. Nanovlákná mají mnoho mimořádných vlastností, včetně porézní struktury a velkého poměru povrchu k objemu (Medina-Castillo et al. 2022).

Nanovláknenné nosiče s enzymy jsou vyvíjeny pro aplikace enzymové katalýzy (Wong et al. 2014, Pinto et al. 2015, Zhang et al. 2022). Nanovlákná lze vyvíjet jako nosiče pro dodávání terapeutických látek („drug delivery“) do organismu, protože nanovlákná za vhodných podmínek umožňují adhezi, proliferaci i diferenciaci různých buněk (Obr. 3) (Ghasemi-Mobarakeh et al. 2009, Cho et al. 2010, Liu et al. 2013, Qu et al. 2013, Meamar et al. 2021). Současné uplatnění nanovláken s enzymy zahrnuje cílené doručování látek v souvislosti s jejich antimikrobními účinky (Shoba et al. 2017, Abolghasemzade et al. 2021), v aplikacích tkáňového a kostního inženýrství (Yu et al. 2013, Zhijiang et al. 2019, Sofi et al. 2021), pro hojení ran a regeneraci tkání (Dubský et al. 2012, **III-1**, **III-2**, Bryan et al. 2022), a také jako *in vivo* senzory (Chen et al. 2015). Antimikrobiální aplikace proteas imobilizovaných na nanovláknenné materiály se uplatnila v oblasti hojení ran (Qu et al. 2013). Tato oblast vývoje byla naší motivací spolupráce s libereckými společnostmi Elmarco a Nano Medical.

Ve vývoji nanovláken pro biomedicínské aplikace se klade důraz na výběr biokompatibilních materiálů. Polymery pro nanovlákná musí být v zásadě netoxické, hydrofilní, a biodegradabilní pro případy, ve kterých mají být v čase a podmínkách *in vivo* rozloženy (Hirsch et al. 2018, Zhijiang et al. 2019). Vhodné jsou přírodní polymery kolagen, želatina, celulóza, chitosan a polymléčná kyselina (PLA). Ze syntetických to jsou polyvinylalkohol (PVA), polymethylmetakrylát (PMMA), fibroin z hedvábí (SF) a



Obrázek 3. Morfologie osteoblastových buněk MG-63 adherovaných na nanovláknennou membránu připravenou metodou elektrospiningu z bakteriální celulósy (**a**) a membránu modifikovanou přídavkem sójového proteinu (**b**) po 48 hodinách kultivace (Zhijiang et al. 2019). Použito se souhlasem nakladatele (Springer Nature).

polykaprolakton (PCL). Příkladem anorganických nanovláken s ligandy je zvlákněný hydroxyapatit (Pasuri et al. 2015).

Habilitační práce shrnuje články, které se zabývají imobilizací enzymů a protilátek na magnetické mikro – a nanočástice a na polymerní nanovlákná, a jejich využitím v různých oborech. Jedná se o soubor 8 publikací, které vznikaly v období 2002–2022, rozdělených do tří tematických bloků. Publikace zahrnuté v **Bloku I** se týkají imobilizací a využitím enzymů z podtříd glykosidas (neuraminidasa), serinových endopeptidas (trypsin), oxidas (galaktozaoxidasa) a serin/threonin proteinkinas (ERK2 a GSK3 β), na nově vyvíjené a komerční magnetické sférické částice. Superparamagnetické vlastnosti magnetických částic s enzymy a protilátkami umožnily jejich fixaci v kanálcích mikrofluidního zařízení (v mikročipech), a jejich aplikace jsou uvedeny v **Bloku II**. Miniaturizace enzymových reakcí je v tomto bloku naplněna třemi publikacemi s enzymy tryptinem, alfa-chymotryptinem a pepsinem a proteínasou K. Publikace v **Bloku III** zahrnují dvě práce, ve kterých jsou trypsin a mikrobiální kolagenasa imobilizované na chitosanová nanovlákná připravená elektrostatickým zvlákněním. Cílem předkládaného souboru prací je shrnutí motivací vývoje imobilizovaných enzymů na různé typy nosičů. Jejich aplikacemi a výsledky v biochemii, biotechnologii a v biomedicíně jsem se pokusila ukázat na směry vývoje v těchto oblastech.

Blok I – Magnetické enzymové nosiče k cílené modifikaci proteinů

I-1 Bílková, Z., Slováková, M., Horák, D., Lenfeld, J., & Churáček, J. (2002). Enzymes immobilized on magnetic carriers: efficient and selective system for protein modification. *Journal of Chromatography B*, 770(1–2), 177–181. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00037-5)

Autorský podíl: 40 %

Připravovala jsem imobilizované enzymy, stanovila enzymové aktivity a stability, podílela jsem se na přípravě publikace.

I-2 Hromadkova, L., Kupcik, R., Vajrychova, M., Prikryl, P., Charvatova, A., Jankovicova, B., Ripova, D., Bilkova, Z., & Slováková, M. (2018). Kinase-loaded magnetic beads for sequential: In vitro phosphorylation of peptides and proteins. *Analyst*, 143(2), 466–474. <https://doi.org/10.1039/c7an01508a>

Autorský podíl: 40 %

Podílela jsem se na koncepci článku, imobilizacích kinas, fosforylacích, a připravila jsem text.

I-3 Slováková, M., Sedlák, M., Křížková, B., Kupčík, R., Bulánek, R., Korecká, L., Drašar, Č., & Bílková, Z. (2015). Application of trypsin $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ core/shell nanoparticles for protein digestion. *Process Biochemistry*, 50(12), 2088–2098. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.09.002>

Autorský podíl: 60 %

Připravila jsem koncept práce, imobilizovaný trypsin, enzymovou charakteristiku a proteolýzu. Napsala jsem publikaci.

Články zahrnuté v **Bloku I** habilitační práce se zabývají imobilizací enzymů na sférické magnetické mikro a nanočástice a jejich využitím k cílené strukturální modifikaci proteinů a v proteomice. Vytvoření definovaných proteinových konjugátů na nosičích nebo se značkami je zásadní pro mnohé studie a biotechnologie (Rosen a Francis, 2017). Osvědčené metody pro přípravu konjugátů obvykle zahrnují kovalentní, tj. chemické modifikace proteinu. Ty sebou ale nesou rizika nevhodné orientace proteinu a ztráty biologické aktivity po konjugaci. Jednou z osvědčených možností pro její zachování je navržení enzymové modifikace proteinu, která navíc probíhá za mírných podmínek. V první práci (**I-1**) jsme se zabývali cílenou modifikací sacharidového řetězce imunoglobulinu G – specifickou enzymovou oxidací terminální galaktosy imobilizovanými enzymy. Ta mohla vést ke konjugaci IgG k pevnému nosiči nebo jeho značení. Podobnými principy cílené modifikace proteinů a glykoproteinů imobilizovanými enzymy

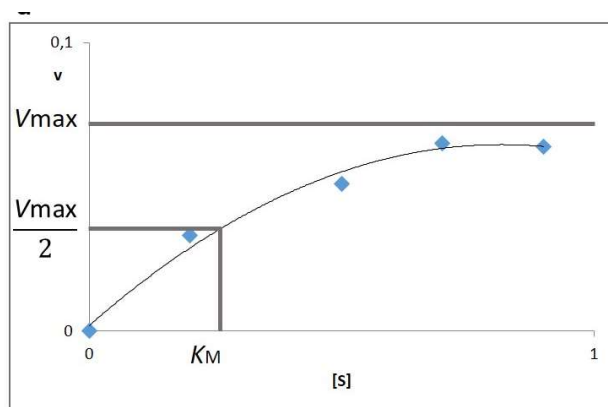
se zabývali také další autoři (Pscheidt et al. 2005, Krenkova et al. 2013, Bidondo et al. 2022). Modifikované anebo proteolyticky štěpené proteiny tak byly připravené s vysokou čistotou a bez kontaminace enzymy. V další práci v tomto bloku (**I-2**) jsou představeny možnosti *in vitro* kaskádové fosforylace rekombinantních proteinů s imobilizovanými proteinkinázami. Třetí práce (**I-3**) popisuje proteomickou analýzu trypsinem imobilizovaným na nově vyvinuté superparamagnetické nanočástice.

Enzymová aktivita

Klíčovou vlastností imobilizovaných enzymů je jejich vysoká enzymová aktivita. Katalýza probíhá na aktivních místech enzymu a obvykle nezahrnuje malou nebo lineární část molekuly enzymu. Proto je důležité během imobilizace zachovat neporušenou konformaci enzymu pro substrát (Guo et al. 2020). Metoda imobilizace enzymu by měla být vhodně zvolená a podmínky imobilizace optimalizované. Po imobilizaci na nosiče, zvláště pomocí kovalentní vazby, mohou mít enzymové molekuly narušenou strukturální konformaci vazebného místa. Sledování enzymové aktivity po imobilizaci je obvykle založené na detekci produktu katalýzy v časovém úseku a zahrnuje stabilitu operační a skladovací. Tedy opakované cykly enzymové katalýzy a v podmínkách při skladování.

Po navázání enzymu na pevný nosič se může měnit rychlost enzymem katalyzované reakce (Matosevic et al. 2010, Papamichael et al. 2019). Ta je mimojiné závislá na koncentraci enzymu, substrátu, teplotě a pH při reakci, na difuzi, přítomnosti iontů a inhibitorů reakce (Sun et al. 2017, Wang et al. 2017). Kinetické vlastnosti imobilizovaného enzymu tedy zahrnují sterickou bariéru nosných materiálů, jejich chemické vlastnosti a mikroprostředí navázaných molekul enzymu (Bilal et al. 2016).

Kinetické parametry Michaelis-Mentenové K_M a V_{max} pro enzym a substrát je možné vypočítat z experimentálního sledování rychlosti V katalyzované reakce se zvyšující se koncentrací substrátu $[S]$. Hodnoty získané linearizací grafického zobrazení reakce enzymu se substrátem (saturační křivka, Obr. 4), odpovídají rychlosti přeměny substrátu. Rychlostní konstanta K_M se pak rovná koncentraci substrátu, při které je rychlost reakce V v polovině maximální hodnoty, tj. $V = \frac{V_{max}}{2}$. Konstanta k_{cat} („turnover number“), je pak vypočítaná z podílu maximální rychlosti V_{max} a koncentrace enzymu. Kinetické konstanty K_M , V a k_{cat} jsou používány pro posouzení změn u enzymu po jeho imobilizaci (shrnutí v Cooney, 2017).



Obrázek 4. Závislost rychlosti enzymové katalýzy V vs. koncentrace substrátu $[S]$ popisuje saturaci enzymu substrátem, a proto se označuje jako saturační křivka (křivka nasycení) (Slováková, 2023). Použito se souhlasem nakladatele (Elsevier, číslo licence 5507780700205).

Magnetické částice

Koncem 20. století se k vazbě enzymů začaly používat nové typy částic - magnetické sférické částice, s řadou praktických výhod v laboratoři. Ve srovnání s těmi nemagnetickými šlo především o snadnou a rychlou separaci imobilizovaného enzymu z reakce, minimální ztrátu nosiče s enzymem a nulové naředění vzorku (I-1, Ju et al. 2012, Wang et al. 2017). Propojení enzymů s magnetickými částicemi ukončí katalyzovanou reakci podle potřeby a umožní jejich nové použití beze změn. Díky opakovanému použití imobilizovaného enzymu je provedení experimentu levnější. V mnoha případech se prokázalo, že imobilizací upravené enzymy jsou odolnější a zachovávají si svoji aktivitu. Mohou tak být použity pro katalýzu reakcí na hydrofobních substrátech anebo v přítomnosti organických rozpouštědel (Karboune et al. 2005).

Struktura magnetických mikro a také nanočástic je tvořena magnetickým jádrem s vrstvou z přírodních polymerů (chitosan, dextran) (Zhou et al. 2014) nebo syntetických látek (silanizace, polymery, dendrimery) organických nebo anorganických (Khodadust et al. 2013, I-3). Magnetické nano/částice, které se dnes využívají pro bioaplikace a také v *in vivo* aplikacích, jsou obvykle v superparamagnetické formě magnetitu (Fe_3O_4) (Bang et al. 2016, Atacan et al. 2017, Zdarta et al. 2018) a maghemitu (gamma- Fe_2O_3) (Kluchova et al. 2009), a různých typů feritů (oxid kovu a Fe_2O_3 – kov = Cu, Co, Ni, Zn) (Sanko et al. 2023). Obal tak brání přímému kontaktu oxidů kovů s enzymem (proteiny), protože na ně může mít denaturační efekt (Tanyolac et al. 2000, I-1).

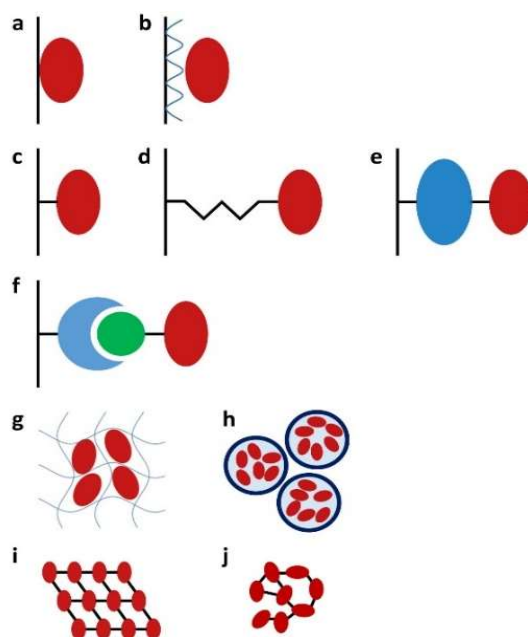
Velikost specifického povrchu částic, snadná chemická reaktivita, stabilita částic v roztoku i nízká nespecifická vazba proteinů, to jsou další významné vlastnosti magnetických částic (Tanyolac et al.

2000, Liu et al. 2017). Pro částice o velikosti nanometrů lze pro vazbu ligandů využít jejich větší specifický povrch (až $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) (Pečová et al. 2011, Algar et al. 2011, Mohy Eldin et al. 2015). Velikost specifického povrchu rozdílně velkých částic byla předmětem studia pro imobilizaci β -galaktosidasy (Shafi et al. 2021). Potvrdil se fakt, že se snižující se velikostí částic a zvětšováním specifického povrchu nosiče došlo k vazbě většího množství enzymu.

Dalším možným zvýšením velikosti specifického povrchu částic je volba porézních materiálů (Garcia-Galen et al. 2011, I-3). Pro imobilizaci proteinů se má velikost pórů nosiče řídit velikostí jejich molekul. U porézních nosičů s imobilizovanými enzymy je zároveň potřeba zvážit omezení difúze substrátu k enzymu, pokud je vázaný uvnitř pórů (Garcia-Galen et al. 2011). V práci (Mukhopadhyay et al. 2015) autoři studovali vliv typu vazby proteolytického enzymu na jeho aktivitu. U kovalentní vazby enzymu k poréznímu nosiči, ke které zřejmě dochází prostřednictvím několika povrchových skupin enzymu, byly zábráněné interakce enzymu s jinými enzymovými molekulami, to snížilo agregaci enzymových molekul a ve výsledku jejich autolýzu. Tímto vícebodovým mechanismem došlo po vazbě a skladování imobilizovaného enzymu k reaktivaci enzymové aktivity. Adsorpce enzymu na hydrofobní nosič byla zprostředkována elektrostatickými interakcemi, a výsledkem byla přístupná aktivní místa enzymu pro substrát a vysoká enzymová aktivita, a také zvýšená teplotní stabilita. Tyto výsledky se liší u imobilizace enzymů na neporézní nosiče, u kterých může vést imobilizace enzymu častěji k inaktivaci enzymu vlivem kontaktu s bublinami plynů, nebo kapkami nemísitelných rozpouštědel (Tacias-Pascacio et al. 2019) anebo kontaktem mezi molekulami enzymů/proteas (Garcia-Galen et al. 2011).

Typy vazeb k nosiči

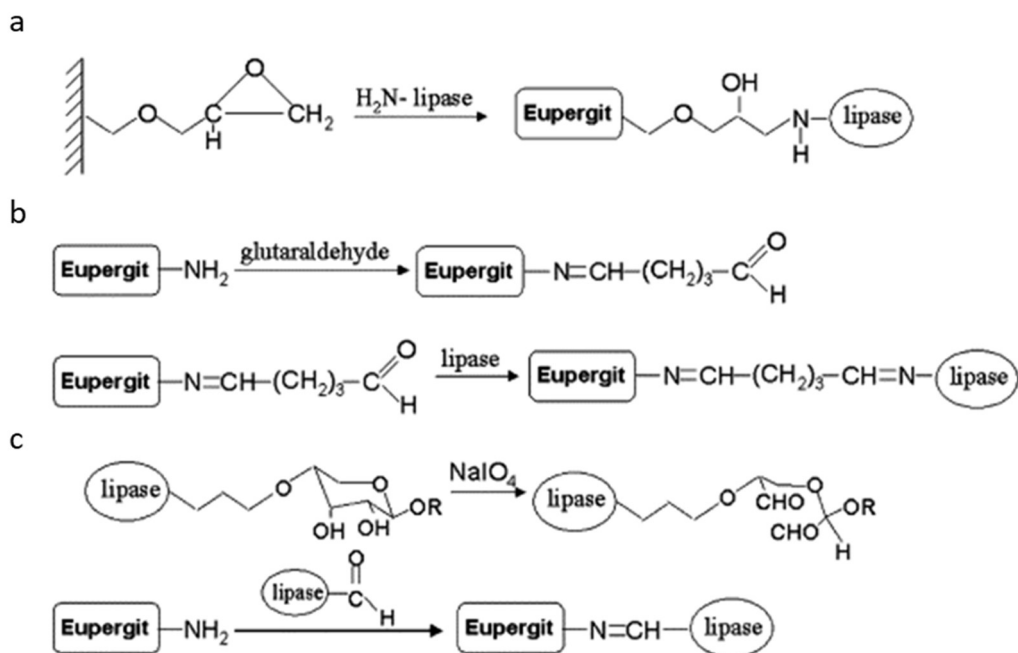
Aktivitu imobilizovaného enzymu významně ovlivňuje typ funkčních skupin nosiče a způsob vazby (Bílková et al. 2006, Sun et al. 2017, I-2). Magnetické mikro – a nanočástice jsou dostupné s různými funkčními skupinami pro snadnou vazbu proteinů a enzymů. Funkcionalizované magnetické částice jsou přednostně biokompatibilní a bez mezičásticových interakcí. Výslednou enzymovou aktivitu ovlivňuje povrchový náboj částic - nabitý nebo neutrální, hydrofilní nebo hydrofobní vlastnosti, a také to, jestli se enzymy vážou kovalentními nebo jinými vazbami (adsorpcí, afinitní vazbou, enkapsulací) (Obr. 5). Hydrofilní povaha nosiče je žádoucí s ohledem na snížení inaktivace enzymu v důsledku denaturace, a dále pro zajištění stability enzymové aktivity (Bott et al. 2007). Mezi potřebné vlastnosti magnetických částic se řadí nízká nespecifická adsorpce látek v aplikacích a minimální uvolňování vázaného enzymu (Kučerová et al. 2014).



Obrázek 5. Způsoby enzymové imobilizace – přímá adsorpce (**a**, **b**), vazba kovalentní (**c**) a pomocí raménka (**d**, **e**), bioafinitní interakce (**f**), zachycení a zapouzdření (**g**, **h**), a intermolekulární zesítění enzymových agregátů (CLEA) (**i**, **j**) (Kecsckemeti et al. 2018). Použito se souhlasem nakladatele (Elsevier, číslo licence 5507780939886).

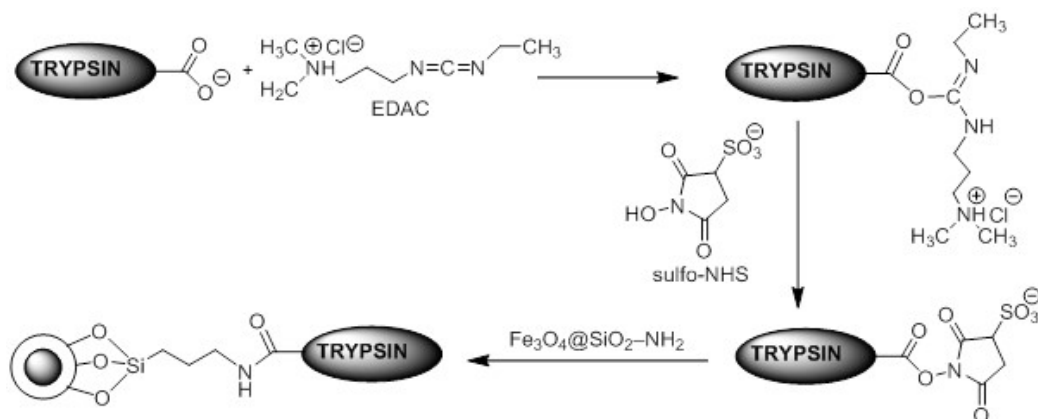
Pro imobilizaci enzymů byly vyvinuty desítky technik. Strategie vazby je ovlivněná finálním uplatněním enzymu. Běžně používané jsou ireverzibilní, nevratné imobilizační techniky – nejčastěji jde o kovalentní vazby, intermolekulární zesítění, zachycení a zapouzdření. Rozšířené jsou některé typy reverzibilních imobilizačních technik, např. afinitní vazba. Méně výhodné z pohledu stability enzymové aktivity, jsou interakce na základě fyzikální sorpce. Jak již bylo uvedeno, způsoby vazby mají významný vliv na enzymovou aktivitu v důsledku strukturálních změn molekul, především sekundární struktury (Ernest et al. 2014, Sun et al. 2017). A pro dlouhodobé zachování aktivity, tj. stability imobilizovaného enzymu je potřebná sterická dostupnost aktivního místa enzymu (Knezevic et al. 2006, Kumar et al. 2021). Odolnost enzymu ke změnám teploty a také pH je možné významně zvýšit volbou způsobu vazby (Prikryl et al. 2012, Mukhopadhyay et al. 2015, Ahmed et al. 2019).

Pro kovalentní (chemické) vazby enzymu nesou nosiče obvykle karboxylové, aminové, oxiranové, hydroxylové, sulfhydrylové aj. funkční skupiny (Obr. 6) (Knezevic et al. 2006, Gao et al. 2010, Xiao et al., 2021, Maciejewska et al. 2023). Kovalentní vazbu mezi karboxylovými a aminovými skupinami může zprostředkovat karbodiimidová aktivace karboxylových skupin (Obr. 7) (Sun et al. 2017). Reakce karboxylových zbytků na nosiči s hydrochloridem 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) N'-ethylkarbodiimidu (EDC) vede ke vzniku meziprojektu, aktivní O-acylisomočoviny, která je snadno vytěsněna nukleofilním útokem z primárních aminoskupin enzymu.



Obrázek 6. Kovalentní vazby enzymu na pevný nosič (a) s oxiranovými funkčními skupinami, (b) pomocí glutaraldehydu (GTA) na aminovém nosiči a (c) po jodistanové oxidaci glykoproteinu (Knezevic et al. 2006). Použito se souhlasem nakladatele (Elsevier, číslo licence 5507781148079).

Častou kovalentní vazbou je prostřednictvím glutaraldehydu (GTA). Ten v mírných podmínkách pH umožňuje spojení se specifickými aminovými skupinami v molekule proteinu (Ahmed et al. 2019). GTA se uplatní ve vazbě dvěma způsoby – kovalentně mezi nosičem a enzymem a zesíťováním biomolekul (intermolekulárně a intramolekulárně) (Sun et al. 2017). Aktivace nosičů pomocí GTA výrazně redukuje uvolňování molekul enzymu z nosiče. Enzymy imobilizované prostřednictvím GTA vykazují vysokou operační a skladovací stabilitu (Aslan et al. 2020). Běžným způsobem je imobilizace enzymů přímou



Obrázek 7. Schéma imobilizace enzymu s aktivací karboxylových skupin karbodiimidem EDC, sulfonovaného N-hydroxy-sukcinimidu (sulfo-NHS) na magnetické nanočástice s aminovou skupinou (I-3). Použito se souhlasem nakladatele (Elsevier).

vazbou na polymerní nosiče s oxiranovými skupinami (Knezevic et al. 2006). Oxiranové skupiny jsou dlouhodobě stabilní v rozmezí pH 1-12 a reagují při neutrálním a alkalickém pH s aminoskupinami enzymu. Vysoká hustota oxiranových skupin na povrchu porézních částic z kopolymeru etylenglykol dimetakrylátu a glycidylmetakrylátu, poly (GMA-co-EGDMA), může provázat enzymové molekuly na více strukturních místech (multi-point-attachment) a to za určitých podmínek vede k vysoké enzymové stabilitě (Milosavic et al. 2017).

Alternativně mohou být enzymy vázané na nosiče a různé povrchy nekovalentními vazbami, prostřednictvím hydrofobních, polárních anebo iontových interakcí. Příklady této fyzikální sorpce uvádí nekovalentní vazby enzymů do průtokových kapilár, na peptidové mikročipy, do biosenzorů, na nitrocelulosoové membrány pro diagnostické účely a na polymery u skleněných preparátů (přehled v Tomizaki et al. 2005).

Orientovaná vazba

Náhodná kovalentní vazba enzymů k nosiči může při vícebodové vazbě zablokovat aktivní místo enzymu, a také může být enzym denaturován. Proto je někdy obtížné dosáhnout stabilní vazby s vysokou enzymovou aktivitou (Knezevic et al. 2006). Naproti tomu místně orientovaná kovalentní vazba enzymů k nosiči ze svého principu neovlivňuje míru reaktivity enzymu se substrátem (Bílková et al. 2002, Matosevic et al. 2010, Krenkova et al. 2013), a v případě specifických protilátek neovlivní vazbu k antigenním epitopům (Brne et al. 2009). Kovalentní vazba ligandu orientovaným způsobem (tj. místně specifická) může zajistit pevně navázaný a přitom biologicky aktivní protein (aktivní enzym, protilátka ve správné prostorové orientaci), anebo přípravu enzymem či jinak značené molekuly IgG (Murayama et al. 1978).

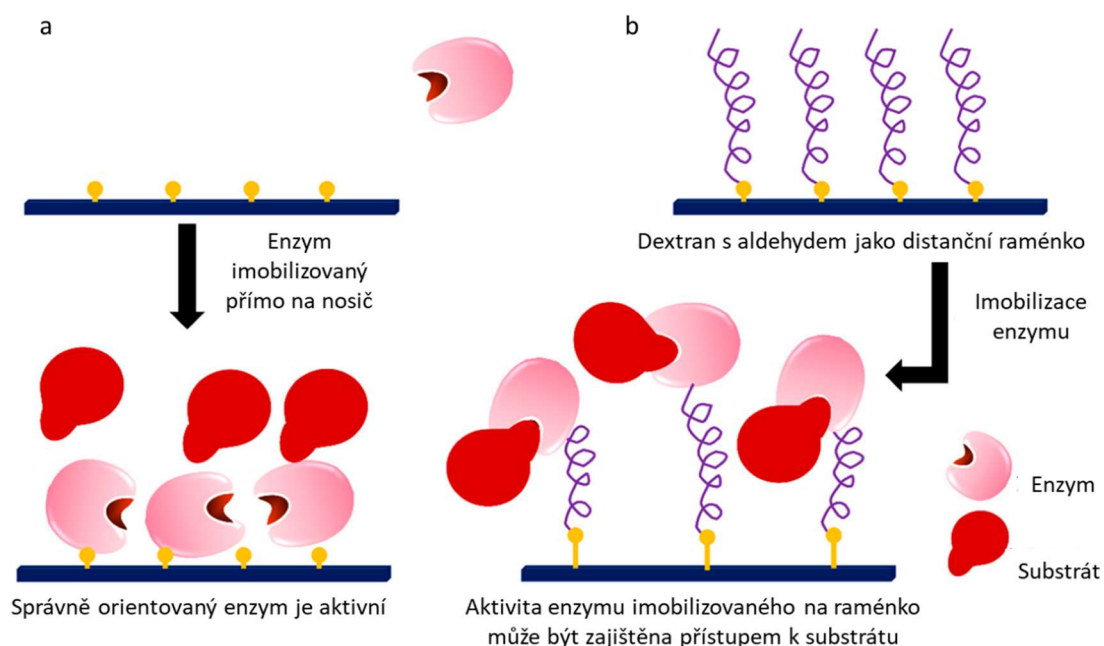
Jako slibná a také účinná strategie je vazba glykoenzymů prostřednictvím jejich cukerných zbytků na nosiče, a to proto, že sacharidy v molekule obvykle nejsou nutné pro jejich biologickou funkci (Knezevic et al. 2006, Henderson et al. 2011). Autoři práce (Milosavic et al. 2005) generovali aldehydové skupiny na sacharidu v glykoproteinu jodistanovou oxidací, zajistili tak orientovanou vazbu glykoenzymu na hydrazidové skupiny nosiče stabilní hydrazonovou vazbou. Tímto způsobem dosáhli vyšší specifické aktivity u amyloglukosidasy imobilizované na poly(GMA-co-EGDMA) nosič ve srovnání s metodou využívající GTA (Milosavic et al. 2005). Další práce uvádí tuto orientovanou imobilizaci lipasy na nosič Eupergit^R C s aminy (vyrobeno kopolymerací N,N*-methylen-bis-(methakrylamidu), glycidylmethakrylátu, allylglycidyletheru a methakrylamidu). Při srovnání s neorientovanými způsoby vazby na nosiče s oxirány a glutaraldehydy vedla k nejvyšší katalytické aktivitě lipasy. Studium teplotní

stability u orientovaně imobilizovaného enzymu také vedlo ke změně teplotního profilu pro deaktivaci enzymu a ke značné stabilizaci biokatalyzátoru (Knezevic et al. 2006).

Vývoj i aplikace metod orientované imobilizace proteinů prošly významným rozvojem. Příkladem je práce z nedávné doby, ve které byly rekombinantní enzymy termofilní acylaminopeptidasa (EC 3.4.19.1), termofilní dehalogenasa (EC 3.8.1.2) a lipasa A (EC 3.1.1.3) vázané na nosič s aminem prostřednictvím aldehydových značek vložených do molekul enzymů genetickým inženýrstvím (Wang et al. 2020). V jiné práci (Wang et al. 2019a) je popsána orientovaná imobilizace rekombinantního proteinu prostřednictvím jeho afinitní značky po oxidaci N-koncového serinu na nosič s hydrazidy a vznikem stabilní hydrazonové vazby (Wang et al. 2019b). V jiných pracích je k vazbám protilátek používána orientovaná afinitní vazba na nosiče, přes jejich komplementární ligandy (Weiping et al. 1999, Esmaeili et al. 2016).

Distanční raménko

Pro zajištění sterické přístupnosti kovalentně vázaného enzymu k substrátu se využívá distanční raménko (tzv. spacer) (Obr. 8). Jde obvykle o malou molekulu nebo lineární řetězec navázaný na částicích (Wu et al. 2018, Tacias-Pascacio et al. 2019). Příkladem provedení je jednokroková orientovaná vazba enzymu na raménko tzv. „click“ vazbou. Tento způsob je obvykle volen při vazbě peptidů a dalších ligandů na „microarray“ destičku (tzv. peptidové mikročipy), na které jsou ligandy



Obrázek 8. Princip imobilizace enzymů na nosiče (a) přímo, (b) prostřednictvím ramének (tzv. spacerů) (převzato a upraveno z Tacias-Pascacio et al. 2019).

vázané ve velmi vysoké hustotě. V jedné práci byla destička potažená biokompatibilním hydrofilním polyethylenglykolem (PEG) s koncovými azidovými skupinami a vazba proběhla na základě azid-alkynové cykloadice (Zhao et al. 2012). Jiným příkladem „click“ vazby byla vazba ligandu na thiolové skupiny mesoporézních nanočástic z oxidu křemičitého (Yan et al. 2017).

Afinitní vazby

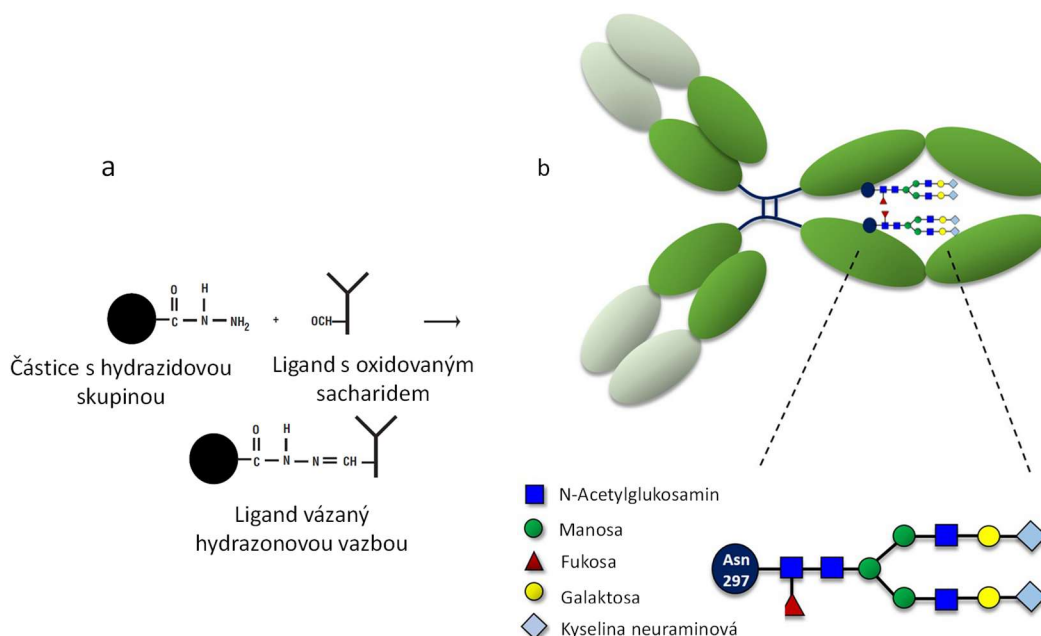
Jedinečným typem orientované vazby enzymů a dalších proteinů na nosiče se zachováním aktivního místa jsou afinitní interakce. Principů bylo vyvinuto více a zde v příkladech jsou uvedeny některé z nich. Tradiční metody jsou založené na vzniku afinitního komplexu oligohistidinu v proteinu s Ni^{2+} a kyselinou nitrilotrioctovou (NTA) (Wegner et al. 2016, Wu et al. 2018) nebo kyselinou iminodiotovou (IDA) (Vaish et al. 2013), dále vazby využívající interakci biotin – avidin (streptavidin) (Lesaicherre et al. 2002, Holland-Nell et al. 2007, Beaussart et al. 2021) a IgG protilátky – s proteinem A (Miyao et al. 2015), a také vazba enzymu na nosiči potaženým specifickými protilátkami (Turková et al. 1999).

Polyhistidinový motiv je rutinně zaváděn do struktury rekombinantních proteinů pro usnadnění jejich purifikace, a přitom jeho malá velikost nenarušuje biologickou funkci. Imobilizace prostřednictvím motivu polyhistidinu anebo glutathion-S-transferasy zamezí jiným vazebným interakcím a umožňuje kontrolu nad orientací biomolekuly a mimo jejich aktivní místo (Choi et al. 2014). Tento a další uvedené afinitní způsoby jsou často využívány v přípravě proteinových (peptidových) mikročipů (Cha et al. 2005, Li et al. 2009), např. při studiu enzymových substrátů (v přehledu Humphrey et al. 2023), při vazbě enzymů do enzymového mikroreaktoru (Matosevic et al. 2010). Nově jsou k orientované imobilizaci využívány i jiné peptidové značky (Geiger et al. 2023). Další z orientovaných způsobů vazeb jsou supramolekulární vazebné interakce enzymů, které využívají afinitní interakce biotin – streptavidin, které vytváří homogenní enzymové vrstvy (González-Campo et al. 2012).

Níže komentované práce (**I-1** až **I-3**) popisují vývoj aktivních a stabilních enzymových nosičů na magnetických částicích. Využité byly ke dvěma účelům, prvním byla strukturní modifikace proteinů a glykoproteinů pro možné konjugace s nosiči. Druhým bylo proteolytické štěpení proteinů ve spojení nově vyvinutými s porézními „core/shell“ nanočásticemi. Řízenou proteolýzu s imobilizovanými enzymy jsme z biochemického pohledu studovali také v mikrofluidním uspořádání, a to je náplní v dalším tématickém bloku (**Blok II**). Zde prezentuji především základní parametry vývoje imobilizovaných enzymů – vlastnosti magnetických mikročástic a nanočástic pro imobilizaci, imobilizační strategie enzymů s cílem zachování vysoké enzymové aktivity a výsledky jejich aplikací.

Cílem práce (I-1) bylo vyvinout imobilizované enzymy pro místně specifickou modifikaci struktury protilátky. Studium a modifikace proteinů a glykoproteinů enzymy imobilizovanými na nosičích se datuje do 90. let minulého století (Turková et al. 1988, Voivodov et al. 1991, Baran et al. 2003). Terminálními sacharidy na konzervované struktuře glykosidických řetězců protilátek je kyselina N-acetylneuraminová a galaktosa. Běžně používaným způsobem je oxidace terminální galaktosy v sacharidech glykoproteinů chemicky, jodistanem sodným, kdy vznikající aldehydové skupiny reagovaly s dihydrazidem kyseliny adipové ($-NHNH_2$) na nosiči (Obr. 9) (Murayama et al. 1978, Derwinska et al. 2008, Henderson et al. 2011). Pro to, abychom oxidací neovlivnili biologickou aktivitu protilátky, vyvinuli jsme imobilizovaný enzymový systém s galaktosaoxidasou a neuraminidasou. Volné sacharidové řetězce, určené k modifikaci a případné orientované vazbě k nosiči, se v molekule protilátky nacházejí na jejich Fc části, tedy mimo vazebné místo (paratop), a jejich terminální jednotky tvoří kyselina neuraminová a galaktosa (Obr. 9).

V glykoproteinech savčího původu je vhodné odštěpit terminální kyselinu N-acetylneuraminovou (sialilovou) neuraminidázou, tím jsou molekuly terminálního monosacharidu lépe přístupné enzymové oxidaci. Použitá neuraminidasa z *Clostridium perfringens* (EC 3.2.1.18) je exoglykosidasa, která v oligosacharidech hydrolyzuje O-glykosidové vazby mezi terminální kyselinou sialovou a subterminální galaktosou (Wang et al. 2018). V druhém kroku jsme pro oxidaci hydroxylových zbytků na odhalené

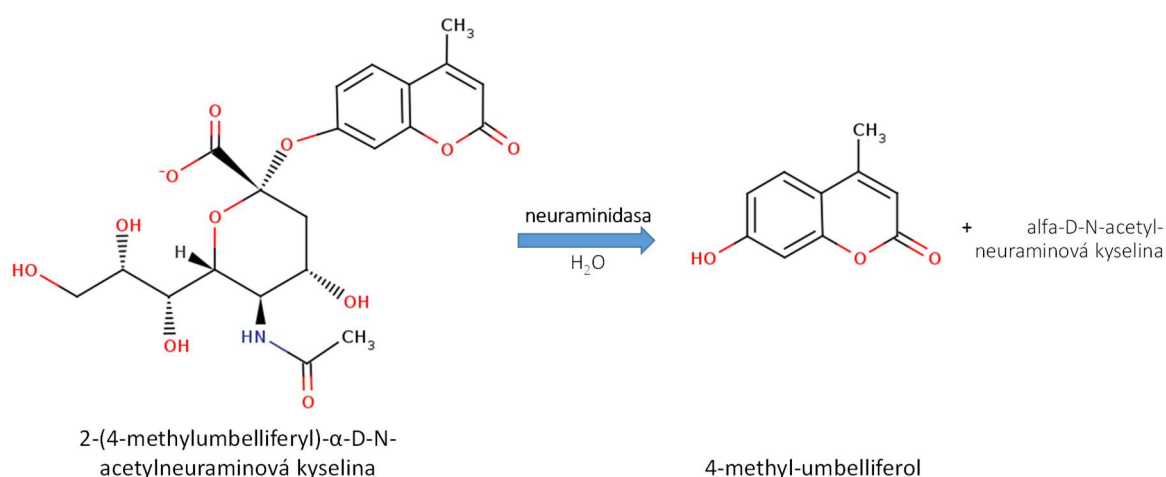


Obrázek 9. (a) Schéma orientované vazby protilátky prostřednictvím oxidované $-OH$ skupiny terminálního monosacharidu na nosič s dihydrazidem kyseliny adipové (Bangs Laboratories, Inc. Technote 205, upraveno). (b) Sacharidový řetězec je v molekule protilátky mimo její vazebné místo (Barrientos et al. 2020, upraveno).

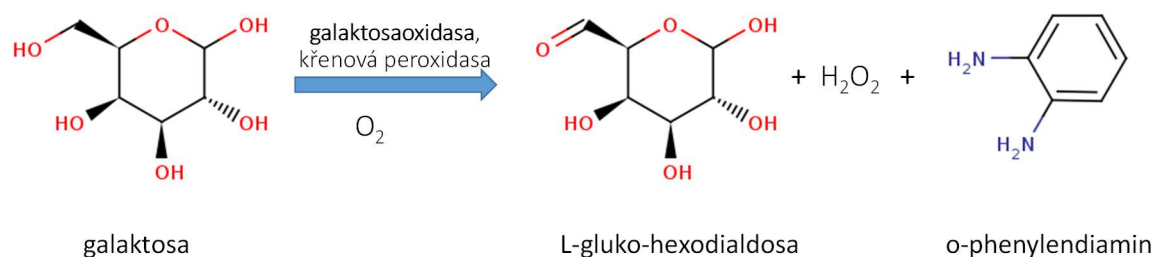
galaktose vybrali galaktosaoxidazu z houby *Dactylium dendroides* (EC 1.1.3.9). Tento metaloenzym oxiduje široké spektrum primárních alkoholů (C-6 hydroxylů) včetně galaktosy a N-acetylgalaktosaminu (Cevik et al. 2010, Ikemoto et al. 2014). A také se využívá k oxidaci sacharidových součástí glykoproteinů, např. v přípravě biokonjugátů (Henderson et al. 2011).

Struktura enzymu a jeho posttranslační modifikace často ovlivňují způsob vazby, a je možné je k vazbě použít. Oba enzymy jsou glykoproteiny a pro vazbu na superparamagnetické částice jsme zvolili kovalentní orientovaný typ přes terminální sacharidy enzymů na částice s hydrazidovými skupinami (-NHNH₂). Oba enzymy byly imobilizovány také neorientovanou vazbou na částice s aldehydovými skupinami přes aminové skupiny. K vazbě byly využity magnetická a nemagnetická makroporézní perlová celulóza (80-100 μm) a magnetické neporézní mikročástice poly(HEMA-co-EDMA) (3,7 μm) (Lenfeld et al. 1993). Pro sledování aktivity a stability imobilizovaných enzymů byly při nezbytných optimalizacích (koncentrace jodistanu a pH, a přítomnost iontů) využity specifické nízkomolekulární substráty (Obr. 10 a Obr. 11).

Nejvyšší aktivitu i stabilitu dosáhla galaktosaoxidasa imobilizovaná orientovanou vazbou na magnetické makroporézní částice perlové celulózy. Neuraminidasa imobilizovaná na stejný magnetický nosič měla mírně snížené aktivity (o 14 %), ve srovnání s nemagnetickou formou nosiče, ale její stabilita se po 3 týdnech skladování rapidně snížila na 2 % z původní hodnoty. Aktivita neuraminidasy



Obrázek 10. Metoda stanovení enzymové aktivity neuraminidasy (bakteriální glykoprotein, Mr 42813 Da, 382 AA) - hydrolýza syntetického substrátu (2-(4-methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminová kyselina). Detekce produktu 4-methylumbelliferolu fluorimetry (databáze Brenda-enzymes.org).



Obrázek 11. Metoda stanovení enzymové aktivity galaktosaoxidasy (extracelulární glykoprotein, Mr 73000 Da, 681 AA) s galaktosou. Vznikající peroxid vodíku dává v systému peroxidasa – chromogen O-fenylenediamin (OPD) vzniku barevného produktu, detekce spektrofotometrická (Avigad et al. 1962) (databáze Brenda-enzymes.org).

imobilizované na nemagnetické perlové celulóse se úplně zachovala. Poměrně úspěšná byla společná ko-imobilizace obou enzymů, orientovaným typem vazby na makroporézní perlovou celulosu (-NHNH₂) – se 100 % pro neuraminidasu a 40 % pro galaktosaoxidasu aktivity při srovnání s ostatními vazbami. Tyto výsledky aktivních enzymů na magnetických mikročásticích nabízely aplikace se strukturními modifikacemi glykoproteinů, nejen ve vsádkových, ale snadno také v průtočných systémech.

Závěrem můžeme hodnotit, že enzymy vázané na nosiče kovalentní vazbou s místně specifickou orientací mohou zvýšit kvalitu produktu, bez kontaminace enzymy, zjednodušit katalýzu a snížit její náklady. Kombinace magnetických částic s polysacharidovými materiály s metodami orientované imobilizace enzymů je možné použít k přípravě účinných enzymových katalyzátorů v biotechnologických i analytických aplikacích.

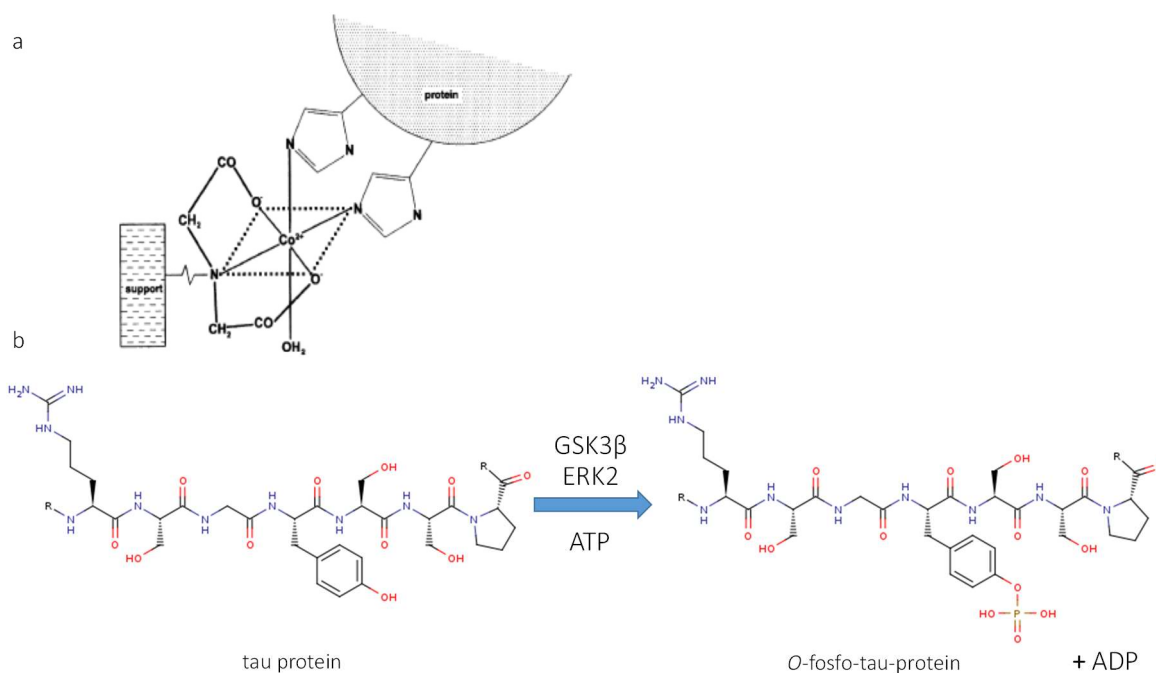
Práce (I-2) je zaměřená na sekvenční fosforylaci rekombinantních proteinů *in vitro*, pomocí proteinkinas imobilizovaných na superparamagnetických částicích. Připravené imobilizované proteinkinasy byly využity k fosforylaci molekul rekombinantních proteinů s požadovanou strukturou a funkcí. Fosforylace, *N*- a *O*-glykosylace a methylace proteinů jsou klíčové PTM v procesech regulace biologických funkcí a důležitým molekulárním základem v dynamické odpovědi a interakci proteinů (Pscheidt et al. 2005, Shi et al. 2022). Proteinová fosforylace je mezi nimi jednou z nejhojnějších PTM (Bigeard et al. 2014). Přítomnost fosforylace u řady proteinů a také proteinkinas, vede přímo ke snížení anebo zvýšení jejich biologické aktivity (Roskoski et al. 2005, Sun et al. 2002, Roskoski et al. 2015). Například role hyperfosforylovaného tau proteinu v patogenezi Alzheimerovy choroby je dobře známá a mnoho autorů se podrobně zabývá studiem fosforylovaných pozic v molekule tau (Karikari et al. 2022). Jiným důvodem studia fosforylace molekul je míra a kvalita PTM, která souvisí s jejich

terapeutickým účinkem ve farmaceutických aplikacích. Například pro účinky biotechnologicky připraveného inzulínu není oblast PTM důležitá (Kjeldsen et al. 2000), ale u jiných proteinů s komplexní glykosylací - u monoklonálních protilátek je zásadní (Walsh et al. 2006, Cymer et al. 2018). Metodické možnosti pro zavedení PTM do struktury peptidů a rekombinantních proteinů zahrnují mimo enzymového přístupu různé varianty chemické syntézy (např. Fmoc s SPPS) a semisyntézy (Højly-Larsen et al. 2013, Henager et al. 2020, Strauss et al. 2022).

Do současné doby bylo na různé typy nosičů imobilizováno několik proteinkinasy, např. GSK3 β (Li et al. 2015), interleukin-2-inducible T cell kinase (ITK), a epidermální growth factor receptor kinasa (EGFR), a jejich přehled je shrnut v (Slováková et al. 2021). Způsoby vazby proteinkinasy na nosiče zahrnují kovalentní a orientované (Zhou et al. 2014, Wang et al. 2018) a také afinitní založené na systému avidin-biotin (Taka'aki et al. 2010, Popplewell et al. 2013, Li et al. 2015, **I-2**).

Pro monitorování účinnosti a kvality fosforylace/defosforylace proteinů a peptidů (*in vitro*) jsou potřebné velmi citlivé biochemické a analytické metody (Lopez et al. 2010, Zhu et al. 2021). K detekci proteinové fosforylace se využívá více metod, které kombinují obohacování fosfopeptidů (Lopez et al. 2011), hmotnostní spektrometrii (Wu et al. 2008, López et al. 2011, Salinas et al. 2012) a Western blot s fosfospecifickými protilátkami proti fosforylovaným formám serinu, threoninu a tyrosinu (Reddy et al. 2013). Dalšími metodami jsou elektroforetická separace proteinů s inkorporovaným izotopem fosforu ^{32}P (Haycock et al. 1992), fosfo-specifické barvení proteinů založené na reakci s chelatujícími kovy (např. komerční produkty Stains-All TM, Pro-Q Diamond TM, Phos-tag TM a pIMAGO TM) (Kim et al. 2010).

V práci (**I-2**) jsme zvolili kovalentní a afinitní strategie vazeb rekombinantních proteinkinasy na superparamagnetické částice. Proteinkinasy lidská ERK2 (EC 2.7.11.24) a králíčí GSK3 β (EC 2.7.11.26), specifické k Ser (S, serin) a Thr (T, threonin), byly vytipované jako klíčové ve studiu struktury a funkce tau proteinu, klinicky významného proteinu spojovaného s neurodegenerativními procesy. ERK2 je cytoplazmatická proteinkinasa exprimovaná zejména v centrálním nervovém systému, kde fosforyluje klinicky relevantní biomarkery (Qi et al. 2016). Podobně se s různými formami fosforylace tau proteinu spojuje proteinkinasa GSK3 β (Nemoto et al. 2010). Aktivní rekombinantní GSK3 β a ERK2 byly vázané kovalentními vazbami na karboxylové a aldehydové mikročástice. Druhým typem vazby byla silná afinitní vazba zprostředkovaná histidinovou kotvou na IDA-Ni $^{2+}$ a Co $^{3+}$ mikročástice (Obr. 12).



Obrázek 12. (a) Afinitní vazba proteinkinas ERK2, GSK3b na Co^{3+} (Ni^{2+}) – chelatovaný magnetický nosič (Zatloukalová et al. 2004). Použito se souhlasem nakladatele (Elsevier, číslo licence 5507790374595). **(b)** Model proteinové fosforylace imobilizovanými proteinkinasy (databáze Brenda-enzymes.org). Lidská rekombinantní proteinkinasa ERK2/MAPK1 exprimovaná v *Escherichia coli* (Mr 41390 Da, 360 AA, Uniprot P28482). Králičí rekombinantní GSK3 (Mr 44771, 401 AA, Uniprot G1U0J7).

Způsoby vazeb proteinkinas na různé superparamagnetické mikročástice byly porovnány nepřímo, pomocí fosforylování peptidových substrátů v čase. Fosforylace na peptidech byla detekována metodou hmotnostní spektrometrie s matricí asistovanou laserovou desorpcí/ionizací (MALDI-ORBITRAP MS). U afinitní vazby His-značenými ERK2 a GSK3β na nikelnaté a kobaltnaté mikročástice byl detekován jen slabý náznak fosforylovaných peptidů (TH 24-33 a CREB) v čase, a to i při prodloužení času na 16 hodin. Naopak proteinkinasy vázané kovalentně na karboxylových mikročásticích dosahovaly vysokých hodnot aktivity a operační stability u GSK3β (95,5 % původní aktivity po vazbě po 10 opakování), ale s rychlým snižováním hodnot aktivity a operační stability u ERK2 (36,2 % původní aktivity po 10 opakování).

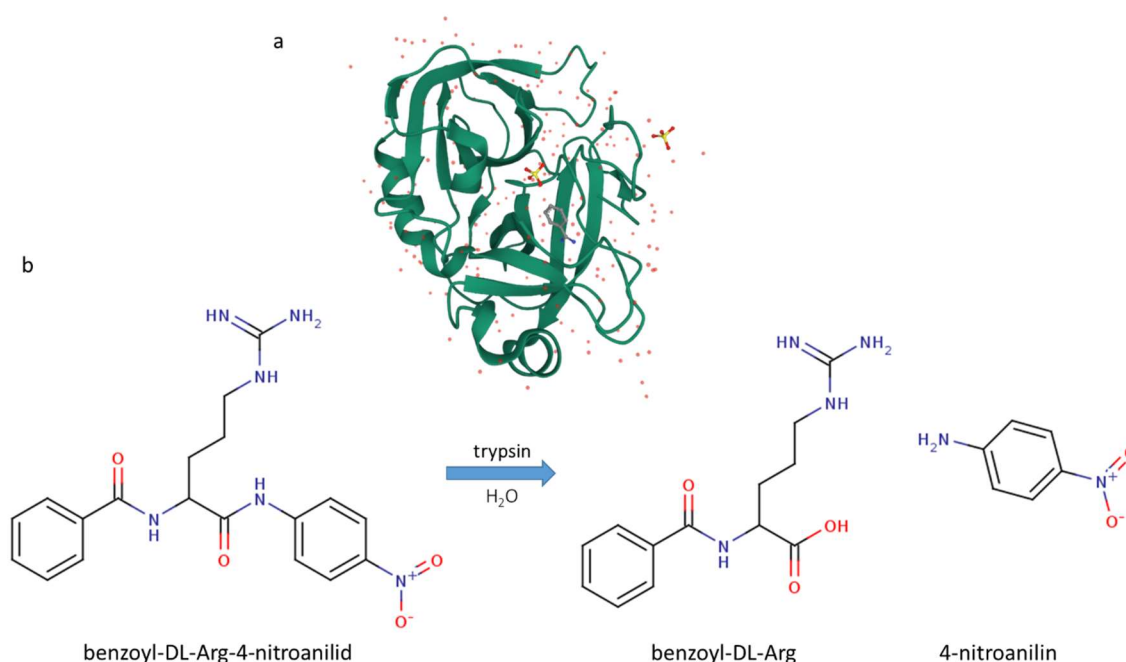
Proteinkinasy imobilizované kovalentně byly použity k sekvenční fosforylaci rekombinantního tau proteinu *in vitro*. Detekce fosforylace tau proteinu zahrnovala jeho proteolýzu se sekvenační kvalitou, obohacení fosfopeptidů na TiO_2 částicích, analýzu MALDI-ORBITRAP MS a tandemovou MS/MS. Fosforylace u tau proteinu byly také potvrzeny metodou Western blotu s fosfospecifickými protilátkami proti tau proteinu (anti-Ser396, anti-Ser356, a anti-Thr239). Kombinace těchto výsledků potvrdila sekvenčně fosforylovaný produkt bez kontaminace volnými kinasami.

Tato práce poprvé prezentovala aplikaci dvou aktivních kináz imobilizovaných na magnetických částicích k sekvenční fosforylaci proteinu. Ve srovnání s volnými enzymy bylo provedení fosforylace proteinu snazší, částice s enzymy byly použitelné opakovaně a proces byl také ekonomičtější. Důležité bylo také to, že s magnetickými částicemi s enzymy bylo možné jednoduše ukončit jednu katalyzovanou reakci a zahájit další, s jinou proteinkinasou.

V práci **(I-3)** byla cílem kovalentní imobilizace hovězího trypsinu (EC 3.4.21.4) na nově vyvinuté superparamagnetické nanočástice s různou porozitou. U všech nanočástic s trypsinem jsme sledovali enzymovou aktivitu a hodnoty kinetických konstant. Trypsin jako serinová endopeptidasa má specifitu na karboxylové terminální straně proteinů za lysinem (K, Lys) a argininem (R, Arg), pokud za nimi nenásleduje Pro (P, Pro). Je častým nástrojem enzymového štěpení v proteomické analýze, v technice peptidového mapování, a také se využívá v oblasti cíleného studia heterogenních glykoproteinů (Burkhart et al. 2012).

Metoda peptidového mapování spočívá v proteolýze proteinů, rozdělením peptidových fragmentů chromatografickými technikami a detekcí peptidů metodami hmotnostní spektrometrie s „time-of-flight“ (TOF) detektorem (MALDI-TOF, ESI-TOF) (Brandtzaeg et al. 2017, Korecká et al. 2004). Hmotnosti peptidů jsou porovnány s databázemi, které obsahují známé proteinové sekvence. V případech analýzy makromolekul a při studiu posttranslačních modifikací proteinu je výhodné vybrat a studovat pouze jednoznačně charakteristické peptidy, tzv. signature peptidy (Riggs et al. 2001, Brandtzaeg et al. 2017). Jejich identifikací je umožněna kvalitativní analýza vysokomolekulárních (glyko)proteinů, např. pro průkaz změn v jejich struktuře. Enzymové štěpení vzorku proteinu a jeho provedení ovlivňuje úspěšnost výsledku v proteomické analýze. Použití imobilizovaného trypsinu na pevný nosič se považuje za účinný postup proti jeho autoproteolýze (Pinto et al. 2015). Podstatné je také zkrácení doby potřebné ke stejné míře štěpení volným trypsinem (Fan et al. 2014). Kromě nejčastěji využívaného trypsinu jsou používány také chymotrypsin, Lys-C, thermolysin, v kombinaci s trypsinem a jinými proteasami (Rombouts et al. 2013, Shangguan et al. 2015, Martinez-Esteso et al. 2016, Kartikeyan et al. 2022).

Porézní magnetické nanočástice ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$) s velikostí 100-200 nm byly pro vazbu trypsinu v práci **(I-3)** připravené ve skupině prof. Sedláka na Fakultě chemicko-technologické. Zavedení aminových funkčních skupin modifikací (3-aminopropyl)triethoxysilanem (APTES) vyvážilo aniontové náboje na SiO_2 obalu magnetického jádra nanočástic. Výsledný povrch nanočástic tak zabránil možným nespecifickým vazbám molekul enzymu a jiných látek (Hodgson et al. 2004). Trypsin byl na nanočástice



Obrázek 13. (a) Molekulární struktura trypsinu (Mr 26000 Da, 246 AA, glykoprotein, pankreas) v komplexu s benzamidinem (šedě), tj. kompetitivním inhibitorem v aktivním místě (obrázek z Protein Data Bank: 1oss). **(b)** Schéma hydrolysy nízkomolekulárního syntetického substrátu BAPNA katalyzované trypsinem (databáze Brenda-enzymes.org).

navázán kovalentní vazbou metodou karbodiimidové chemie s EDC a sulfo-NHS, a pro zabránění autoproteolýzy byl chráněn přidavkem kompetitivního inhibitoru benzamidinu (Obr. 13).

Míru aktivity a stabilitu trypsinu imobilizovaného na nanočásticích s odlišnou porozitou jsme sledovali pomocí peptidového substrátu BAPNA (N-benzoyl-dl-arginine-*p*-nitroanilid). Částice s trypsinem s největší porozitou dosahovaly největší aktivity enzymu a s nižší porozitou se také snížila míra detekované enzymové aktivity. Stabilita imobilizovaného trypsinu po dvou týdnech skladování byla zcela beze změn ve srovnání s aktivitou po imobilizaci. Také operační stabilita po 4 cyklech se substrátem byla zachovaná, s poklesem o 15 % z původní aktivity.

Hodnota Michaelisovy konstanty K_M imobilizovaného trypsinu (0,399 - 0,658 mM) ve srovnání s volným trypsinem (1,244 mM) ukazovala na zvýšení afinity enzymu k substrátu. Podobné výsledky s imobilizovanými proteasami jsme pozorovali v další práci (Korecká et al. 2005) a u jiných autorů (Mukhopadhyay et al. 2015, Liu et al. 2017). Snížení hodnoty K_M u imobilizovaných enzymů lze vysvětlit zakoncentrováním substrátu v blízkosti specifického povrchu nanočástic. Někteří autoři však uvádějí hodnoty K_M beze změn (Sangeetha et al. 2008, Gonzales-Campo et al. 2012, Liu et al. 2017) anebo hodnoty K_M vyšší (Baidamshina et al. 2020, Sun et al. 2017). Další autoři zaznamenali pro papain imobilizovaný na chitosanové nanočástice v případě nezměněných K_M hodnot významný pokles hodnot

dalších kinetických konstant $V_{\max}$ a k_{cat} . To zřejmě souviselo s omezením flexibility enzymových molekul a přístupnosti k substrátu v důsledku imobilizace (Baidamshina et al. 2021).

Míru proteolytické aktivity trypsinu imobilizovaného na nanočásticích jsme ověřili technikou peptidového mapování při hydrolýze hovězího α -kaseinu (1 mg/ml, molární poměr proteasa/substrát 1:20, při laboratorní teplotě). Analýza peptidových frakcí byla provedena detekcí s MALDI-Orbitrap MS. Peptidové fragmenty získané po 3 hodinách trypsinového štěpení byly identifikovány s vysokou hmotnostní přesností. Při srovnání proteolýzy u α -kaseinu imobilizovaným a volným trypsinem (se sekvenční kvalitou) nedošlo ke vzniku nespecifických štěpů.

Z výsledků této práce vyplynulo, že proteinová hydrolýza imobilizovanými proteasami s magnetickými nanočásticemi může zkrátit potřebný čas z hodin na minuty. Získané peptidové směsi nejsou kontaminovány autolytickými fragmenty trypsinu. Podobně tyto výhody popisují další autoři (Burkhart et al. 2012, Atacan et al. 2017, Zdarta et al. 2018).

Blok II – Magnetické enzymové a bioafinitní nosiče v mikrofluidním uspořádání

II-1 Slováková, M., Minc, N., Bilkova, Z., Smadja, C., Faigle, W., Fütterer, C., Taverna, M., & Viovy, J.-L. (2005). Use of self assembled magnetic beads for on-chip protein digestion. *Lab on a Chip*, 5(9), 935. <https://doi.org/10.1039/b504861c>

Autorský podíl: 40%

Připravila jsem imobilizovaný trypsin, rovným dílem jsem se podílela na experimentech v mikročipu a vsádkově a na psaní článku.

II-2 B. Jankovicova, B., Rosnerova, S., Slováková, M., Zverinova, Z., Hubalek, M., Hernychova, L., Rehulka, P., Viovy, J.-L., & Bilkova, Z. (2008). Epitope mapping of allergen ovalbumin using biofunctionalized magnetic beads packed in microfluidic channels. *Journal of Chromatography A*, 1206(1), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.062>

Autorský podíl: 30%

Podílela jsem se na vývoji metodiky s IMER s enzymy a IMAR v mikročipu a MS analýze peptidů, korekci článku

II-3 le Nel, A., Minc, N., Smadja, C., Slováková, M., Bilkova, Z., Peyrin, J.-M., Viovy, J.-L., & Taverna, M. (2008). Controlled proteolysis of normal and pathological prion protein in a microfluidic chip. *Lab on a Chip*, 8(2), 294. <https://doi.org/10.1039/b715238h>

Autorský podíl: 30%

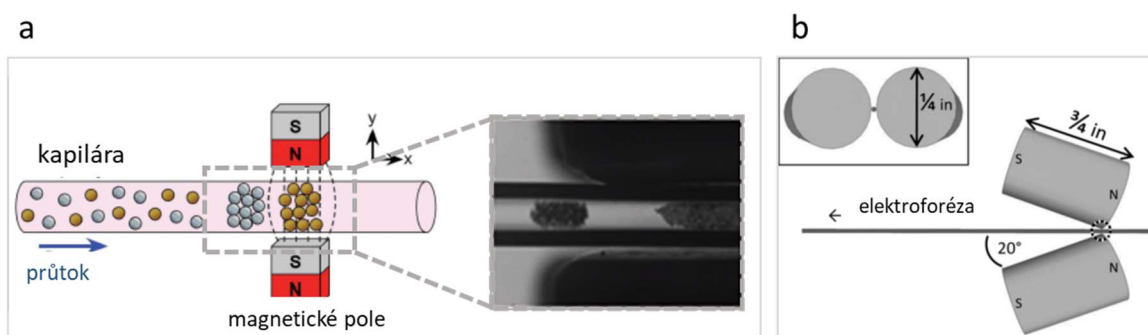
Optimalizovala jsem metodu vazby proteinasy K, podílela se na proteolýze a analýze PrP, na psaní článku.

Výzkum enzymů imobilizovaných na magnetických částicích a jejich aplikace se rozšířily díky jejich výhodám, tj. opakované použitelnosti, prodloužené životnosti a snadné manipulaci s nimi i separování od produktu. Možnost využití superparamagnetických sférických částic s enzymy v mikrofluidním zařízení a miniaturizace katalýzy s přesným dávkováním a kontrolou průtoku kapalin, předvedla dál ohromné účinnosti ve srovnání s tradičními a velkoobjemovými analytickými systémy. K účinnosti katalýzy mikroreaktorů přispěla velikost specifického povrchu mikročástic, a z toho důvodu bylo pro tato zařízení vyvíjeno mnoho typů porézních nosičů.

Mikrofluidní systémy

Práce zařazené do **Bloku II (I-1, I-2 a I-3)** byly mezi prvními ve výzkumu v oblasti mikrofluidních systémů s fixovanými magnetickými enzymovými reaktory, tzv. IMER, a magnetickými afinitními reaktory, tzv. IMAR. Od začátků se mikrofluidika s IMER a IMAR časem posunula k systémům označovaným jako mikrofluidní systémy „lab-on-a-chip“ a „microTotal Analysis System“ (μ TAS). Do dnešní doby se objevilo mnoho uspořádání mikročipů a materiálů, ze kterých jsou mikrofluidní čipy vyrobeny (Li et al. 2007, Tarn et al. 2013, Kecskemeti et al. 2017, Ou et al. 2019). Účely mikrofluidních systémů s enzymovou katalýzou jsou různé a jak shrnují (Kecskemeti et al. 2018) a (Nagy et al. 2022), tato katalýza reakcí s imobilizovanými enzymy je žádaná. Tzv. magnetický enzymový reaktorový systém s fluidním ložem vytváří mikrokolony, fixované magnetickým polem (Obr. 14). Z pohledu enzymové kinetiky (difúze aj.) imobilizované enzymy v těchto systémech zásadně ovlivňují účinnost enzymové katalýzy. Mikrofluidika se od svého vzniku v 90. letech vyvinula ve vícestrannou technologii a uspořádání mikrofluidních čipů prošly stále složitějšími fázemi s modulárními systémy (Tabeling et al. 2004, Alexandre et al. 2022), v některých případech na úkor ceny analýz. Při vývoji imobilizovaných enzymových mikrosystémů se v minulosti projevilo několik klíčových vlastností pro mikrofluidiku – zvýšení vazebné kapacity enzymu, zlepšení aktivity a stability enzymu, zvýšení analytické účinnosti a citlivosti detekce a jejich vývoj šel směrem k postupům se snadným ovládáním.

Příkladem rozšíření mikrofluidiky s IMER do lékařské diagnostiky byla vysoce účinná proteinová analýza ze suché kapky krve. Ultrarychlý pracovní postup v mikrofluidním reaktoru v práci (Wouters et al. 2017) byl založen na mikročipu z cyklického olefinového kopolymeru v monolitu s trypsinem. Díky svým výhodám – nízké spotřebě vzorku, nízké ceně, rychlé analýze, zpracování velkého počtu vzorků a schopnosti integrace je pro separaci různých biochemických molekul obecně používána další mikrofluidní metoda, mikročipová elektroforéza (Ou et al. 2020, Mikkonen et al. 2022). Jiným



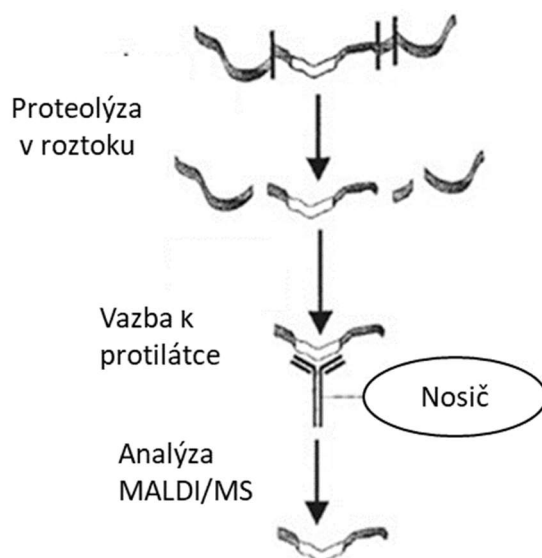
Obrázek 14. Miniaturizovaná kolona („plug“) vytvořená fixací superparamagnetických mikročástic s enzymem (IMER) v průtočném kanálku. Vnější magnetické pole s magnety v pozici, kdy se (a) přitahují (Tarn et al. 2014), anebo (b) odpuzují (Henken et al. 2012). Použito se souhlasem nakladatelů (RSC Publishing a John Wiley and Sons, číslo licence 5507791198805).

konceptem mikrofluidních čipů jsou zařízení na bázi hydrogelu. Tady aplikace mikrofluidiky ukázala, že má potenciál i pro dlouhodobé monitorování buněk v kultuře. Kultivace buněk v různých mikrofluidních zařízeních vyrobených z poly(dimethylsiloxanu (PDMS) je v experimentální buněčné biologii stále běžnější (Halldorsson et al. 2015). Jejich použitím se usnadnilo komplexní a systematické zkoumání vlivu mikroprostředí na buňky (Jiang et al. 2016). Další vývoj v mikrofluidice postoupil ke tkáňovému inženýrství, např. se zaměřením na využití svalových buněk pro robotickou bioaktivaci/ biohybridní robotiku (Raman et al. 2016). Jak se ukázalo, např. v práci (Haase et al. 2017), pomocí mikrofluidního řízení toku lze vyvinout tkáň s jemnou strukturou a na úrovni mikroměřítko je možná její regulace. Jedna z nových možností mikrofluidiky s IMER je její propojení s přípravou polymerních mikrovláken. Mikrovláčna s volitelnými vlastnostmi byla připravena s kovalentně vázanými enzymy v mikrofluidním systému z alginátu a polyakrylové kyseliny (Zhang et al. 2022). Vzhledem k tomu, že jsou rozměry mikrofluidních čipů vhodné pro většinu biologických vzorků, včetně biomakromolekul a buněk, rozšířilo se v posledních dvou desetiletích používání mikrofluidních čipů také v bioanalýze (Bílková et al. 2006, Sheng et al. 2012, Pereiro et al. 2017, Aljadi et al. 2019a, Khaparde et al. 2020).

V tématu vývoje mikrofluidiky jsme se v práci (II-1) zabývali proteomickými aplikacemi a kinetickými studiemi s IMER s trypsinem, podobně jako v předchozím bloku této práce. Práce (II-2) na předchozí navázala a metodou epitopového mapování s IMER a IMAR ve spojení s mikrofluidikou se podílela na studiu diagnostiky alergií. Práce (II-3) se s nově vyvinutým IMER s proteinasou K v mikročipu zaměřila na detekci a rozlišení patologických prionových molekul.

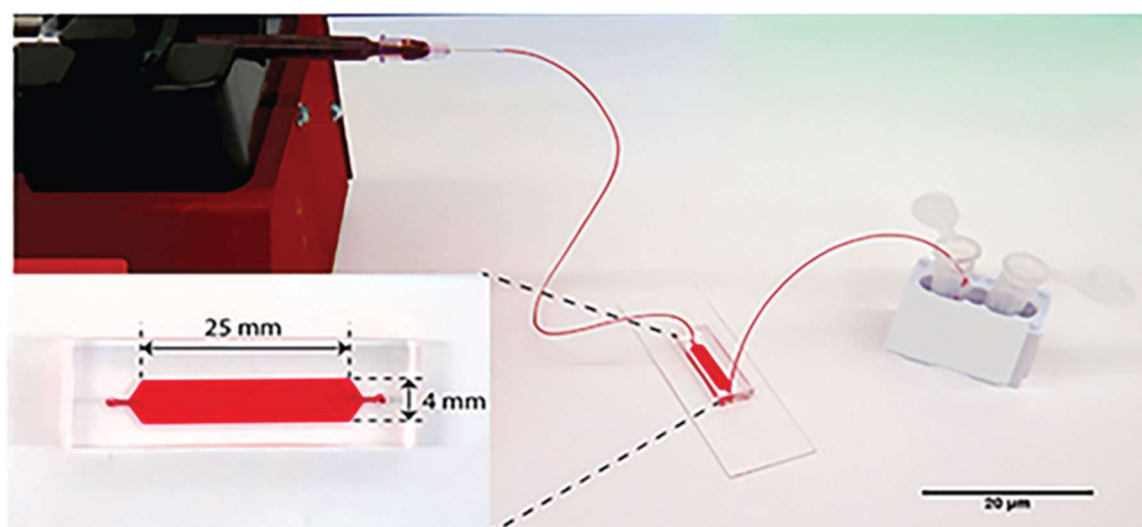
Cílem epitopového mapování bylo odhalení povrchové struktury (epitopu) ovalbuminu, která u pacientů s alergiemi vyvolává tvorbu specifických IgE anti-ovalbuminových protilátek, a snižování alergenicity pomocí peptidové imunoterapie. V metodě epitopového mapování byl nejdříve alergen proteolyticky naštěpen a v druhém kroku byl specifický peptid vyváznut pomocí imunoafinitního nosiče (tzv. imunoprecipací) (Obr. 15).

Odhalování specifit protilátek je důležité pro vývoj imunoanalytických metod pro detekci alergenů nejen ve zdrojových matricích, ale také v potravinách (Jiang et al. 2022). Současné možnosti detekce peptidů jsou dále založené na imunochemické detekci se specifickými protilátkami metodou Western blotu (Cheng et al. 2021). Dalším důvodem pro přesné sledování alergogenních epitopů je odhalování antigenů vhodných ve vývoji vakcín. Tento reverzní vakcinologický přístup spolu s imunoinformatikou již byl použit pro detekci potenciálních antigenů k vývoji účinných vakcín (Soltan et al. 2022, Cheng et al. 2021) a i nádorových vakcín (Cherryholmes et al. 2015). Velmi důležité je přesné odhalení alergogenního epitopu, aby se předešlo zkřížené reaktivitě diagnostických protilátek proti alergenů, falešné pozitivitě a špatně určené diagnóze a klinické léčbě pacientů (Luo et al. 2021).



Obrázek 15. Metoda epitopové extrakce (převzato a upraveno podle Parker et al. 2000). Použito se souhlasem nakladatele (Springer Nature, číslo licence 5507791478971).

Spojení mikrofluidiky a imunoafinitního principu našlo svůj potenciál také v diagnostice alergických reakcí v tzv. bazofilním aktivačním testu (miBAT). miBAT lab-on-chip zařízení má schopnost izolovat bazofily, tj. krevní buňky zodpovědné za imunitní reakce a také za patogenezi zánětlivé alergické reakce, a aktivovat je specifickým alergenem (Obr. 16) (Aljadi et al. 2019b). Mikročipová technologie miBAT byla schopná měřit různé stupně aktivace alergenu na zachycených bazofilech pomocí kvantifikace exprese molekul CD63 (Aljadi et al. 2019a).



Obrázek 16. Mikrofluidní nastavení zařízení se skládá z injekční pumpy připojené k mikrofluidnímu zařízení (mikročipu). Zvětšený rámeček ukazuje rozměry zařízení o délce 25 mm a 50 μm $\times$ 4 mm (v $\times$ š) s celkovým vnitřním objemem 5 μL (Aljadi et al. 2019b). Použito se souhlasem nakladatele (Oxford University Press, číslo licence 5507800182920).

Zvýšenou účinností reakcí s IMAR, tj. fixovanými specifickými protilátkami imobilizovanými na magnetických částicích v mikročipu, se podstatně zkracuje časová náročnost imunoprecipitace (Mohamadi et al. 2010, Phurimsak et al. 2016). Tak např. v jedné z uvedených prací (Phurimsak et al. 2016) byla kvantitativní analýza C reaktivního peptidu (CRP) metodikou enzymové imunoeseje ELISA s využitím IMAR dokončena za pouhých 15 minut a s 15 µl vzorku. Magnetické mikročástice se v imunoafinitních aplikacích díky poměru velkého specifického povrchu mikročástic k objemu v kanálku, s řadou funkčních skupin k vazbě ligandů a snadnou manipulací reaktoru vnějším magnetickým polem, staly velmi oblíbenými. V jiné práci bylo popsáno zakoncentrování izoform amyloidu β z biologického materiálu v mikrofluidním zařízení s rychlými promývacími kroky, čímž se zvýšila citlivost detekce markerů diagnostice Alzheimerovy choroby (Svobodová et al. 2012). Mikrofluidika hraje významnou roli při vytváření jednoduchých uživatelských zkušeností pro odběr vzorků a přesné testování proteinových biomarkerů. Také proto, že umožňuje zpracování vzorků, ve kterých jsou markery zastoupené ve velmi nízkých koncentracích (Nagy et al. 2022).

Jedním z biomarkerů prionového onemocnění Creutzfeldt-Jakobovy choroby je patologický prionový protein PrP^{Sc} (tzv. scrapie prion, také PrP^{res}), s expresí na neuronech v mozkové tkáni. Jako biomarker se může v nízkých hladinách vyskytovat v mozkomíšním moku. Standardem konečné diagnózy prionových onemocnění je post-mortem detekce patologického prionového proteinu PrP^{Sc}, tedy proteasa rezistentní formy, metodami imunohistochemie a Western blotu (CJD. Centers for disease control and prevention, 2023). Odlišení od fyziologického buněčného PrP^C spočívá v jejich odlišné přístupnosti k hydrolýze běžnými proteasami a proteinasou K (McKinley et al. 1983, Prusiner 1998, Kushnirov et al. 2020). Patologické priony jsou infekční podskupinou amyloidů a představují fibrilární agregáty s pravidelnou strukturou. Jedná se o bílkoviny, které jsou v normálním stavu PrP^C běžně degradovatelné. V amyloidní formě je celá nebo část polypeptidové sekvence proteinu odolná vůči působení proteinasy K. Hydrolýzou prionů proteinasou K se zjistilo, že se různé strukturální varianty amyloidů mohou lišit ve velikostech (Vázquez-Fernandez et al. 2016). Proteinasa K (EC 3.4.21.62), je extracelulární alkalická serinová endopeptidasa ze subtilisinové rodiny, izolovaná z *Tritirachium Album* Limber a pojmenovaná podle schopnosti štěpit nativní keratin (Ebeling et al. 1974). Proteinasa K je primárně specifická v hydrolýze proti aromatickým nebo hydrofobním aminokyselinovým zbytkům na karboxylové straně. Proteinasa K stabilizovaná imobilizací v mikroprůtokových reaktorech a skleněných kapilárách je využívána ve výzkumu prionů, v proteomickém studiu a k degradaci proteinových nečistot při izolaci nukleových kyselin z biologických vzorků (Küchler et al. 2015).

Příkladem mikrofluidní aplikace je detekce biomarkeru interleukinu 6 (IL-6) v krvi, která má význam v diagnostice zánětu a nádorových změn v organismu. Modulární mikrofluidní přístup směrem k lab-on-chip, s tzv. fluidizací magnetických mikročástic umožnil specifickou extrakci, prekoncentraci a

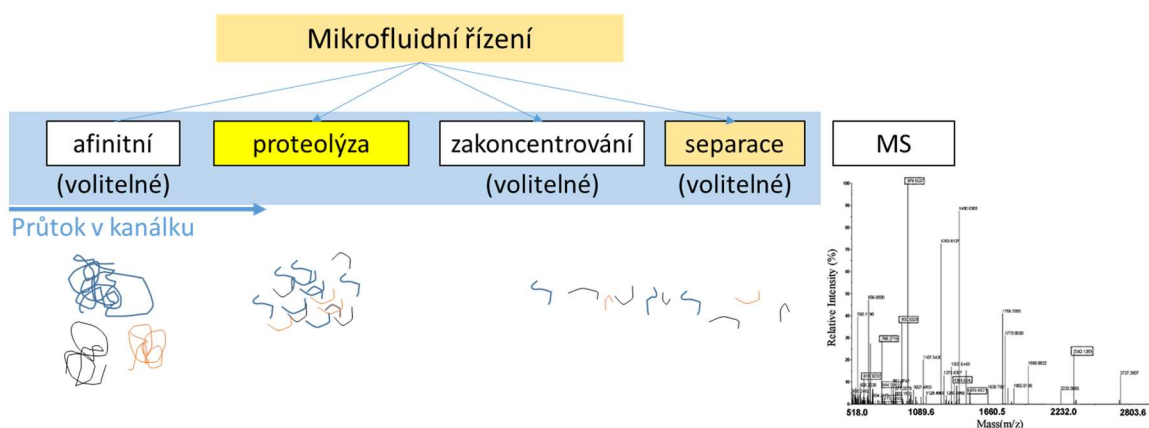
fluorescenční detekci IL-6 přímo na čipu. Ošetřením magnetických částic proti nespecifické sorpci a jejich fluidizací v mikročipu (ve srovnání s jejich fixací) se dosáhlo dvojnásobného zvýšení limitu detekce a velkého dynamického rozsahu (10 pg/ml až 2 ng/ml) ve srovnání s konvenčními metodami (Alexandre et al. 2022).

Lab-on-chip

Mikrofluidní čipy a tzv. „lab-on-a-chip“ a „microTotal Analysis System“ (μ TAS) označují miniaturizovaná analytická zařízení, která mohou integrovat více funkcí, jako přípravu vzorku, separaci látek i detekce na jediném mikročipu (Obr. 17). Výjimečnými přednostmi těchto mikročipů jsou přenosnost, přesná kontrola průtoku kapalin, velmi malá spotřeba vzorků a zpracování velkého počtu vzorků najednou („high throughput“). Nejjednodušší způsob kontroly průtoku roztoků kanálkem je použití přesných injekčních mikropump. To umožňuje provádění řízené proteolýzy jednoduchým, reprodukovatelným a snadno ovladatelným způsobem (II-3). Sofistikovanějšími způsoby řízení průtoku v mikrofluidních zařízeních a integrovaných analýz se zabývá několik společností, např. Fluigent, LabSmith, CETONI, Dolomite, ELVESYS aj. Výhodou automatizace systému je, že reakční výstupy lze řídit optimalizovanými průtoky a je dosaženo vysoké opakovatelnosti (Viovy, 2011).

Způsob fixace imobilizovaných enzymů

Mikrosystémy založené na magnetismu využívají velkého poměru funkční povrchové plochy k objemu magnetických sférických částicemi s imobilizovanými ligandy, což zvyšuje citlivost analýz. Pro účinnou katalýzu enzymových mikroreaktorů je podstatný velký specifický povrch, i proto systémy používají některé typy pevných porézních nosičů. Integrace enzymového mikroreaktoru do mikročipu poskytuje vyšší účinnost reakce, a to díky sníženým difúzním vzdálenostem, zkracuje dobu analýzy a spotřeby



Obrázek 17. Schéma analytických kroků v mikrofluidním zařízení s IMER a off-line MS detekcí.

vzorku a umožňuje automatizaci (II-3). Magnetické síly využívané v mikročipech mají tu výhodu, že jsou do značné míry nezávislé na teplotě, pH a povrchových nábojích. Do těsné blízkosti mikrokanálu jsou aplikovány prostřednictvím externích elektromagnetů (Heinzler et al. 2018, Ou et al. 2019) anebo pomocí magnetů z neodym-železa-boru (NdFeB) (Bílková et al. 2006). Analýzy v mikrosystémech s částicemi zahrnují např. integrované biochemické reakce (Hernandez-Neuta et al. 2018, Comamala et al. 2021), imunoafinitní separace (Phurimsak et al. 2016), i možnosti kvantifikace bakterií (Pereiro et al. 2017). Další typy miniaturizovaných systémů využívající imobilizované enzymy, mají uspořádání kapilárního elektroforetického mikročipu s částicemi nebo bez (Blanes et al. 2007, Liu et al. 2020), IMER v kapiláře z taveného křemene (Matosevic et al. 2010), a porézní monolitické porézní nosiče s IMER (Krenkova et al. 2013).

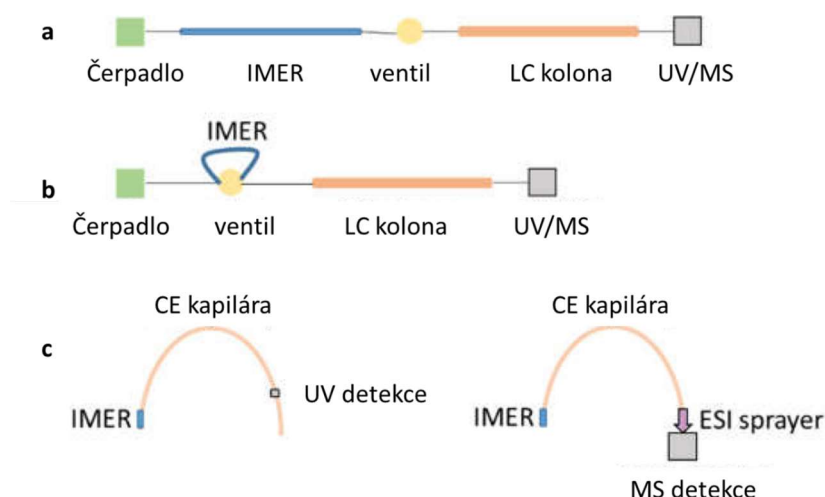
Materiály mikročipů

I v takto dobře prostudované oblasti mohou nastat problémy spojené s ulpíváním částic na vnitřní stěny mikrokanálků a hadiček. Také mohou být provázené nespecifickou adsorpcí proteinů a buněk na částice (Kučerová et al. 2014). Za touto nespecifickou sorpcí proteinů stojí především iontové vodíkové vazby, a další, jako hydrofobní síly a elektrostatické vazby (Li et al. 2016). Pro minimalizaci těchto nedostatků existují dvě hlavní strategie. Jedná se o úpravu povrchu vnitřních stěn mikrofluidního zařízení a povrchu samotných částic. Snížení nespecifické vazby proteinů ze vzorků na mikrokanálky hydrofilními látkami a polymery umožní snížit šum pozadí při měření signálu a tím zvýší citlivost testu.

Častým materiálem používaným pro výrobu mikrofluidního čipu je polymer PDMS. Pro práci s proteiny má ale nepříjemně vysoké hodnoty nespecifické adsorpce. Většina metod určených ke snížení adsorpce/ztráty proteinů na PDMS spočívá v krátkodobém zvýšení hydrofilnosti oxidací povrchu (např. plazmou), vazbou nebo absorpcí dalších polymerů anebo pro dlouhodobější účinek aplikací vhodných peptidů s hydrofilním povrchem (Ma et al. 2000, Yu et al. 2015, Song et al. 2020). Povrchová úprava magnetických částic je možná pomocí hydrofilního PEG, ještě před jejich zavedením do čipu (Kučerová et al. 2014). Použití polymerů také zvyšuje koloidální stabilitu samotných částic.

Detekce produktu

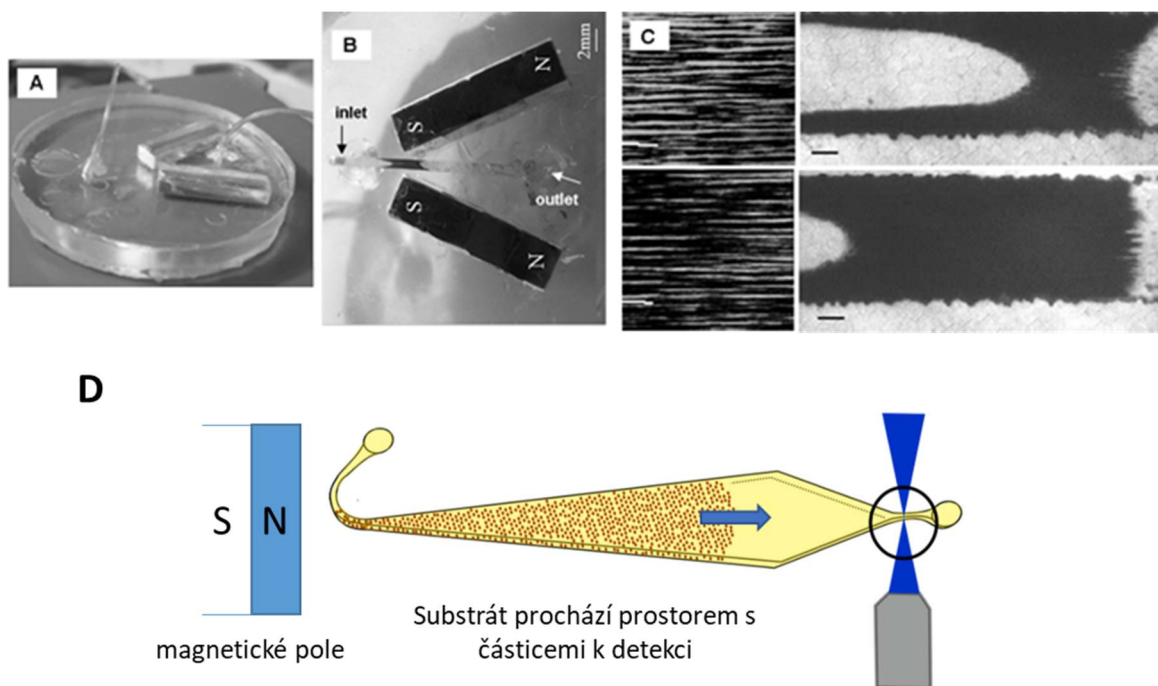
V systémech mikročipové analýzy s IMER se dosahuje velmi účinné analýzy s nízkými koncentracemi vstupujících látek i produktů, a proto je pro citlivou detekci častá a výhodná kombinace s hmotnostním spektrometrem (Obr. 18). V tomto spojení se čipy používají pro předúpravu vzorků včetně hydrolýzy analytu (proteinu) (Comamala et al. 2021), k zakoncentrování analytu a také k odstranění matricových



Obrázek 18. Schematický náčrt online konfigurací IMER kombinovaných se separací založenou na (a, b) kapalinové chromatografii (LC) anebo (c) kapilární elektroforéze (CE) s UV a MS detekcí (Nagy et al. 2022).

materiálů (Chen et al. 2010). Krokem k možné automatizaci analýzy v mikrofluidním systému bylo jeho připojení k hmotnostnímu analyzátoru s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS) (Le Nel a Foret, 2008). Vzhledem k tomu, že detekce látek technikou MALDI MS vyžaduje, aby byly analyty před analýzou naneseny na destičku a ko-krystalizovány se speciální matricí, není možné provádět on-line v režimu kontinuálního toku. Přesto se objevují práce (Zhang et al. 2018), ve kterých je popsána integrovaná platforma pro kvantifikaci proteomu s kombinací on-line štěpením, izotopovému značení peptidů dimethylem a vícerozměrnou separací. Výzvami je překonání experimentálních podmínek – materiály mikročipu, rozpouštědla pro vzorky, tlak, nebo elektrické pole (Comamala et al. 2021). Jinými možnostmi detekcí produktů v mikrofluidním reaktoru s IMER jsou UV-Vis (Ender et al. 2016) nebo elektrochemická detekce (Cheng et al. 2010, Sheng et al. 2012).

Práce (II-1, II-2, II-3) popisují vývoj a aplikace mikrofluidních čipů s imobilizovanými enzymovými a imunoafinitními reaktory (IMER, IMAR). Cílem vývoje bylo vytvoření komplexního mikroanalytického systému (tzv. μ TAS) v proteomických aplikacích. Mikrofluidní systém s kanálkovou strukturou o velikostech od 50 mikrometrů byl vyroben technikou měkké litografie z PDMS (přehled v Whitesides et al. 2001). Mikrofluidní kanálek s rozměry 1 mm $\times$ 0,25 mm $\times$ 20 mm (š $\times$ v $\times$ d) byl umístěný mezi NdFeB magnety v pozici, kdy ke kanálku svírají úhel 30° a odpuzují se (Obr. 19). Magnetické částice v kanálku v paralelním směru k průtoku kapaliny vytvořily mikrokolony, které si zachovaly nízkou hydrodynamickou rezistenci. Ke snížení nespecifické sorpce na PDMS byl povrch kanálku nejprve ošetřován plazmou a později potažen akrylamidem po UV-indukované polymerizaci (Ma et al. 2000).



Obrázek 19. Fixace magnetického IMER v mikročipu (**A**, **B**, **C**) do samoorganizované struktury mikrokolon (**II-3**) a (**D**) do magnetických fluidizovaných loží. Ta jsou založena na homogenní fixaci magnetických částic v mikrofluidické komoře. Tažná síla z trvalého magnetu v ústí mikrokanálku působí vytrvale na částice oproti průtoku kapaliny v mikrokanálku (Alexandre et al. 2022).

Toto jednoduché zařízení obsahovalo jeden vstup do kanálku připojený hadičkou k mikrostříkačce s objemem 0,5 ml (Obr. 19A) a průtok mobilní fáze byl řízen injekční mikropumpou. Magnetická síla v tomto mikročipu byla rozložena po celé délce kanálku. Superparamagnetické částice s enzymy anebo protilátkami byly po optimalizaci vývoje čipu v kanálku koncentrované v oblasti mezi magnety a vytvářely samoorganizované mikrokolony (Obr. 19.B, C). Kompaktní útvar zachycených částic (zátky) v kanálku vytvořila lokálně zvýšená hodnota magnetické síly. Tento systém byl univerzální, a jeho značnou výhodou byla snadná výměna alikvotu částic s IMER. Geometrie polohy magnetů fixujících magnetické částice v mikrokanálku přímo ovlivňovala míru uchycení magnetických částic v kanálku (**II-1**). V další práci jsme prokázali, že citlivost enzymové reakce přímo souvisela s mírou uchycení magnetických částic (Bílková et al. 2006).

V práci (**II-1**) jsme studovali účinnost proteolýzy, která byla provedená v optimalizované struktuře mikrofluidního čipu s trypsinem imobilizovaným na magnetické latexové částice (626 nm, karboxylové skupiny, 46 emu/g, karbodiimidová aktivace s EDC a sulfo-NHS). V první sadě experimentů v mikročipu byla porovnána hydrolýza peptidového substrátu BApNA imobilizovaným trypsinem ve vsádkovém uspořádání a detekci peptidů MALDI-TOF MS. Podle rozměrů alikvotu IMER částic s trypsinem (0,5 mg)

v kanálku a průtokové rychlosti substrátového roztoku 20 $\mu\text{l/h}$ byla stanovena délka kontaktu enzymu se substrátem, tzv. rezidenční čas $T_R = 141 \text{ s}$ (2,35 min). Integrace imobilizovaného enzymového reaktoru do mikročipu dosáhla vyšší účinnosti katalyzované reakce, díky snížené difúzní vzdálenosti, zkrácení doby analýzy, snížené spotřebě vzorku a možné automatizaci systému.

Kinetické konstanty IMER s trypsinem prokázaly ve srovnání se vsádkovým uspořádáním 100násobné zvýšení rychlosti katalýzy. Kinetická konstanta Michaelis-Mentenové K_M pro IMER s trypsinem byla naopak 67x zvýšená (se snížením afinity enzymu k substrátu). Možným vysvětlením pro zvýšení K_M byla ztráta přístupnosti substrátu pro enzym (potvrzuje to i snížení hodnoty k_{cat}), zřejmě způsobená vměstnáním magnetických částic uvnitř kolon. Podobné výsledky s mikrofluidním čipem s IMER (alkalická fosfatasa, fluorescenční nízkomolekulární substrát) byly pozorovány také jinými autory, 6násobné zvýšení kinetické konstanty K_M a 28násobné snížení k_{cat} (Kerby et al. 2006). V jiné práci byla hodnota rychlostní konstanty K_M v mikročipu oproti vsádkovému uspořádání snížena, při obdobném trendu mírně nižší k_{cat} . Vysvětlení je nejspíš opět ve významném příspěvku difúzních účinků ve vsádkovém uspořádání (Ender et al. 2016).

V mikrofluidním čipu byla dále provedena proteolýza rekombinantního lidského růstového hormonu s analýzou peptidů v kapilární elektroforéze (CE) i MALDI-TOF MS. Zde se také prokázala vyšší účinnost a reprodukovatelnost, ve srovnání se vsádkovým uspořádáním a klasickými podmínkami s imobilizovaným trypsinem. Se změnou rychlosti průtoku substrátu v kanálku jsme studovali rozsah proteolýzy v závislosti na délce rezidenčního času T_r (s hodnotami od 141 s do 564 s). Podobné sekvenční pokrytí (přibližně 44 %) bylo získáno analýzou peptidů MALDI-TOF MS už po 10 minutách v mikročipu a po 4 h s volným trypsinem ve vsádkovém uspořádání, a to bez přítomnosti autoproteolytických fragmentů enzymu. Jedním ze závěrů této práce bylo zkrácení potřebné délky štěpení proteinu pomocí IMER v mikročipu z hodin na desítky minut, ke kterému přispěla významná změna molárních poměrů protein: enzym (S: E).

Ve shodě s těmito výsledky jiní autoři s IMER s trypsinem v monolitické porézní koloně sledovali vysokou účinnost enzymového štěpení bílkovin, také s vyšší rychlostí a reprodukovatelností (Ruan et al. 2016). V práci dalších autorů byly v souvislosti s účinností IMER s lipasou v mikročipu zkoumány účinky intenzity magnetického pole a rychlosti proudění kapaliny na inhibici acylační reakce. Při aplikaci střídavého magnetického pole, ve kterém se magnetické momenty magnetických nanočástic otáčely ve směru pole a magnetické nanočástice se chovaly jako mikroskopická míchadla, při kontinuální reakci při vysokých koncentracích substrátu nedocházelo k inhibici reakce (Ou et al. 2019).

Práce (II-2) se zabývala přípravou a zakoncentrováním alergogenních peptidů z ovalbuminu pomocí imunoafinitního IMER a IMAR v mikrofluidním čipu, a následnou analýzou hmotnostní spektrometrií.

Počet případů s potravinovými alergiemi ve světě dlouhodobě stoupá, a metoda epitopového mapování potravních alergenů tak má potenciál v prevenci, diagnostice i terapii. Pro přípravu IMAR s anti-ovalbuminovými protilátkami a IMER s imobilizovanými proteolytickými enzymy (trypsin, proteinasa K, alfa-chymotrypsin, pepsin) byly zvoleny magnetické neporézní SiO_2 mikročástice (1 μm , karboxylové, hydrazidové skupiny, Chemicel). Nejúčinnějším proteolytickým enzymem k ovalbuminu, proteinu se známou vysokou odolností k proteolýze, byl zvolen hovězí trypsin s 24 teoretickými fragmenty. Pro izolaci specifického peptidu byly k orientované imobilizaci anti-ovalbuminových protilátek zvoleny magnetické částice s funkční hydrazidovou skupinou. Jejich imunoprecipitační účinnost s ovalbuminem byla srovnána s protilátkami imobilizovanými na karboxylové částice neorientovanou vazbou. Analýza peptidů hmotnostní spektrometrií s kvadrupólovým TOF detektorem (Q-TOF) a MS/MS sekvenace potvrdily přítomnost izolovaného epitopu. Mikrofluidní hydrolýzou se tedy potvrdilo, že peptid (371-382 AA) z ovalbuminu odpovídal sekvenci alergogenního epitopu 347-385 AA. Z literatury se dále potvrdilo, že specifické IgE protilátky zaměřené proti tomuto peptidu jsou odpovědné v patogenezi alergického procesu (Honma et al. 1996).

Identifikace imunogenních epitopů alergenů (tj. alergenních epitopů) má velký potenciál v léčbě potravinových alergií, např. v přípravě vakcín na bázi peptidů. Jak je uvedeno v souhrnu (Zhou et al. 2021), velké množství epitopů nebylo dosud identifikováno. Nové technologie mapování epitopů nejen alergenů, porozumění identifikace epitopů a vytvoření systematických a komplexních databází jsou pořád aktuální.

Krok směrem ke zvýšení citlivosti rozlišení patologického prionového proteinu PrP^{Sc} od fyziologického PrP^{C} byl v práci (II-3) vyvinut mikroreaktor s imobilizovanou proteinasou K. K imobilizaci proteinasy K jsme použili několik druhů magnetických mikročástic s karboxylovou funkční skupinou a odlišnými polymery (hydrofilní styrenový copolymer, alginová kyselina, latex). Pomocí spektrofotometrické detekce specifické enzymové aktivity s peptidovým substrátem sukcinyl-Ala 3-*p*-nitroanilidem jsme optimalizovali reakční podmínky imobilizace proteinasy K (reakční pH, teplota a čas, koncentrace EDC, sulfo-NHS). Skladovací a operační stabilita imobilizované proteinasy K dosahovaly hodnot 100 % a 68 % z původní aktivity po imobilizaci. Kinetické konstanty Michaelis-Mentenové K_M imobilizované proteinasy K vykazovaly srovnatelné hodnoty z vsádkového a mikrofluidního uspořádání. Hodnota V_{max} enzymové reakce pro imobilizovaný enzym v mikročipu i vsádkově byla nižší ve srovnání s volným enzymem. Vysvětlení spočívá pravděpodobně v důsledku omezené difúze molekul substrátu na povrch částic a k aktivním místům imobilizovaného enzymu. Pokles k_{cat} , tj. maximální rychlost V_{max} dělená koncentrací enzymu (pro experiment v mikročipu) byl do značné míry kompenzován zvýšením

koncentrace enzymu a sníženou difúzí substrátu. Konfigurace reakce v mikročipu přesto vedla k velmi vysokým rychlostem hydrolýzy imobilizovaným enzymem ve srovnání s vsádkovým systémem.

Po předchozím ověření citlivosti integrovaného mikrofluidního enzymového reaktoru IMER s proteinasou K s modelovým proteinem (lidský růstový hormon) byl systém aplikován k proteolýze ovčího prionového proteinu PrP^{Sc} s vyšší expresí v myším mozковém homogenátu. Rozsah proteolýzy jsme studovali v čase se změnou rychlosti průtoku v kanálku a off-line detekcí pomocí Western blotu se specifitou proti C-koncové doméně prionu (AA 145-152). Systém jsme validovali porovnáním štěpení patologického PrP^{Sc} s fyziologickým PrP^C. Účinná reakční kinetika v mikročipu s IMER s proteinasou K umožnila úplné rozlišení normální a patologické formy PrP během několika minut. Pro srovnání ke stejnému výsledku ve vsádkovém systému je potřebných několik hodin. Tento výsledek ukázal, že mikročipový systém byl výrazně citlivější než aktuálně používané metody a má velký potenciál pro vyhledávání PrP^{Sc} v biologickém materiálu živých organismů i v nízkých koncentracích.

Blok III – Nanovláknenné nosiče enzymů v biomedicině

III-1 Srbová, J., Slováková, M., Křípalová, Z., Žárská, M., Špačková, M., Stránská, D., & Bílková, Z. (2016). Covalent biofunctionalization of chitosan nanofibers with trypsin for high enzyme stability. *Reactive and Functional Polymers*, 104, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.05.009>

Autorský podíl: 55 %

Připravila jsem koncept práce, a podílela se na přípravě a charakterizaci nanovláken s trypsinem a na přípravě publikace.

III-2 Slováková, M., Köhlerova, R., Dvorakova, P., Vanova, V., Spackova, M., & Munzarova, M. (2022). Clostridial Collagenase Immobilized on Chitosan Nanofibers for Burn Healing. *Military Medical Science Letters*, 91(4), 324–334. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2022.012>

Autorský podíl: 55 %

Připravila jsem koncept práce a imobilizovanou kolagenasu, biochemické a kinetické experimenty, napsala jsem publikaci.

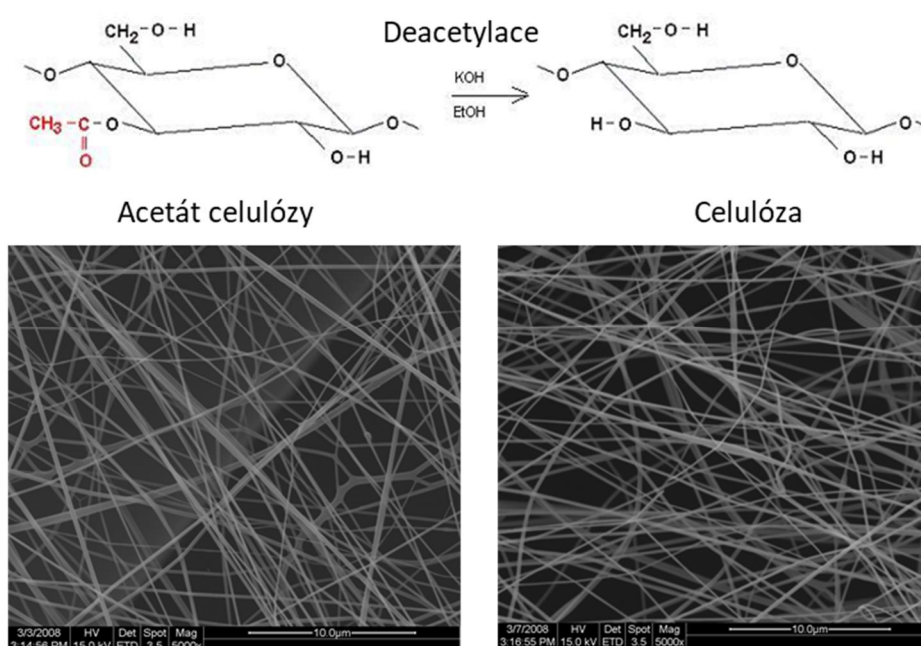
S objevem nanotechnologií se k vazbě proteinů, enzymů a léčiv začaly rozšiřovat nanomateriály jako nanovláknna, grafen, nanočástice aj. (Deshapriya et al. 2014, Hou et al. 2018, Bhokisham et al. 2020). Metodami přípravy nanovláken jsou elektrostatické zvláknění („elektrospining“) a centrifugační spřádání polymerů. Struktura nanovláken má skvělé vlastnosti, a nejen k vazbě ligandů (Greiner et al. 2007). K průmyslové výrobě nanovláken a k většímu uplatnění došlo až po roce 2005, kdy byla patentována technologie pro bezjehlový, vysokonapěťový elektrostatický proces, známý pod značkou Nanospider (Jirsak et al. 2005, Lukas et al. 2008). Dnes se nanovláknna uplatňují v mnoha oborech, například ve filtraci, textiliích, senzorech, optice, katalýze, a intenzivně studují v biomedicině pro dodávání látek/léků, obvazech ran a tkáňovém inženýrství.

Při studiu nanovláknenných obvazových materiálů a chirurgických stehů se zjistilo, že samotné nanostrukturní topografie jsou přínosné při snižování mikrobiální kolonizace a proti tvorbě biofilmu v ranách (Serrano et al. 2015). Přírodní polymery jako celulóza a chitosan v této souvislosti poskytují potřebnou vlhkost, zvyšují proliferaci imunitních buněk proti mikrobiální infiltraci a v případě chitosanu s antibakteriální a antibiofilmovou aktivitou tím pomáhají urychlit proces hojení (Sofi et al. 2021, Baidamshina et al. 2021, Bryan et al. 2022, **III-2**). Chitosan je pro zvláknění získáván deacetylací chitinu z rostlinných a živočišných zdrojů. Při aplikaci nanomateriálu s navázanými látkami na ránu dochází za určitých podmínek pH a teploty v ranách k uvolňování látek. Právě snížené pH se nachází u některých fyziologických a patologických dějů, například u zánětu (Meamar et al. 2021).

Využití proteolytických enzymů v enzymovém debridementu, tj. k vyčištění hůře se hojících anebo infikovaných ran, je doloženo od 60. let 20. století (Chambers et al. 2003, Bott et al. 2007, shrnuto také v Ramundo a Gray, 2008). Na tkáňové úrovni spočívá v narušení nekrotické tkáně v ráně proteasami a podpoře migrace buněk potřebných pro granulaci a reepitelizaci. Typickými enzymy používanými v debridementu jsou serinové proteasy, kolagenasa, papain, bromelain (Payne et al. 2008, Shi et al. 2010, Gilligan et al. 2017). Terapeutické aplikace kolagenasy v podobě masti štěpí kolagen v nekrotické tkáni (chronické rány, popáleniny, vředy, Dupuytrenova kontraktura, poruchy jizev) a přitom selektují zdravé tkáně (Shekhter et al. 2019). Spojení proteas s antimikrobními polysacharidovými nosiči uplatňuje svůj potenciál v regenerativní medicíně. Nejvíce skloňované jsou jejich aplikace při popáleninách, kožních ranách a při výskytu dekubitů při diabetu (Bayat et al. 2021).

Vlastnosti nanovláken

Porézní struktura nanovláknenných vrstev připomíná strukturu extracelulární matrix (Obr. 20). Jako nosiče imobilizovaných biomolekul mají nanovláknena ohromný poměr povrchu k objemu (Hirsch et al. 2018, Tahmasebi et al. 2023). Typický specifický povrch nanovláken je s průměrem jednotlivých vláken



Obrázek 20. Nanovláknena z celulosy lze připravit z acetátu celulosy s následnou deacetylací. Celulosa a její deriváty jsou jednou z ideálních maticí, jsou netoxické, obnovitelné, biologicky rozložitelné a biokompatibilní. Rozměry nanovláken přibližně 200 nm, pořízeno pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Quanta 200 od firmy FEI (laskavě poskytl Mgr. M. Špačková z Elmarco s.r.o., Liberec).

přibližně 500 nm 10 m²/g a 1000 m²/g s průměrem vláken přibližně 50 nm. To vede k mnohem vyšší kapacitě pro vazbu ligandů, ve srovnání s ostatními formami polymerních nosičů (např. částice nebo filmy) (Oliveira et al. 2021). Porozita nanovrstev umožňuje ligandům i rozpouštědlům snadnou difúzi, což v důsledku může vést k vysoké koncentraci vázaných ligandů. V případě vazby enzymů je podle různých autorů míra enzymové aktivity nepřímo úměrná průměru velikostí jednotlivých vláken. Zvýšení enzymové aktivity tak lze přisoudit sníženému počtu interakcí mezi enzymy na povrchu materiálu (Talbert et al. 2013, Shang et al. 2009, Correia et al. 2022).

Vazba ligandu

Volba způsobu vazby proteinů, enzymů a jiných látek na připravená nanovlákná se řídí funkčními skupinami nosiče, stejně jako u předchozích materiálů částic (popsáno v **Bloku I**) (Medina-Castillo et al. 2022, Zhang et al. 2022). Podmínkou pro následné biomedicínské aplikace je zajištění kompatibilních a netoxických látek při přípravě nanovláken i při vazbě ligandů. U již připravených nanovláken může proběhnout imobilizace enzymů do povrchových vrstev fyzikální adsorpcí anebo kovalentní vazbou (Medina-Castillo et al. 2022, El-Moghazy et al. 2016). Výhoda pevně vázaných proteas spočívá především ve stabilizaci autolytických procesů (Pinto et al. 2015, **III-1**, **III-2**). Jinou metodou vazby je enkapsulace / zapouzdření enzymů v průběhu procesu zvlákňování polymeru, protože nezvyšuje riziko použití toxických aktivátorů nanovláknenné vrstvy (Qu et al. 2013, Wong et al. 2014, Pinto et al. 2015, Shoba et al. 2017). Výhodná je inkorporace látek do nanovláken ve formě částic a nanočástic (Bryan et al. 2022, Ghosal et al. 2021).

Adsorbované a enkapsulované enzymy mohou být z nanovláken postupně uvolňované difúzí, a další uvolňování ligandů souvisí s rozpadem biodegradabilních polymerů (Zhang et al. 2022, **III-2**). Pokud jsou nanovrstvy hydrofóbní, umožní to zpomalené uvolňování bioaktivních látek. Míra hydrofobicity, tedy elektrostatického náboje, je možné ovlivnit povrchovou úpravou např. plazmou (Hirsch et al. 2018). Podle zamýšlené aplikace tkáňového inženýrství (náhrada v kůži, výplň kostí apod.) nemusí být vrstvy nanovláken s léčivy a jinými ligandy biodegradabilní - např. kompozitní nanovlákná z PCL/PVA/chitosanu, PCL/kolagenu, alginát/chitosan/kolagen/hydroxyapatit (Mohammadi et al. 2007, Tillman et al. 2009, Yu et al. 2013).

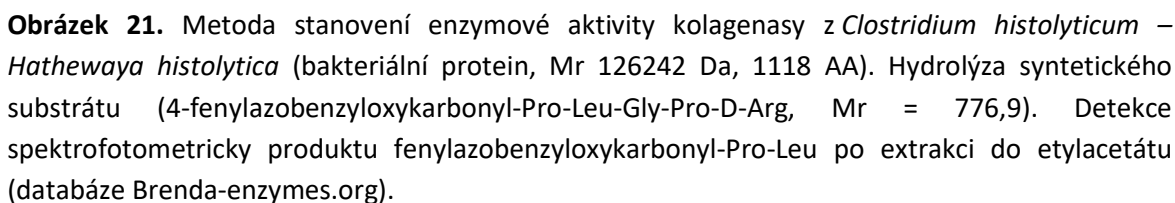
Účelem vývoje nanovláken z chitosanu s trypsinem se v práci (**III-1**) byl kryt k hojení ran a zaměřil se na podmínky přípravy samotných nanovláken a způsob a optimalizaci vazby trypsinu. Hovězí trypsin byl použit jako modelová proteasa, u které je dobře prostudovaný proteolytický efekt a jednoduchý způsob sledování enzymové aktivity. Chitosanové nosiče byly připraveny bezjehlovým elektrostatickým

zvlákněním s vahou 1,0-2,8 g/m² plochy. Pro vazbu trypsinu jsme zvolili několik způsobů kovalentních vazeb a optimalizovali podmínky – více variant karbodiimidové aktivace trypsinu s EDC a sulfo-NHS, jodistanovou oxidací hydroxylových skupin chitosanu a adsorpci.

Pouze jednokroková varianta karbodiimidové vazby trypsinu dosáhla vysoké enzymové aktivity a stability nad 90% z původní enzymové aktivity po 4 týdnech skladování aktivity. Také operační stabilita, sledovaná v jednom dni, byla zachovaná z 97% původní enzymové aktivity. Metoda adsorpce trypsinu poskytla ve srovnání s hodnotou aktivity imobilizovaného trypsinu přibližně 1 % enzymové aktivity. Z důvodu zamýšlené *in vivo* aplikace chitosanových nanovláken s trypsinem na rány bylo ověřeno, že se savčí buněčnou linií Hela v *in vitro* testech se neprokázala cytotoxicita. Také v *in vivo* intradermálních testech dráždivosti u králíků nebyla zaznamenána žádná reakce.

Výsledky této práce potvrdily předpoklad, že nanovlákná z chitosanu mohou sloužit jako vynikající nosiče pro imobilizaci enzymů. Zejména tehdy, jestliže je každý krok imobilizace důkladně optimalizován, aby nedocházelo k rozpouštění či rozpadu nanovláknenné struktury. Technické řešení této práce bylo v dubnu 2014 zapsáno jako užitečný vzor (Stránská et al. 2013). Realizace výsledků v práci byla evidována jako funkční vzorek (Stránská et al. 2014) v oboru Farmakologie a lékárnická chemie.

Práce (III-2) navázala na předchozí optimalizované postupy s nanovláknem a na chitosanová nanovlákná byla karbodiimidovou metodou s EDC a sulfo-NHS kovalentně navázaná klostridiální kolagenasa (EC 3.4.24.3). Cílem bylo vyvinutý nanomateriál s kolagenázou aplikovat lokálně na popáleninách u potkanů. Kolagenasa je metaloproteasa (molekulová hmotnost 70-120 kDa), která je využívána k šetrné, ale účinné disociaci tkání s proteolytickými účinky proti kolagenu a je účinnou látkou v klinické aplikaci k enzymovému debridementu v popáleninách (Nordmark-pharma). Podmínky imobilizace byly optimalizovány a pro další vazby byla zvolena koncentrace enzymu s nejvyšší detekovanou enzymovou aktivitou stanovenou pomocí nízkomolekulárního PZ-peptidu (Obr. 21). Skladovací stabilita imobilizované kolagenasy byla beze změn po dobu 4 týdnů, vysušení nanovláknenné membrány vedlo ke snížení enzymové aktivity pouze o 2%. Hodnoty kinetických konstant Michaelis-Mentenové K_M a V_{max} imobilizované kolagenasy vykazovaly zvýšení afinity enzymu k PZ-peptidu, se současným snížením maximální rychlosti V_{max} .



40

Poděkování

Závěrem této habilitační práce chci poděkovat všem, kteří mě povzbuzovali a pomáhali mi při psaní této práce. Děkuji především spolupracovníkům, kteří se podíleli na publikacích komentovaných v habilitační práci. Ráda zde uvedu jmenovitě výzkumné skupiny. Jedná se o mou domovskou výzkumnou skupinu prof. RNDr. Zuzany Bílkové, Ph.D. na Katedře biologických a biochemických věd, FCHT, Univerzity Pardubice, a skupiny Ing. Daniela Horáka, CSc. z Ústavu makromolekulární chemie, AV ČR v Praze, Dr. Jean-Louis Viovyho z Laboratoře fyzikální chemie, Curie institutu v Paříži, Dr. Myriam Taverny, z Laboratoře proteinů a nanotechnologie v separativních vědách na Univerzitě Paris-Sud v Châtenay-Malabry, prof. Miloše Sedláka, CSc. z Ústavu organické chemie a technologie, FCHT, Univerzity Pardubice, Mgr. Renaty Köhlerové, Ph.D. z Ústavu lékařské biochemie, Lékařské fakulty, Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Ing. Denisy Stránské, Mgr. Martiny Špačkové a Ing. Marcely Munzarové z firem Elmarco, s.r.o. a Nano Medical, s.r.o. Velký dík patří také všem členům naší výzkumné skupiny na Katedře biologických a biochemických věd, FCHT, Univerzity Pardubice, stávajícím i minulým. Trvajících spolupráce a vztahy mě inspirují dál se rozvíjet a vzdělávat.

Velmi ráda tady poděkuji mým nejbližším a širší rodině, protože bez jejich zázemí a tolerance k mé vědecké práci by nebylo možné, aby vznikla.

Reference

1. Abolghasemzade, Samere, Mehrab Pourmadadi, Hamid Rashedi, Fatemeh Yazdian, Saeed Kianbakht, and Mona Navaei-Nigjeh. 2021. "PVA Based Nanofiber Containing CQDs Modified with Silica NPs and Silk Fibroin Accelerates Wound Healing in a Rat Model." *Journal of Materials Chemistry B* 9 (3): 658–76. <https://doi.org/10.1039/d0tb01747g>.
2. Ahmed, Samia A., Shireen A.A. Saleh, Salwa A.M. Abdel-Hameed, and Amira M. Fayad. 2019. "Catalytic, Kinetic and Thermodynamic Properties of Free and Immobilized Caseinase on Mica Glass-Ceramics." *Heliyon* 5 (5): e01674. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01674>.
3. Akira, Murayama, Shimada Kohkichi, and Yamamoto Tadashi. 1978. "Modification of Immunoglobulin G Using Specific Reactivity of Sugar Moiety." *Immunochemistry* 15 (8): 523–28. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0161-5890\(78\)90003-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0161-5890(78)90003-2).
4. Alexandre, Lucile, Amel Bendali, Iago Pereiro, Madad Azimani, Simon Dumas, Laurent Malaquin, Thanh Duc Mai, and Stéphanie Descroix. 2022. "Modular Microfluidic System for On-Chip Extraction, Preconcentration and Detection of the Cytokine Biomarker IL-6 in Biofluid." *Scientific Reports* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13304-z>.
5. Algar, W. Russ, Duane E. Prasuhn, Michael H. Stewart, Travis L. Jennings, Juan B. Blanco-Canosa, Philip E. Dawson, and Igor L. Medintz. 2011. "The Controlled Display of Biomolecules on Nanoparticles: A Challenge Suited to Bioorthogonal Chemistry." *Bioconjugate Chemistry* 22 (5): 825–58. <https://doi.org/10.1021/bc200065z>.
6. Aljadi, Zenib, Frida Kalm, Caroline Nilsson, Ola Winqvist, Aman Russom, Joachim Lundahl, and Anna Nopp. 2019a. "A Novel Tool for Clinical Diagnosis of Allergy Operating a Microfluidic Immunoaffinity Basophil Activation Test Technique." *Clinical Immunology* 209 (October): 108268. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.108268>.
7. Aljadi, Zenib, Frida Kalm, Harisha Ramachandraiah, Anna Nopp, Joachim Lundahl, and Aman Russom. 2019b. "Microfluidic Immunoaffinity Basophil Activation Test for Point-of-Care Allergy Diagnosis." *The Journal of Applied Laboratory Medicine* 4 (2): 152–63. <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.026641>.
8. Asgher, Muhammad, Fareeha Bashir, and Hafiz M N Iqbal. 2018. "Protease-Based Cross-Linked Enzyme Aggregates with Improved Catalytic, Silver Removal, and Dehairing Potentials." *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES* 118 (A): 1247–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.107>.
9. Aslan, Yakup, Yousif Mohammed Sharif, and Ömer Şahin. 2020. "Covalent Immobilization of *Aspergillus Niger* Amyloglucosidase (ANAG) with Ethylenediamine-Functionalized and Glutaraldehyde-Activated Active Carbon (EFGAAC) Obtained from Sesame Seed Shell." *International Journal of Biological Macromolecules* 142 (January): 222–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.226>.
10. Atacan, Keziban, Bekir Cakiroglu, and Mahmut Ozacar. 2017. "Covalent Immobilization of Trypsin onto Modified Magnetite Nanoparticles and Its Application for Casein Digestion." *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES* 97: 148–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.023>.
11. Avigad, G, D Amaral, C Asensio, and B L Horecker. 1962. "The D-Galactose Oxidase of *Polyporus Circinatus*." *The Journal of Biological Chemistry* 237 (September): 2736–43.
12. Baidamshina, Diana R., Victoria A. Koroleva, Svetlana S. Olshannikova, Elena Yu. Trizna, Mikhail I. Bogachev, Valeriy G. Artyukhov, Marina G. Holyavka, and Airat R. Kayumov. 2021. "Biochemical Properties and Anti-Biofilm Activity of Chitosan-Immobilized Papain." *Marine Drugs* 19 (4): 197. <https://doi.org/10.3390/md19040197>.
13. Baidamshina, Diana R., Victoria A. Koroleva, Elena Yu. Trizna, Svetlana M. Pankova, Mariya N. Agafonova, Milana N. Chirkova, Olga S. Vasileva, et al. 2020. "Anti-Biofilm and Wound-Healing Activity of Chitosan-Immobilized Ficin." *International Journal of Biological Macromolecules* 164 (December): 4205–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.030>.
14. Bang, Seung Hyuck, Simranjeet Singh Sekhon, Sung-Jin Cho, So Jeong Kim, Thai-Hoang Le, Pil Kim, Ji-Young Ahn, Yang-Hoon Kim, and Jiho Min. 2016. "Antimicrobial Properties of Lysosomal Enzymes Immobilized on NH₂ Functionalized Silica-Encapsulated Magnetite Nanoparticles." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 16 (1): 1090–94. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10660>.

15. Baran, Erkan Türker, Nazmi Özer, and Vasif Hasirci. 2003. "Solid-Phase Enzyme Modification via Affinity Chromatography." *Journal of Chromatography B* 794 (2): 311–22. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00487-2](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00487-2).
16. Barrientos, Gabriela, Siniša Habazin, Mislav Novokmet, Yahia Almousa, Gordan Lauc, and Melanie L Conrad. 2020. "Changes in Subclass-Specific IgG Fc Glycosylation Associated with the Postnatal Maturation of the Murine Immune System." *Scientific Reports* 10 (1): 15243. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71899-7>.
17. Bayat, S., Zabihi, A. R., Farzad, S. A., Movaffagh, J., Hashemi, E., Arabzadeh, S., & Hahsemi, M. (2021). Evaluation of debridement effects of bromelain-loaded sodium alginate nanoparticles incorporated into chitosan hydrogel in animal models. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(10), 1404–1412. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2021.58798.13060>
18. Bayramoglu, Gulay, V Cengiz Ozalp, Begum Altintas, and M Yakup Arica. 2014. "Preparation and Characterization of Mixed-Mode Magnetic Adsorbent with p-Amino-Benzamidine Ligand: Operated in a Magnetically Stabilized Fluidized Bed Reactor for Purification of Trypsin from Bovine Pancreas." *PROCESS BIOCHEMISTRY* 49 (3): 520–28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.004>.
19. Beaussart, Audrey, Chloé Retourney, Fabienne Quilès, Raphael Dos Santos Morais, Claire Gaiani, Henri-Pierre Fiérobe, and Sofiane El-Kirat-Chatel. 2021. "Supported Lysozyme for Improved Antimicrobial Surface Protection." *Journal of Colloid and Interface Science* 582 (B): 764–72. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.08.107>.
20. Berezin, I V, and A A Klesov. 1976. "Use Of Immobilized Enzymes In Analytical-Chemistry." *Journal Of Analytical Chemistry Of The USSR* 31 (4): 644–56.
21. Besanger, Travis R., Richard J. Hodgson, James R.A. Green, and John D. Brennan. 2006. "Immobilized Enzyme Reactor Chromatography: Optimization of Protein Retention and Enzyme Activity in Monolithic Silica Stationary Phases." *Analytica Chimica Acta* 564 (1): 106–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.066>.
22. Bhokisham, Narendranath, Yi Liu, Adam D Brown, Gregory F Payne, James N Culver, and William E Bentley. 2020. "Transglutaminase-Mediated Assembly of Multi-Enzyme Pathway onto TMV Brush Surfaces for Synthesis of Bacterial Autoinducer-2." *Biofabrication* 12 (4): 045017. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab9e7a>.
23. Bidondo, Lucía, Florencia Festari, Teresa Freire, and Cecilia Giacomini. 2022. "Immobilized Peptide-N-Glycosidase F onto Magnetic Nanoparticles: A Biotechnological Tool for Protein Deglycosylation under Native Conditions." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 69 (1): 209 – 220. <https://doi.org/10.1002/bab.2099>.
24. Bigeard, Jean, Naganand Rayapuram, Delphine Pflieger, and Heribert Hirt. 2014. "Phosphorylation-Dependent Regulation of Plant Chromatin and Chromatin-Associated Proteins." *PROTEOMICS* 14 (19, SI): 2127–40. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400073>.
25. Bilal, Muhammad, and Muhammad Asgher. 2016. "Enhanced Catalytic Potentiality of Ganoderma Lucidum IBL-05 Manganese Peroxidase Immobilized on Sol-Gel Matrix." *JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B-ENZYMATIC* 128: 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.013>.
26. Bílková, Z, J Churáček, Z Kučerová, and J Turková. 1997. "Purification of Anti-Chymotrypsin Antibodies for the Preparation of a Bioaffinity Matrix with Oriented Chymotrypsin as Immobilized Ligand." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 689 (1): 273–79. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00343-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00343-X).
27. Bílková, Zuzana, Marcela Slováková, Antonín Lyčka, Daniel Horák, Jiří Lenfeld, Jaroslava Turková, and Jaroslav Churáček. 2002. "Oriented Immobilization of Galactose Oxidase to Bead and Magnetic Bead Cellulose and Poly(HEMA-Co-EDMA) and Magnetic Poly(HEMA-Co-EDMA) Microspheres." *Journal of Chromatography B* 770 (1–2): 25–34. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00439-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00439-X).
28. Bílková, Zuzana, Marcela Slováková, Nicolas Minc, Claus Fütterer, Roxana Cecal, Daniel Horák, Milan Beneš, et al. 2006. "Functionalized Magnetic Micro- and Nanoparticles: Optimization and Application to μ -Chip Tryptic Digestion." *ELECTROPHORESIS* 27 (9): 1811–24. <https://doi.org/10.1002/elps.200500587>.
29. Binhayeeding, Narisa, Sappasith Klomkiao, and Kanokphorn Sangkharak. 2022. "Use of Purified Glycerol from Biodiesel Plants for Acylglycerol Production and Use of Acylglycerol in Foods." *APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY* 9 (1): 53–65. <https://doi.org/10.22037/afb.v9i1.35623>.

30. Blanes, Lucas, Maria F. Mora, Claudimir L. do Lago, Arturo Ayon, and Carlos D. García. 2007. "Lab-on-a-Chip Biosensor for Glucose Based on a Packed Immobilized Enzyme Reactor." *Electroanalysis* 19 (23): 2451–56. <https://doi.org/10.1002/elan.200704001>.
31. Bolivar, Juan M, and Bernd Nidetzky. 2020. "On the Relationship between Structure and Catalytic Effectiveness in Solid Surface-Immobilized Enzymes: Advances in Methodology and the Quest for a Single-Molecule Perspective." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1868 (2): 140333. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140333>.
32. Bryan, Alex, Ethan Wales, Samarth Vedante, Andreu Blanquer, Dipesh Neupane, Sanjay Mishra, Lucie Bačáková, Tomoko Fujiwara, Jessica Amber Jennings, and Joel D Bumgardner. 2022. "Evaluation of Magnesium-Phosphate Particle Incorporation into Co-Electrospun Chitosan-Elastin Membranes for Skin Wound Healing." *Marine Drugs* 20 (10): 615. <https://doi.org/10.3390/md20100615>.
33. Bott, Richard, James Crissman, Csilla Kollar, Mae Saldajeno, Grant Ganshaw, Xavier Thomas, Thomas H. Lane, Paal Klykken, Jeffrey M. Davidson, and Lillian B. Nanney. 2007. "A Silicone-Based Controlled-Release Device for Accelerated Proteolytic Debridement of Wounds." *Wound Repair and Regeneration* 15 (2): 227–35. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00209.x>.
34. Brandtzaeg, Ole Kristian, Bent-Tore Røen, Siri Enger, Elsa Lundanes, and Steven Ray Wilson. 2017. "Multichannel Open Tubular Enzyme Reactor Online Coupled with Mass Spectrometry for Detecting Ricin." *Analytical Chemistry* 89 (17): 8667–73. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02590>.
35. Brne, P., Y.-P. Lim, A Podgornik, M Barut, B Pihlar, and A. Štrancar. 2009. "Development and Characterization of Methacrylate-Based Hydrazide Monoliths for Oriented Immobilization of Antibodies." *Journal of Chromatography A* 1216 (13): 2658–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.005>.
36. Burkhart, Julia Maria, Cornelia Schumbrutzki, Stefanie Wortelkamp, Albert Sickmann, and René Peiman Zahedi. 2012. "Systematic and Quantitative Comparison of Digest Efficiency and Specificity Reveals the Impact of Trypsin Quality on MS-Based Proteomics." *Journal of Proteomics* 75 (4): 1454–62. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.016>.
37. Çelebi, B. 2017. "A Simple Synthetic Route for the Preparation of a Reversed-Phase Stationary Phase Based on Monosized-Porous Hydrogel Beads and Its Chromatographic Use for Separation of Small Molecules." *Acta Chromatographica* 29 (2): 143–59. <https://doi.org/10.1556/1326.2017.29.2.00>.
38. Çevik, Emre, Mehmet Şenel, and M. Fatih Abasıyanık. 2010. "Construction of Biosensor for Determination of Galactose with Galactose Oxidase Immobilized on Polymeric Mediator Contains Ferrocene." *Current Applied Physics* 10 (5): 1313–16. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2010.03.014>.
39. Chatzigeorgiou Sofia; Korecká Lucie; Janyšková Radka; Hermannová Martina; Šimek Matěj; Čožíková Dagmar; Slováková Marcela; Bílková Zuzana; Bobek Jan; Černý Zbyněk; Čihák; Matouš Velebný Vladimír. Under revision in 2023. Preparation of hyaluronan oligosaccharides by a prokaryotic beta-glucuronidase: characterization of free and immobilized forms of the enzyme. *Carbohydrate Polymers*.
40. "CJD". Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID) , Division of High-Consequence Pathogens and Pathology (DHCPP). 2021. 3.3.2023. <https://www.cdc.gov/prions/cjd/index.html>.
41. Comamala, Gerard, Camilla C Krogh, Vibe S Nielsen, Jörg P Kutter, Josef Voglmeir, and Kasper D Rand. 2021. "Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry with Integrated Electrochemical Reduction and Microchip-Enabled Deglycosylation for Epitope Mapping of Heavily Glycosylated and Disulfide-Bonded Proteins." *Analytical Chemistry* 93 (49): 16330–40. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01728>.
42. Cooney, Michael J. 2017. "Kinetic Measurements for Enzyme Immobilization." In *Enzyme Stabilization and Immobilization. Methods and Protocols.*, edited by Minter S. D., Second edition, 1504:215–32. New York, NY: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4_17.
43. Cornelio, Vivian Estevam, Marcela Cristina de Moraes, Vanessa de Cassia Domingues, Joao Batista Fernandes, Maria Fatima das Gracas Fernandes da Silva, Quezia Bezerra Cass, and Paulo Cezar Vieira. 2018. "Cathepsin D Immobilized Capillary Reactors for On-Flow Screening Assays." *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS* 151: 252–59. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.001>.

44. Correia, Joshua M., Paul R. Handali, and Lauren J. Webb. 2022. "Characterizing Protein–Surface and Protein–Nanoparticle Conjugates: Activity, Binding, and Structure." *The Journal of Chemical Physics* 157 (9): 090902. <https://doi.org/10.1063/5.0101406>.
45. Cymer, Florian, Hermann Beck, Adelheid Rohde, and Dietmar Reusch. 2018. "Therapeutic Monoclonal Antibody N-Glycosylation Structure, Function and Therapeutic Potential." *BIOLOGICALS* 52: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.11.001>.
46. Derwinska, Katarzyna, Ursula Sauer, and Claudia Preininger. 2008. "Adsorption versus Covalent, Statistically Oriented and Covalent, Site-Specific IgG Immobilization on Poly(Vinyl Alcohol)-Based Surfaces." *Talanta* 77 (2): 652–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.016>.
47. Deshapriya, Inoka K., Christina S. Kim, Marc J. Novak, and Challa V. Kumar. 2014. "Biofunctionalization of α -Zirconium Phosphate Nanosheets: Toward Rational Control of Enzyme Loading, Affinities, Activities and Structure Retention." *ACS Applied Materials & Interfaces* 6 (12): 9643–53. <https://doi.org/10.1021/am502070w>.
48. Dubský, Michal, Šárka Kubinová, Jakub Širc, Luděk Voska, Robert Zajíček, Alena Zajíčová, Petr Lesný, et al. 2012. "Nanofibers Prepared by Needleless Electrospinning Technology as Scaffolds for Wound Healing." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23 (4): 931–41. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4577-7>.
49. EBELING, Wolfgang, Norbert HENNRICH, Michael KLOCKOW, Harald METZ, Hans Dieter ORTH, and Hermann LANG. 1974. "Proteinase K from *Tritirachium Album Limber*." *European Journal of Biochemistry* 47 (1): 91–97. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03671.x>.
50. El-Moghazy, A Y, E A Soliman, H Z Ibrahim, J.-L. Marty, G Istamboulie, and T Noguer. 2016. "Biosensor Based on Electrospun Blended Chitosan-Poly (Vinyl Alcohol) Nanofibrous Enzymatically Sensitized Membranes for Pirimiphos-Methyl Detection in Olive Oil." *Talanta* 155: 258–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.018>.
51. Ender, Ferenc, Diána Weiser, Botond Nagy, Csaba László Bencze, Csaba Paizs, Péter Pálovics, and László Poppe. 2016. "Microfluidic Multiple Cell Chip Reactor Filled with Enzyme-Coated Magnetic Nanoparticles — An Efficient and Flexible Novel Tool for Enzyme Catalyzed Biotransformations." *Journal of Flow Chemistry* 6 (1): 43–52. <https://doi.org/10.1556/1846.2015.00036>.
52. Ernest, Vinita, Sekar Gajalakshmi, Amitava Mukherjee, and Natarajan Chandrasekaran. 2014. "Enhanced Activity of Lysozyme-AgNP Conjugate with Synergic Antibacterial Effect without Damaging the Catalytic Site of Lysozyme." *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 42 (5): 336–43. <https://doi.org/10.3109/21691401.2013.818010>.
53. Esmaeili, Elaheh, Masoud Soleimani, Amir Shamloo, Matin Mahmoudifard, and Manouchehr Vossoughi. 2016. "Dual Improvement of DNA-Directed Antibody Immobilization Utilizing Magnetic Fishing and a Polyamine Coated Surface." *RSC Advances* 6 (112): 111210–16. <https://doi.org/10.1039/C6RA22903D>.
54. Fan, Chao, Zhaomei Shi, Yiting Pan, Zifeng Song, Wanjun Zhang, Xinyuan Zhao, Fang Tian, et al. 2014. "Dual Matrix-Based Immobilized Trypsin for Complementary Proteolytic Digestion and Fast Proteomics Analysis with Higher Protein Sequence Coverage." *Analytical Chemistry* 86 (3): 1452–58. <https://doi.org/10.1021/ac402696b>.
55. Filippi, Miriam, Thomas Buchner, Oncay Yasa, Stefan Weirich, and Robert K. Katzschnmann. 2022. "Microfluidic Tissue Engineering and Bio-Actuation." *Advanced Materials* 34 (23): 2108427. <https://doi.org/10.1002/adma.202108427>.
56. Gao, Qiang, Dan Luo, Jun Ding, and Yu-Qi Feng. 2010. "Rapid Magnetic Solid-Phase Extraction Based on Magnetite/Silica/Poly(Methacrylic Acid–Co–Ethylene Glycol Dimethacrylate) Composite Microspheres for the Determination of Sulfonamide in Milk Samples." *Journal of Chromatography A* 1217 (35): 5602–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.067>.
57. Gao, Shipeng, Rebeca M Torrente-Rodríguez, María Pedrero, José M Pingarrón, Susana Campuzano, Javier Rocha-Martin, and José M Guisán. 2022. "Dextran-Coated Nanoparticles as Immunosensing Platforms: Consideration of Polyaldehyde Density, Nanoparticle Size and Functionality." *Talanta* 247: 123549. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123549>.
58. Garcia-Galan, Cristina, Á Berenguer-Murcia, Roberto Fernandez-Lafuente, and Rafael C. Rodrigues. 2011. "Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance." *Advanced Synthesis and Catalysis* 353 (16): 2885–2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>.

59. Geiger, Fania, Tim Wendlandt, Tim Berking, Joachim P. Spatz, and Christina Wege. 2023. "Convenient Site-Selective Protein Coupling from Bacterial Raw Lysates to Coenzyme A-Modified Tobacco Mosaic Virus (TMV) by *Bacillus Subtilis* Sfp Phosphopantetheinyl Transferase." *Virology* 578 (January): 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.11.013>.
60. Ghosal, Kajal, Mária Kováčová, Petr Humpolíček, Jan Vajdák, Michal Bodík, and Zdenko Špitalský. 2021. "Antibacterial Photodynamic Activity of Hydrophobic Carbon Quantum Dots and Polycaprolactone Based Nanocomposite Processed via Both Electrospinning and Solvent Casting Method." *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 35 (September): 102455. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102455>.
61. Ghasemi-Mobarakeh, Laleh, and Mohammad Morshed. 2009. "The Thickness of Electrospun Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanofibrous Scaffolds Influences Cell Proliferation." *The International Journal of Artificial Organs* 32 (3): 150–58.
62. Gilligan, Adrienne M, Curtis R Waycaster, Richard Bizier, Bong-Chul Chu, Marissa J Carter, and Caroline E Fife. 2017. "Comparative Effectiveness of Clostridial Collagenase Ointment to Medicinal Honey for Treatment of Pressure Ulcers." *Advances in Wound Care* 6 (4): 125–34. <https://doi.org/10.1089/wound.2016.0720>.
63. González-Campo, Arántzazu, Bilge Eker, Han J. G. E. Gardeniers, Jurriaan Huskens, and Pascal Jonkheijm. 2012. "A Supramolecular Approach to Enzyme Immobilization in Micro-Channels." *Small* 8 (22): 3531–37. <https://doi.org/10.1002/sml.201200565>.
64. Gottschalk, J., Aßmann, M., Kuballa, J., & Elling, L. (2022). Repetitive Synthesis of High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid with Immobilized Enzyme Cascades. *ChemSusChem*, 15(9). <https://doi.org/10.1002/cssc.202101071>
65. Greiner, Andreas, and Joachim H. Wendorff. 2007. "Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers." *Angewandte Chemie International Edition* 46 (30): 5670–5703. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200604646>.
66. Guo, Junli, Lingling Yang, Zhida Gao, Chenxi Zhao, Ye Mei, and Yan-Yan Song. 2020. "Insight of MOF Environment-Dependent Enzyme Activity via MOFs-in-Nanochannels Configuration." *ACS CATALYSIS* 10 (10): 5949–58. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c00591>.
67. Haase, Kristina, and Roger D Kamm. 2017. "Advances in On-Chip Vascularization." *Regenerative Medicine* 12 (3): 285–302. <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0152>.
68. Halldorsson, Skarphedinn, Edinson Lucumi, Rafael Gómez-Sjöberg, and Ronan M.T. Fleming. 2015. "Advantages and Challenges of Microfluidic Cell Culture in Polydimethylsiloxane Devices." *Biosensors and Bioelectronics* 63 (January): 218–31. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.029>.
69. Haycock, J. W., N. G. Ahn, M. H. Cobb, and E. G. Krebs. 1992. "ERK1 and ERK2, Two Microtubule-Associated Protein 2 Kinases, Mediate the Phosphorylation of Tyrosine Hydroxylase at Serine-31 in Situ." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (6): 2365–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.6.2365>.
70. Heinzler, Raphael, Jonas Hübner, Thomas Fischöder, Lothar Elling, and Matthias Franzreb. 2018. "A Compartmented Flow Microreactor System for Automated Optimization of Bioprocesses Applying Immobilized Enzymes." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6 (DEC). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00189>.
71. Henager, Samuel H., Stephanie Henriquez, Daniel R. Dempsey, and Philip A. Cole. 2020. "Analysis of Site-Specific Phosphorylation of PTEN by Using Enzyme-Catalyzed Expressed Protein Ligation." *ChemBioChem* 21 (1–2): 64–68. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900316>.
72. Henderson, Grant E, Kevin D Isett, and Tillman U Gemgross. 2011. "Site-Specific Modification of Recombinant Proteins: A Novel Platform for Modifying Glycoproteins Expressed in *E. Coli*." *BIOCONJUGATE CHEMISTRY* 22 (5): 903–12. <https://doi.org/10.1021/bc100510g>.
73. Henken, Rachel L., Rattikan Chantiwas, and S. Douglass Gilman. 2012. "Influence of Immobilized Biomolecules on Magnetic Bead Plug Formation and Retention in Capillary Electrophoresis." *ELECTROPHORESIS* 33 (5): 827–33. <https://doi.org/10.1002/elps.201100353>.
74. Hernandez-Neuta, Ivan, Iago Pereiro, Annika Ahlford, Davide Ferraro, Qiongdi Zhang, Jean-Louis Viovy, Stephanie Descroix, and Mats Nilsson. 2018. "Microfluidic Magnetic Fluidized Bed for DNA Analysis in Continuous Flow Mode." *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS* 102: 531–39. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.064>.

75. Hirsch, Edit, Márió Nacsá, Ferenc Ender, Miklós Mohai, Zsombor K Nagy, and György J Marosi. 2018. "Preparation and Characterization of Biocompatible Electrospun Nanofiber Scaffolds." *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* 62 (4): 510–18. <https://doi.org/10.3311/PPch.12854>.
76. Hodgson, Richard J, Yang Chen, Zheng Zhang, Dina Tleugabulova, Hong Long, Xiaoming Zhao, Michael Organ, Michael A Brook, and John D Brennan. 2004. "Protein-Doped Monolithic Silica Columns for Capillary Liquid Chromatography Prepared by the Sol–Gel Method: Applications to Frontal Affinity Chromatography." *Analytical Chemistry* 76 (10): 2780–90. <https://doi.org/10.1021/ac0352124>.
77. Højlyls-Larsen, Kim B., and Knud J. Jensen. 2013. "Solid-Phase Synthesis of Phosphopeptides." *Methods in Molecular Biology* 1047: 191–99. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-544-6_13.
78. Holland-Nell, Kai, and Annette G Beck-Sickinger. 2007. "Specifically Immobilised Aldo/Keto Reductase AKR1A1 Shows a Dramatic Increase in Activity Relative to the Randomly Immobilised Enzyme." *ChemBioChem* 8 (9): 1071–76. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700056>.
79. Honma, K, Y Kohno, K Saito, N Shimojo, T Horiuchi, H Hayashi, N Suzuki, T Hosoya, H Tsunoo, and H Niimi. 1996. "Allergenic Epitopes of Ovalbumin (OVA) in Patients with Hen's Egg Allergy: Inhibition of Basophil Histamine Release by Haptenic Ovalbumin Peptide." *Clinical and Experimental Immunology* 103 (3): 446 – 453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1996.tb08301.x>.
80. Hou, Bo, and Adarsh D. Radadia. 2018. "Differential Stability of Biosensing Proteins on Transferred Mono/Bilayer Graphene." *ACS Biomaterials Science & Engineering* 4 (2): 675–81. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00379>.
81. Humphrey, Sean J, and Elise J Needham. 2023. "Targets Mapped for Almost All Human Kinase Enzymes." *Nature*, January. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-04583-7>.
82. Cha, Taewoon, Athena Guo, and Xiao-Yang Zhu. 2005. "Enzymatic Activity on a Chip: The Critical Role of Protein Orientation." *PROTEOMICS* 5 (2): 416–19. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400948>.
83. Chambers, L., Woodrow, S., Brown, A. P., Harris, P. D., Phillips, D., Hall, M., Church, J. C. T., & Pritchard, D. I. (2003). Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British Journal of Dermatology*, 148(1), 14–23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.04935.x>
84. Chen, Dajing, Cang Wang, Wei Chen, Yuquan Chen, and John X J Zhang. 2015. "PVDF-Nafion Nanomembranes Coated Microneedles for in Vivo Transcutaneous Implantable Glucose Sensing." *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS* 74: 1047–52. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.036>.
85. Chen, F H, Q Gao, and J Z Ni. 2008. "The Grafting and Release Behavior of Doxorubicin from Fe(3)O(4)@SiO(2) Core-Shell Structure Nanoparticles via an Acid Cleaving Amide Bond: The Potential for Magnetic Targeting Drug Delivery." *Nanotechnology* 19 (16): 165103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/16/165103>.
86. Chen, Kuei-Hsiang, Sze-Ying Lee, Pau-Loke Show, Shih-Cheng Hong, and Yu-Kaung Chang. 2018. "Direct Recovery of Malate Dehydrogenase from Highly Turbid Yeast Cell Homogenate Using Dye-Ligand Affinity Chromatography in Stirred Fluidized Bed." *Journal of Chromatography B* 1100–1101 (November): 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.039>.
87. Chen, Shao-Peng, Xiao-Dong Yu, Jing-Juan Xu, and Hong-Yuan Chen. 2010. "Lab-on-a-Chip for Analysis of Triglycerides Based on a Replaceable Enzyme Carrier Using Magnetic Beads." *The Analyst* 135 (11): 2979. <https://doi.org/10.1039/c0an00231c>.
88. Cheng, Hao-Wen, Wei-Ting Tsai, Yi-Ying Hsieh, Kuan-Chun Chen, and Shyi-Dong Yeh. 2021. "Identification of a Common Epitope in Nucleocapsid Proteins of Euro-America Orthotospoviruses and Its Application for Tagging Proteins." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168583>.
89. Cherryholmes, Gregory A., Sasha E. Stanton, and Mary L. Disis. 2015. "Current Methods of Epitope Identification for Cancer Vaccine Design." *Vaccine* 33 (51): 7408–14. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.116>.
90. Cho, Young Il, Ji Suk Choi, Seo Young Jeong, and Hyuk Sang Yoo. 2010. "Nerve Growth Factor (NGF)-Conjugated Electrospun Nanostructures with Topographical Cues for Neuronal Differentiation of Mesenchymal Stem Cells." *Acta Biomaterialia* 6 (12): 4725–33. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.06.019>.

91. Choi, Seoung-ryoung, Jin-soo Seo, Rochelle F. H. Bohaty, and C. Dale Poulter. 2014. "Regio- and Chemoselective Immobilization of Proteins on Gold Surfaces." *Bioconjugate Chemistry* 25 (2): 269–75. <https://doi.org/10.1021/bc400413d>.
92. Ikemoto, Hideki, Susanne L. Mossin, Jens Ulstrup, and Qijin Chi. 2014. "Probing Structural and Catalytic Characteristics of Galactose Oxidase Confined in Nanoscale Chemical Environments." *RSC Adv.* 4 (42): 21939–50. <https://doi.org/10.1039/C4RA00653D>.
93. Jiang, Weiqian, Mingqiang Li, Zaozao Chen, and Kam W Leong. 2016. "Cell-Laden Microfluidic Microgels for Tissue Regeneration." *Lab Chip* 16 (23): 4482–4506. <https://doi.org/10.1039/C6LC01193D>.
94. Jiang, Xingyi, Han Mu, Yun-Hwa Peggy Hsieh, and Qinchun Rao. 2022. "Isolation and Characterization of Chicken Serum Albumin (Hen Egg Alpha-Livetin, Gal d 5)." *Foods* 11 (11): 1637. <https://doi.org/10.3390/foods11111637>.
95. Jirsak, O, F. Sanetrik, D. Lukas, V. Kotek, L. Martinova, and J. Chaloupek. 2005. Method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method. WO2005024101, issued 2005.
96. Ju, Hen-Yi, Chia-Hung Kuo, Jui-Rze Too, Yung-Chuan Liu, and Chwen-Jen Shieh. 2012. "A Green Peptide Synthesis—Using a Magnetic Biocatalyst in a Stirred-Tank Bioreactor." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1 (1): 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2011.08.002>.
97. Karboune, Salwa, Ronald Neufeld, and Selim Kermasha. 2005. "Immobilization and Biocatalysis of Chlorophyllase in Selected Organic Solvent Systems." *Journal of Biotechnology* 120 (3): 273–83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.025>.
98. Karikari, Thomas K, Nicholas J Ashton, Gunnar Brinkmalm, Wagner S Brum, Andrea L Benedet, Laia Montoliu-Gaya, Juan Lantero-Rodriguez, et al. 2022. "Blood Phospho-Tau in Alzheimer Disease: Analysis, Interpretation, and Clinical Utility." *NATURE REVIEWS NEUROLOGY* 18 (7): 400–418. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00665-2>.
99. Kartikeyan, Aradhana, Vinduja Vasudevan, Aakash John Peter, Nagasathiya Krishnan, Devadasan Velmurugan, Palaniyandi Velusamy, Periasamy Anbu, Perumal Palani, and Pachiappan Raman. 2022. "Effect of Incubation Period on the Glycosylated Protein Content in Germinated and Ungerminated Seeds of Mung Bean (*Vigna Radiata* (L.) Wilczek)." *International Journal of Biological Macromolecules* 217 (September): 633–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.036>.
100. Kecskemeti, Adam, and Attila Gaspar. 2017. "Preparation and Characterization of a Packed Bead Immobilized Trypsin Reactor Integrated into a PDMS Microfluidic Chip for Rapid Protein Digestion." *Talanta* 166 (May): 275–83. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.060>.
101. Kecskemeti, Adam, and Attila Gaspar. 2018. "Particle-Based Immobilized Enzymatic Reactors in Microfluidic Chips." *Talanta* 180 (April): 211–28. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.043>.
102. Kerby, Matthew B., Robert S. Legge, and Anubhav Tripathi. 2006. "Measurements of Kinetic Parameters in a Microfluidic Reactor." *Analytical Chemistry* 78 (24): 8273–80. <https://doi.org/10.1021/ac061189l>.
103. Khaparde, Ashish, and Kishore K.R. Tetala. 2020. "Simplification of Affinity Macroporous Monolith Microfluidic Column Synthesis and Its Ability for Protein Separation." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 181 (March): 113099. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113099>.
104. Khodadust, Rouhollah, Gozde Unsoy, Serap Yalcin, Gungor Gunduz, and Ufuk Gunduz. 2013. "PAMAM Dendrimer-Coated Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Characterization of Different Generations." *Journal of Nanoparticle Research* 15 (3): 1488. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1488-6>.
105. Kim, Mira, Dong Sik Shin, Jaehi Kim, and Yoon Sik Lee. 2010. "Substrate Screening of Protein Kinases: Detection Methods and Combinatorial Peptide Libraries." *Biopolymers* 94 (6): 753–62. <https://doi.org/10.1002/bip.21506>.
106. Kjeldsen, T. 2000. "Yeast Secretory Expression of Insulin Precursors." *Applied Microbiology and Biotechnology* 54 (3): 277–86. <https://doi.org/10.1007/s002530000402>.
107. Kluchova, Katerina, Radek Zboril, Jiri Tucek, Michaela Pecova, Ludmila Zajoncova, Ivo Safarik, Miroslav Mashlan, et al. 2009. "Superparamagnetic Maghemite Nanoparticles from Solid-State Synthesis - Their Functionalization towards Peroral MRI Contrast Agent and Magnetic Carrier for Trypsin Immobilization." *Biomaterials* 30 (15): 2855–63. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.023>.

108. Knezevic, Zorica, Nenad Milosavic, Dejan Bezbradica, Zivana Jakovljevic, and Radivoje Prodanovic. 2006. "Immobilization of Lipase from *Candida Rugosa* on Eupergit® C Supports by Covalent Attachment." *Biochemical Engineering Journal* 30 (3): 269–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.05.009>.
109. Korecká, Lucie, Zuzana Bílková, Michal Holčapek, Josef Královský, Milan Beneš, Jiří Lenfeld, Nicolas Minc, Roxana Cecal, Jean-Louis Viovy, and Michael Przybylski. 2004. "Utilization of Newly Developed Immobilized Enzyme Reactors for Preparation and Study of Immunoglobulin G Fragments." *Journal of Chromatography B* 808 (1): 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.035>.
110. Korecká, Lucie, Barbora Jankovicová, Jana Krenková, Lenka Hernychová, Marcela Slováková, Anne Le-Nell, Josef Chmelík, Frantisek Foret, Jean-Louis Viovy, and Zuzana Bílková. 2008. "Bioaffinity Magnetic Reactor for Peptide Digestion Followed by Analysis Using Bottom-up Shotgun Proteomics Strategy." *Journal of Separation Science* 31 (3): 507–15. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700428>.
111. Korecká, Lucie, Jana Ježová, Zuzana Bílková, Milan Beneš, Daniel Horák, Olga Hradcová, Marcela Slováková, and Jean-Louis Viovy. 2005. "Magnetic Enzyme Reactors for Isolation and Study of Heterogeneous Glycoproteins." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (1): 349–57. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.02.030>.
112. Krenkova, Jana, Akos Szekrenyes, Zsolt Keresztessy, Frantisek Foret, and Andras Guttman. 2013. "Oriented Immobilization of Peptide-N-Glycosidase F on a Monolithic Support for Glycosylation Analysis." *Journal of Chromatography A* 1322 (December): 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.087>.
113. Kucerova, Jana, Zuzana Svobodova, Petr Knotek, Jiri Palarcik, Milan Vlcek, Miloslav Kincl, Daniel Horak, Julien Autebert, Jean-Louis Viovy, and Zuzana Bilkova. 2014. "PEGylation of Magnetic Poly(Glycidyl Methacrylate) Microparticles for Microfluidic Bioassays." *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS* 40 (July): 308–15. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.011>.
114. Küchler, Andreas, Julian N Bleich, Bernhard Sebastian, Petra S Dittrich, and Peter Walde. 2015. "Stable and Simple Immobilization of Proteinase K Inside Glass Tubes and Microfluidic Channels." *ACS Applied Materials & Interfaces* 7 (46): 25970–80. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b09301>.
115. Kumar, Sumit, Anamika Sindhu, and Pannuru Venkatesu. 2021. "Ionic Liquid-Modified Gold Nanoparticles for Enhancing Antimicrobial Activity and Thermal Stability of Enzymes." *ACS Applied Nano Materials* 4 (3): 3185–96. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c00401>.
116. Kushnirov, Vitaly V., Alexander A. Dergalev, and Alexander I. Alexandrov. 2020. "Proteinase K Resistant Cores of Prions and Amyloids." *Prion* 14 (1): 11–19. <https://doi.org/10.1080/19336896.2019.1704612>.
117. Łacki, Karol M., and Frank J. Riske. 2020. "Affinity Chromatography: An Enabling Technology for Large-Scale Bioprocessing." *Biotechnology Journal* 15 (1): 1800397. <https://doi.org/10.1002/biot.201800397>.
118. Nel, Anne Le, Jana Krenkova, Karel Kleparnik, Claire Smadja, Myriam Taverna, Jean-Louis Viovy, and Frantisek Foret. 2008. "On-Chip Tryptic Digest with Direct Coupling to ESI-MS Using Magnetic Particles." *ELECTROPHORESIS* 29 (24): 4944–47. <https://doi.org/10.1002/elps.200800431>.
119. Lenfeld, Jiří. 1993. "MAGNETIC BEAD CELLULOSE." *ANGEWANDTE MAKROMOLEKULARE CHEMIE* 212: 147–55. <https://doi.org/10.1002/apmc.1993.052120113>.
120. Lesaichere, Marie-Laure, Mahesh Uttamchandani, Grace Y J Chen, and Shao Q Yao. 2002. "Developing Site-Specific Immobilization Strategies of Peptides in a Microarray." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12 (16): 2079–83. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00379-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00379-7).
121. Li, Nan, Junzhu Xiao, Xiaoman Hai, Ke Wang, and Fuquan Dang. 2016. "Key Role of Ionic Hydrogen Bonding in Nonspecific Protein Adsorption on a Hydrophobic Surface." *The Journal of Physical Chemistry C* 120 (34): 19135–41. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b05176>.
122. Li, Tao, Liping Guo, and Zhenxin Wang. 2008. "Microarray Based Raman Spectroscopic Detection with Gold Nanoparticle Probes." *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS* 23 (7): 1125–30. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.11.002>.
123. Li, Yan, Xiuqing Xu, Bo Yan, Chunhui Deng, Wenjia Yu, Pengyuan Yang, and Xiangmin Zhang. 2007. "Microchip Reactor Packed with Metal-Ion Chelated Magnetic Silica Microspheres for Highly Efficient Proteolysis." *Journal of Proteome Research* 6 (6): 2367–75. <https://doi.org/10.1021/pr060558r>.

124. Li, Yunfang, Jia Xu, Yu Chen, Zhinan Mei, and Yuxiu Xiao. 2015. "Screening of Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 β from Traditional Chinese Medicines Using Enzyme-Immobilized Magnetic Beads Combined with High-Performance Liquid Chromatography." *Journal of Chromatography. A* 1425 (December): 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.062>.
125. Liu, Shuang, Huimin Bao, Luyan Zhang, and Gang Chen. 2013. "Efficient Proteolysis Strategies Based on Microchip Bioreactors." *Journal of Proteomics* 82 (April): 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.012>.
126. Liu, Siyao, Markus Höldrich, Adrian Sievers-Engler, Jeannie Horak, and Michael Lämmerhofer. 2017. "Papain-Functionalized Gold Nanoparticles as Heterogeneous Biocatalyst for Bioanalysis and Biopharmaceuticals Analysis." *Analytica Chimica Acta* 963 (April): 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.009>.
127. Liu, Xin, Irfan Azhar, Habib Khan, Qishu Qu, Miaomiao Tian, and Li Yang. 2020. "Capillary Electrophoresis-Immobilized Enzyme Microreactors for Acetylcholinesterase Assay with Surface Modification by Highly-Homogeneous Microporous Layer." *Journal of Chromatography A* 1609: 460454. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460454>.
128. López, Elena, Rune Matthiesen, Isabel López, Keith Ashman, Jesús Mendieta, Jan-Jaap Wesselink, Paulino Gómez-Puertas, and Antonio Ferreira. 2011. "Functional Phosphoproteomics for Current Immunology Research." *Journal of Integrated OMICS* 1 (1): 1–16. <https://doi.org/10.5584/jiomics.v1i1.40>.
129. Lukas, David, Arindam Sarkar, and Pavel Pokorný. 2008. "Self-Organization of Jets in Electrospinning from Free Liquid Surface: A Generalized Approach." *Journal of Applied Physics* 103 (8): 084309. <https://doi.org/10.1063/1.2907967>.
130. Luo, Wenting, Huimin Huang, Peiyan Zheng, Jinping Zheng, and Baoqing Sun. 2021. "CCD Inhibition Test Can Improve the Accuracy of the Detection of Pollen and Seed Food Allergen-Specific IgE in Southern China." *JOURNAL OF ASTHMA AND ALLERGY* 14: 439–47. <https://doi.org/10.2147/JAA.S302920>.
131. Ma, Huimin, Robert H. Davis, and Christopher N. Bowman. 2000. "A Novel Sequential Photoinduced Living Graft Polymerization." *Macromolecules* 33 (2): 331–35. <https://doi.org/10.1021/ma990821s>.
132. Maciejewska, Magdalena, and Marta Grochowicz. 2023. "Synthesis and Thermal Characterization of Porous Polymeric Microspheres Functionalized with Thiol Groups." *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, February. <https://doi.org/10.1007/s10973-023-11972-1>.
133. Marques Netto, Caterina G C, Leandro H Andrade, and Henrique E Toma. 2018. "Carbon Dioxide/Methanol Conversion Cycle Based on Cascade Enzymatic Reactions Supported on Superparamagnetic Nanoparticles." *ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS* 90 (1, 1): 593–606. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170330>.
134. Martínez-Esteso, María José, Jørgen Nørgaard, Marcel Brohée, Reka Haraszi, Alain Maquet, and Gavin O'Connor. 2016. "Defining the Wheat Gluten Peptide Fingerprint via a Discovery and Targeted Proteomics Approach." *Journal of Proteomics* 147 (SI): 156–68. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.015>.
135. Matosevic, S., G. J. Lye, and F. Baganz. 2010. "Design and Characterization of a Prototype Enzyme Microreactor: Quantification of Immobilized Transketolase Kinetics." *Biotechnology Progress* 26 (1): 118–26. <https://doi.org/10.1002/btpr.319>.
136. Mazurenko, Stanislav, Zbynek Prokop, and Jiri Damborsky. 2020. "Machine Learning in Enzyme Engineering." *ACS Catalysis* 10 (2): 1210–23. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b04321>.
137. McKinley, Michael P., David C. Bolton, and Stanley B. Prusiner. 1983. "A Protease-Resistant Protein Is a Structural Component of the Scrapie Prion." *Cell* 35 (1): 57–62. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90207-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90207-6).
138. Meamar, Rokhsareh, Sana Chegini, Jaleh Varshosaz, Ashraf Aminorroaya, Masoud Amini, and Mansour Siavosh. 2021. "Alleviating Neuropathy of Diabetic Foot Ulcer by Co-Delivery of Venlafaxine and Matrix Metalloproteinase Drug-Loaded Cellulose Nanofiber Sheets: Production, in Vitro Characterization and Clinical Trial." *Pharmacological Reports: PR* 73 (3): 806–19. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00220-8>.

139. Medina-Castillo, Antonio L., Lucija Ruzic, Bernd Nidetzky, and Juan M. Bolivar. 2022. "Hydrophilic Nonwoven Nanofiber Membranes as Nanostructured Supports for Enzyme Immobilization." *ACS Applied Polymer Materials* 4 (8): 6054–66. <https://doi.org/10.1021/acsapm.2c00863>.
140. Mikkonen, Saara, Leila Josefsson, Meeri E.-L. Mäkinen, Veronique Chotteau, and Åsa Emmer. 2022. "Capillary and Microchip Electrophoresis Method Development for Amino Acid Monitoring during Biopharmaceutical Cultivation." *Biotechnology Journal* 17 (8): 2100325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/biot.202100325>.
141. Milosavic, Nenad, Radivoje Prodanovic, Slobodan Jovanovic, Irena Novakovic, and Zoran Vujcic. 2005. "Pereparation and Characterization of Two Types of Covalently Immobilized Amyloglucosidase." *Journal of the Serbian Chemical Society* 70 (5): 713–19. <https://doi.org/10.2298/JSC0505713M>.
142. Miyao, Hiroki, Yusuke Ikeda, Arata Shiraishi, Yuji Kawakami, and Shinji Sueda. 2015. "Immobilization of Immunoglobulin-G-Binding Domain of Protein A on a Gold Surface Modified with Biotin Ligase." *Analytical Biochemistry* 484 (September): 113–21. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.05.010>.
143. Mohamadi, Mohamad Reza, Zuzana Svobodova, Romain Verpillot, Hermann Esselmann, Jens Wiltfang, Markus Otto, Myriam Taverna, Zuzana Bilkova, and Jean-Louis Viovy. 2010. "Microchip Electrophoresis Profiling of A Beta Peptides in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease." *ANALYTICAL CHEMISTRY* 82 (18): 7611–17. <https://doi.org/10.1021/ac101337n>.
144. Mohammadi, Y., M. Soleimani, M. Fallahi-Sichani, A. Gazme, V. Haddadi-Asl, E. Arefian, J. Kiani, R. Moradi, A. Atashi, and N. Ahmadbeigi. 2007. "Nanofibrous Poly(ϵ -Caprolactone)/Poly(Vinyl Alcohol)/Chitosan Hybrid Scaffolds for Bone Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells." *The International Journal of Artificial Organs* 30 (3): 204–11. <https://doi.org/10.1177/039139880703000305>.
145. Mohy Eldin, M. S., M. R. EL-Aassar, A. A. EL-Zatahry, and M. M.B. EL-Sabbah. 2015. "B-Galactosidase Immobilization Onto Poly (Acrylonitrile- Co-Methyl Methacrylate) Nanoparticles." *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* 29 (3): 193–200.
146. Mukhopadhyay, Arka, and Krishanu Chakrabarti. 2015. "Enhancement of Thermal and PH Stability of an Alkaline Metalloprotease by Nano-Hydroxyapatite and Its Potential Applications." *RSC Advances* 5 (109): 89346–62. <https://doi.org/10.1039/C5RA16179G>.
147. Nagy, Cynthia, Ruben Szabo, and Attila Gaspar. 2022. "Microfluidic Immobilized Enzymatic Reactors for Proteomic Analyses—Recent Developments and Trends (2017–2021)." *Micromachines* 13 (2): 311. <https://doi.org/10.3390/mi13020311>.
148. Nemoto, Takayuki, Satoshi Miyazaki, Tasuku Kanai, Toyoaki Maruta, Shinya Satoh, Norie Yoshikawa, Toshihiko Yanagita, and Akihiko Wada. 2010. "Nav1.7-Ca²⁺ Influx-Induced Increased Phosphorylations of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) and P38 Attenuate Tau Phosphorylation via Glycogen Synthase Kinase-3 β : Priming of Nav1.7 Gating by ERK and P38." *European Journal of Pharmacology* 640 (1–3): 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.04.048>.
149. Nguyen, Le Truc, and Kun-Lin Yang. 2017. "Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates of Horseradish Peroxidase and Glucose Oxidase for Catalyzing Cascade Chemical Reactions." *Enzyme and Microbial Technology* 100: 52–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.02.007>.
150. Nordmark-Pharma. 2022. "Collagenase NB 4G Proved Grade-Extra Side Activities. Produktová Informace." 2022. <https://www.nordmark-pharma.de/en/business-customers/biochemicals/products/collagenase-for-research/collagenase-nb-4g-proved-grade/>. Staženo 9.1.2023
151. Nuytten, N, M Hakimhashemi, T Ysenbaert, L Defour, J Trekker, S J H Soenen, Paul der Meeren, and M. De Cuyper. 2010. "PEGylated Lipids Impede the Lateral Diffusion of Adsorbed Proteins at the Surface of (Magneto)Liposomes." *COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES* 80 (2): 227–31. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.009>.
152. Oliveira, Danilo A., Denise Molinnus, Stefan Beging, José R. Siqueira, and Michael J. Schöning. 2021. "Biosensor Based on Self-Assembled Films of Graphene Oxide and Polyaniline Using a Field-Effect Device Platform." *Physica Status Solidi (A)* 218 (13): 2000747. <https://doi.org/10.1002/pssa.202000747>.
153. Ou, Xiaowen, Peng Chen, Xizhi Huang, Shunji Li, and Bi-Feng Liu. 2020. "Microfluidic Chip Electrophoresis for Biochemical Analysis." *Journal of Separation Science* 43 (1): 258–70. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900758>.

154. Ou, Zhimin, Jiaying Pan, Lan Tang, and Hanbing Shi. 2019. "Continuous Enantiomer-selective Acylation Reaction of 1-phenylethanamine in a Magnetic Fluidized Bed Reactor System (MFBR)." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 94 (6): 1951–57. <https://doi.org/10.1002/jctb.5978>.
155. Papamichael, Emmanuel M., Haralambos Stamatis, Panagiota-Yirolanda Stergiou, Athanasios Foukis, and Olga A. Gkini. 2019. "Enzyme Kinetics and Modeling of Enzymatic Systems." In *Advances in Enzyme Technology. Biomass, Biofuels, Biochemicals*, edited by Ram Sarup Singh, Reeta Rani Singhania, Ashok Pandey, and Christian Larroche, 71–104. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00003-0>.
156. Park, Juyoung, Yo-Han Kim, Hyo-Jin Yoon, Bong-Hyun Jun, and Yoon-Sik Lee. 2011. "Preparation of Pore Size Controllable Macroporous Polymer Beads." *JOURNAL OF INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY* 17 (4): 794–98. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2011.05.023>.
157. Parker, Carol E, and Kenneth B Tomer. 2000. "Epitope Mapping by a Combination of Epitope Excision and MALDI-MS." In *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, edited by John R Chapman, 185–201. New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-045-4:185>.
158. Pasuri, Jenni, Jani Holopainen, Hanna Kokkonen, Maria Persson, Kyosti Kauppinen, Petri Lehenkari, Eero Santala, Mikko Ritala, and Juha Tuukkanen. 2015. "Osteoclasts in the Interface with Electrospun Hydroxyapatite." *COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES* 135: 774–83. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.045>.
159. Payne, Wyatt G, R Emerick Salas, Francis Ko, Deepak K Naidu, Guillermo Donate, Terry E Wright, and Martin C Robson. 2008. "Enzymatic Debriding Agents Are Safe in Wounds with High Bacterial Bioburdens and Stimulate Healing." *Eplasty* 8: e17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461120%0A>
160. Pereiro, Iago, Amel Bendali, Sanae Tabnaoui, Lucile Alexandre, Jana Srbova, Zuzana Bilkova, Shane Deegan, et al. 2017. "A New Microfluidic Approach for the One-Step Capture, Amplification and Label-Free Quantification of Bacteria from Raw Samples." *Chemical Science* 8 (2): 1329–36. <https://doi.org/10.1039/C6SC03880H>.
161. Phurimsak, Chayakom, Mark Tarn, and Nicole Pamme. 2016. "Magnetic Particle Plug-Based Assays for Biomarker Analysis." *Micromachines* 7 (5): 77. <https://doi.org/10.3390/mi7050077>.
162. Pinto, Susana C, Ana R Rodrigues, Jorge A Saraiva, and José A Lopes-da-Silva. 2015. "Catalytic Activity of Trypsin Entrapped in Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) Nanofibers." *Enzyme and Microbial Technology* 79–80 (November): 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.07.002>.
163. Popplewell, Jonathan, and Luo, Ruben. 2013. "Immobilization of Active Kinases for Small Molecule Inhibition Studies." February 4, 2013. <https://www.bioradiations.com/immobilization-of-active-kinases-for-small-molecule-inhibition-studies/>.
164. Prikryl, Petr, Jiri Lenfeld, Daniel Horak, Marie Ticha, and Zdenka Kucerova. 2012. "Magnetic Bead Cellulose as a Suitable Support for Immobilization of α -Chymotrypsin." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168 (2): 295–305. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9772-y>.
165. Prusiner, Stanley B. 1998. "Prions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (23): 13363–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13363>.
166. Pscheidt, Beate, Roland Weis, and Anton Glieder. 2005. "Targeting Posttranslational Modifications – Perspectives for Biocatalyst Engineering." *CHIMIA* 59 (10): 727. <https://doi.org/10.2533/000942905777675679>.
167. Qi, Haoling, Sudhakaran Prabakaran, François-Xavier Cantrelle, Béatrice Chambraud, Jeremy Gunawardena, Guy Lippens, and Isabelle Landrieu. 2016. "Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-Regulated Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 291 (14): 7742–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700914>.
168. Qu, Feini, Jung-Ming G Ming G. Lin, John L. Esterhai, Matthew B. Fisher, and Robert L. Mauck. 2013. "Biomaterial-Mediated Delivery of Degradative Enzymes to Improve Meniscus Integration and Repair." *Acta Biomaterialia* 9 (5): 6393–6402. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.016>.
169. Raman, Ritu, Caroline Cvetkovic, Sebastien G. M. Uzel, Randall J. Platt, Parijat Sengupta, Roger D. Kamm, and Rashid Bashir. 2016. "Optogenetic Skeletal Muscle-Powered Adaptive Biological Machines." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (13): 3497–3502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516139113>.

170. Ramundo, J., & Gray, M. (2008). Enzymatic Wound Debridement. *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing*, 35(3), 273–280. <https://doi.org/10.1097/01.WON.0000319125.21854.78>
171. Rastian, Zahra, Abbas Ali Khodadadi, Zheng Guo, Farzaneh Vahabzadeh, and Yadollah Mortazavi. 2016. "Plasma Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes for Immobilization of Candida Antarctica Lipase B: Production of Biodiesel from Methanolysis of Rapeseed Oil." *APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY* 178 (5): 974–89. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1922-6>.
172. Reddy, C. E., L. Albanito, P. De Marco, D. Aiello, M. Maggiolini, A. Napoli, and A. M. Musti. 2013. "Multisite Phosphorylation of C-Jun at Threonine 91/93/95 Triggers the Onset of c-Jun pro-Apoptotic Activity in Cerebellar Granule Neurons." *Cell Death & Disease* 4 (10): e852–e852. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.381>.
173. Riggs, Larry, Cathy Sioma, and Fred E Regnier. 2001. "Automated Signature Peptide Approach for Proteomics." *Journal of Chromatography A* 924 (1–2): 359–68. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00900-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00900-1).
174. Rombouts, Ine, Bert Lagrain, Markus Brunnbauer, Jan A Delcour, and Peter Koehler. 2013. "Improved Identification of Wheat Gluten Proteins through Alkylation of Cysteine Residues and Peptide-Based Mass Spectrometry." *Scientific Reports* 3 (1): 2279. <https://doi.org/10.1038/srep02279>.
175. Rosano, Germán L., and Eduardo A. Ceccarelli. 2014. "Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli: Advances and Challenges." *Frontiers in Microbiology* 5 (APR): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.
176. Rosen, Christian B, and Matthew B Francis. 2017. "Targeting the N Terminus for Site-Selective Protein Modification." *Nature Chemical Biology* 13 (7): 697–705. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2416>.
177. Roskoski, Robert. 2005. "Src Kinase Regulation by Phosphorylation and Dephosphorylation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.012>.
178. Roskoski, Robert. 2015. "A Historical Overview of Protein Kinases and Their Targeted Small Molecule Inhibitors." *Pharmacological Research* 100 (October): 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.010>.
179. Rotková, Jana, Romana Šuláková, Lucie Korecká, Pavla Zdražilová, Miroslava Jandová, Jiří Lenfeld, Daniel Horák, and Zuzana Bílková. 2009. "Laccase Immobilized on Magnetic Carriers for Biotechnology Applications." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321 (10): 1335–40. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.02.034>.
180. Ruan, Guihua, Zhenwei Wu, Yipeng Huang, Meiping Wei, Rihui Su, and Fuyou Du. 2016. "An Easily Regenerable Enzyme Reactor Prepared from Polymerized High Internal Phase Emulsions." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 473 (1): 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.049>.
181. Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular And Cellular Biochemistry*, 307(1–2), 249–264. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9603-6>
182. Salinas, Paul A, May Joy C Miller, Melanie X Lin, Phil J Savickas, and John J Thomas. 2012. "Mass Spectrometry-Based Characterization of Acidic Glycans on Protein Therapeutics." *International Journal of Mass Spectrometry* 312 (SI): 122–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2011.06.017>.
183. Sangeetha, K., and T. Emilia Abraham. 2008. "Investigation on the Development of Sturdy Bioactive Hydrogel Beads." *Journal of Applied Polymer Science* 107 (5): 2899–2908. <https://doi.org/10.1002/app.27445>.
184. Sanko, Vildan, Ahmet Şenocak, Süreyya Oğuz Tümay, and Erhan Demirbas. 2023. "A Novel Comparative Study for Electrochemical Urea Biosensor Design: Effect of Different Ferrite Nanoparticles (MFe₂O₄, M: Cu, Co, Ni, Zn) in Urease Immobilized Composite System." *Bioelectrochemistry* 149: 108324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108324>.
185. Serrano, Cristina, Luis García-Fernández, Juan Pedro Fernández-Blázquez, Mike Barbeck, Shahram Ghanaati, Ron Unger, James Kirkpatrick, et al. 2015. "Nanostructured Medical Sutures with Antibacterial Properties." *Biomaterials* 52 (0): 291–300. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.039>.

186. Shafi, Azra, Maryam Khan, and Qayyum Husain. 2022. "Nanosupport Immobilized β -Galactosidases, Their Stabilization, and Applications." In *Nanomaterials for Biocatalysis*, 661–88. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824436-4.00023-X>.
187. Shang, Wen, Joseph H. Nuffer, Virginia A. Muñiz-Papandrea, Wilfredo Colón, Richard W. Siegel, and Jonathan S. Dordick. 2009. "Cytochrome c on Silica Nanoparticles: Influence of Nanoparticle Size on Protein Structure, Stability, and Activity." *Small* 5 (4): 470–76. <https://doi.org/10.1002/smll.200800995>.
188. Shangguan, Lulu, Lingyi Zhang, Zhichao Xiong, Jun Ren, Runsheng Zhang, Fangyuan Gao, and Weibing Zhang. 2015. "Investigation of Bi-Enzymatic Reactor Based on Hybrid Monolith with Nanoparticles Embedded and Its Proteolytic Characteristics." *Journal of Chromatography A* 1388 (April): 158–66. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.040>.
189. Shekhter, Anatoly B, Anastasia V Balakireva, Natalia V Kuznetsova, Marina N Vukolova, Petr F Litvitsky, and Andrey A. Zamyatnin Jr. 2019. "Collagenolytic Enzymes and Their Applications in Biomedicine." *Current Medicinal Chemistry* 26 (3): 487–505. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171006124236>.
190. Sheng, Jin, Lei Zhang, Jianping Lei, and Huangxian Ju. 2012. "Fabrication of Tunable Microreactor with Enzyme Modified Magnetic Nanoparticles for Microfluidic Electrochemical Detection of Glucose." *Analytica Chimica Acta* 709 (January): 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.10.008>.
191. Shi, Lei, Ryan Ermis, Brett Kiedaisch, and Dennis Carson. 2010. "The Effect of Various Wound Dressings on the Activity of Debriding Enzymes." *Advances in Skin & Wound Care* 23 (10): 456–62. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000383224.64524.ae>.
192. Shi, Rui, Jingjing Ye, Weiyang Li, Jingshuang Zhang, Jie Li, Chengai Wu, Jiajia Xue, and Liquan Zhang. 2019. "Infection-Responsive Electrospun Nanofiber Mat for Antibacterial Guided Tissue Regeneration Membrane." *MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS* 100: 523–34. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.039>.
193. Shi, Xing-Xing, Zhi-Zheng Wang, Yu-Liang Wang, Guang-Yi Huang, Jing-Fang Yang, Fan Wang, Ge-Fei Hao, and Guang-Fu Yang. 2022. "PTMdyna: Exploring the Influence of Post-Translation Modifications on Protein Conformational Dynamics." *BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS* 23 (1). <https://doi.org/10.1093/bib/bbab424>.
194. Shoba, Ekambaram, Rachita Lakra, Manikantan Syamala Kiran, and Purna Sai Korrapati. 2017. "Fabrication of Core–Shell Nanofibers for Controlled Delivery of Bromelain and Salvianolic Acid B for Skin Regeneration in Wound Therapeutics." *Biomedical Materials* 12 (3): 035005. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa6684>.
195. Sibbald, R. G., Elliott, J. A., Ayello, E. A., & Somayaji, R. (2015). Optimizing the Moisture Management Tightrope with Wound Bed Preparation 2015 (c). *ADVANCES IN SKIN & WOUND CARE*, 28(10), 466–476. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000470851.27030.98>
196. Slováková, M, V Kratochvilová, J Palarčík, R Metelka, P Dvořáková, J Srbová, M Munzarová, and Z Bílková. 2016. "Chitosan Nanofibers and Nanoparticles for Immobilization of Microbial Collagenase." *Vlákna a Textil* 23 (3): 193 – 198. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85020553398&partnerID=40&md5=68394f8afb56f769dfb355b510c84ec7>.
197. Slováková, Marcela. 2023. "Chapter 7 - Kinetic, Stability, and Activity of the Nanoparticles-Immobilized Enzymes." In *Antimicrobial Dressings*, edited by Raju Khan and Sorna Gowri, 133–51. Developments in Applied Microbiology and Biotechnology. Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95074-9.00001-4>.
198. Slováková, Marcela, and Zuzana Bilkova. 2021. "Contemporary Enzyme-Based Methods for Recombinant Proteins In Vitro Phosphorylation." *Catalysts* 11 (8): 1007. <https://doi.org/10.3390/catal11081007>.
199. Sofi, Hasham S, Towseef Akram, Nadeem Shabir, Rajesh Vasita, Arvind H Jadhav, and Faheem A Sheikh. 2021. "Regenerated Cellulose Nanofibers from Cellulose Acetate: Incorporating Hydroxyapatite (HAp) and Silver (Ag) Nanoparticles (NPs), as a Scaffold for Tissue Engineering Applications." *MATERIALS SCIENCE \& ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS* 118. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111547>.
200. Soltan, Mohamed A, Mohammed Y Behairy, Mennatallah S. Abdelkader, Sarah Albogami, Eman Fayad, Refaat A Eid, Khaled M Darwish, Sameh S Elhady, Ahmed M Lotfy, and Muhammad Alaa Eldeen. 2022.

- "In Silico Designing of an Epitope-Based Vaccine Against Common E. Coli Pathotypes." *FRONTIERS IN MEDICINE* 9 (March). <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.829467>.
201. Song, Xiaokai, Zhongyi Jiang, Lin Li, and Hong Wu. 2014. "Immobilization of β -Glucuronidase in Lysozyme-Induced Biosilica Particles to Improve Its Stability." *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 8 (3): 353–61. <https://doi.org/10.1007/s11705-014-1421-2>.
 202. Song, Yongxin, Angran Feng, Zhijian Liu, and Dongqing Li. 2020. "Zeta Potentials of PDMS Surfaces Modified with Poly(Ethylene Glycol) by Physisorption." *ELECTROPHORESIS* 41 (10–11): 761–68. <https://doi.org/10.1002/elps.201900246>.
 203. Stránská D., Slováková M., Kučerová J. 2013. Chitosan imobilizovaný trypsinem pro kryty ran. Funkční vzorek s názvem v oboru Farmakologie a lékárnická chemie (kontrolní číslo výsledku 152617656).
 204. Stránská D., Slováková M., J. Kučerová, Z. Bílková. 2014. Prostředek pro aplikaci proteolytických enzymů na ránu a prostředek ke krytí ran. Užité vzor CZ26861, 2012-27049. Původce podávaného užitého vzoru v ČR: Elmarco s.r.o, Univerzita Pardubice.
 205. Strauss, Poriah, Francesca Nuti, Michael Quagliata, Anna Maria Papini, and Mattan Hurevich. n.d. "Accelerated Solid-Phase Synthesis of Glycopeptides Containing Multiple N-Glycosylated Sites." *ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1039/d2ob01886a>.
 206. Su, Min-Gang, Julia Tzu-Ya Weng, Justin Bo-Kai Hsu, Kai-Yao Huang, Yu-Hsiang Chi, and Tzong-Yi Lee. 2017. "Investigation and Identification of Functional Post-Translational Modification Sites Associated with Drug Binding and Protein-Protein Interactions." *BMC Systems Biology* 11 (7): 132. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0506-1>.
 207. Sun, Gongqin, Latha Ramdas, Wei Wang, Jennifer Vinci, John McMurray, and Raymond J.A. Budde. 2002. "Effect of Autophosphorylation on the Catalytic and Regulatory Properties of Protein Tyrosine Kinase Src." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397 (1): 11–17. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2627>.
 208. Sun, Hongyan, Souvik Chattopadhyaya, Jun Wang, and Shao Q Yao. 2006. "Recent Developments in Microarray-Based Enzyme Assays: From Functional Annotation to Substrate/Inhibitor Fingerprinting." *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY* 386 (3): 416–26. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0511-5>.
 209. Sun, Jun, Lin Yang, Mengmeng Jiang, Yu Shi, Bin Xu, and Hai-le Ma. 2017. "Stability and Activity of Immobilized Trypsin on Carboxymethyl Chitosan-Functionalized Magnetic Nanoparticles Cross-Linked with Carbodiimide and Glutaraldehyde." *Journal of Chromatography B* 1054 (March): 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.04.016>.
 210. Svobodova, Zuzana, Mohamad Reza Mohamadi, Barbora Jankovicova, Hermann Esselmann, Romain Verpillot, Markus Otto, Myriam Taverna, Jens Wiltfang, Jean-Louis Viovy, and Zuzana Bilkova. 2012. "Development of a Magnetic Immunosorbent for On-Chip Preconcentration of Amyloid β Isoforms: Representatives of Alzheimer's Disease Biomarkers." *Biomicrofluidics* 6 (2): 024126. <https://doi.org/10.1063/1.4722588>.
 211. Sys, Milan, Michaela Oblukova, Viliam Kolivoska, Romana Sokolova, Lucie Korecka, and Tomas Mikysek. 2020. "Catalytic Properties of Various Immobilized Mushroom Tyrosinase: A Kinetic Study for Future Development of Biomimetic Amperometric Biosensors." *JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY* 864. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114066>.
 212. Tabeling, Patrick. 2004. "Foreword." *Comptes Rendus Physique* 5 (5): 519–20. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2004.04.001>.
 213. Tacias-Pascacio, Veymar G., Claudia Ortiz, Nazzoly Rueda, Ángel Berenguer-Murcia, Niuris Acosta, Inmaculada Aranz, Concepción Civera, Roberto Fernandez-Lafuente, and Andrés R. Alcántara. 2019. "Dextran Aldehyde in Biocatalysis: More than a Mere Immobilization System." *Catalysts* 9 (7). <https://doi.org/10.3390/catal9070622>.
 214. Tahmasebi, Elham, and Roya Mirzania. 2023. "On-Chip Electromembrane Extraction of Some Polar Acidic Drugs from Plasma Samples by the Development of an Active and Efficient Polymeric Support for Liquid Membrane Based on Electrospinning Process." *Analytica Chimica Acta* 1238 (January): 340628. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340628>.
 215. Taka'aki, Miura, Morishima Kenischi, Miyazaki Takuya, Matsuura Tetsu, Ohta Masateru, Shiratori Yasuhiko, and Japan) (Chugai Pharmaceutical Co. 2010. "High-Throughput Profiling of Kinase Inhibitors

- Selectivity Using the ProteOn™ XPR36 Protein Interaction Array System,” 36–39. https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lisr/literature/Bulletin_5960A.pdf.
216. Talbert, Joey N., and Julie M. Goddard. 2013. “Influence of Nanoparticle Diameter on Conjugated Enzyme Activity.” *Food and Bioprocess Processing* 91 (4): 693–99. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.006>.
 217. Tanyolaç, Deniz, and Ahmet R Özdural. 2000. “Preparation of Low-Cost Magnetic Nitrocellulose Microbeads.” *Reactive and Functional Polymers* 45 (3): 235–42. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00037-7).
 218. Tarn, Mark D., Sally A. Peyman, and Nicole Pamme. 2013. “Simultaneous Trapping of Magnetic and Diamagnetic Particle Plugs for Separations and Bioassays.” *RSC Advances* 3 (20): 7209. <https://doi.org/10.1039/c3ra40237a>.
 219. Tillman, Bryan W, Saami K Yazdani, Sang Jin Lee, Randolph L Geary, Anthony Atala, and James J Yoo. 2009. “The in Vivo Stability of Electrospun Polycaprolactone-Collagen Scaffolds in Vascular Reconstruction.” *Biomaterials* 30 (4): 583–88. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.006>.
 220. Tomizaki, K Y, K Usui, and H Mihara. 2005. “Protein-Detecting Microarrays: Current Accomplishments and Requirements.” *CHEMBIOCHEM* 6 (5): 783–99. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400232>.
 221. Turková, J., M. Fusek, J. Štovičková, and Z. Králová. 1988. “Biospecific Complex Formation as a Tool for Oriented Immobilization.” *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia* 17 (1): 241–56. <https://doi.org/10.1002/masy.19880170117>.
 222. Turková, Jaroslava. 1999. “Oriented Immobilization of Biologically Active Proteins as a Tool for Revealing Protein Interactions and Function.” *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722 (1–2): 11–31. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00434-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00434-4).
 223. Vaish, Amit, Vitalii Silin, Marlon L Walker, Kristen L Steffens, Susan Krueger, Alexei A Yeliseev, Klaus Gawrisch, and David J Vanderah. 2013. “A Generalized Strategy for Immobilizing Uniformly Oriented Membrane Proteins at Solid Interfaces.” *Chem. Commun.* 49 (26): 2685–87. <https://doi.org/10.1039/C3CC00077J>.
 224. Vázquez-Fernández, Ester, Matthijn R. Vos, Pavel Afanasyev, Lino Cebey, Alejandro M. Sevilano, Enric Vidal, Isaac Rosa, et al. 2016. “The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy.” *PLOS Pathogens* 12 (9): e1005835. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005835>.
 225. Viovy, Jean-Louis. 2011. “10th Anniversary Issue: France.” *Lab on a Chip* 11 (5): 775. <https://doi.org/10.1039/c1lc90006d>.
 226. Voivodov, Kamen, Nikolina Stambolieva, and Jaroslava Turkova. 1991. “Comparative Characteristics of Chymotrypsin Covalently Bound on Chemically and Enzymatically Oxidized Agaroses.” *Biotechnology Techniques* 5 (3): 219–22. <https://doi.org/10.1007/BF00152785>.
 227. Walsh, Gary, and Roy Jefferis. 2006. “Post-Translational Modifications in the Context of Therapeutic Proteins.” *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1252>.
 228. Wang, Fang, Rong Li, Hui Jian, Zihao Huang, Yingwu Wang, Zheng Guo, and Renjun Gao. 2020. “Design and Construction of an Effective Expression System with Aldehyde Tag for Site-Specific Enzyme Immobilization.” *Catalysts* 10 (4): 410. <https://doi.org/10.3390/catal10040410>.
 229. Wang, Hengshan, Pingtan Lin, Shulin Zhao, Shuting Li, Xin Lu, and Hong Liang. 2017. “Preparation of Magnetic Microsphere-Gold Nanoparticle-Immobilized Enzyme Batch Reactor and Its Application to Enzyme Inhibitor Screening in Natural Extracts by Capillary Electrophoresis.” *Chinese Journal of Chemistry* 35 (6): 943–48. <https://doi.org/10.1002/cjoc.201600800>.
 230. Wang, Qiong, and Michael J Betenbaugh. 2018. “Metabolic Engineering of CHO Cells to Prepare Glycoproteins.” Edited by Mattheos A.G. Koffas and Robert J. Linhardt. *Emerging Topics in Life Sciences* 2 (3): 433–42. <https://doi.org/10.1042/ETLS20180056>.
 231. Wang, Ye, Eunjung Kim, Yiyang Lin, Nayoung Kim, Worrapong Kit-Anan, Sahana Gopal, Shweta Agarwal, Philip D Howes, and Molly M Stevens. 2019a. “Rolling Circle Transcription-Amplified Hierarchically Structured Organic-Inorganic Hybrid RNA Flowers for Enzyme Immobilization.” *ACS Applied Materials & Interfaces* 11 (26): 22932–40. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b04663>.
 232. Wang, Yan, Mingming Dong, and Mingliang Ye. 2019b. “A Chemoenzymatic Approach Enables the Site-Specific Conjugation of Recombinant Proteins.” *ELECTROPHORESIS* 40 (16–17, SI): 2125–28. <https://doi.org/10.1002/elps.201800528>.

233. Wegner, Seraphine V., Franziska C. Schenk, and Joachim P. Spatz. 2016. "Cobalt(III)-Mediated Permanent and Stable Immobilization of Histidine-Tagged Proteins on NTA-Functionalized Surfaces." *Chemistry - A European Journal* 22 (9): 3156–62. <https://doi.org/10.1002/chem.201504465>.
234. Weiping, Qian, Xu Bin, Wu Lei, Wang Chunxiao, Yao Danfeng, Yu Fang, Yuan Chunwei, and Wei Yu. 1999. "Controlled Site-Directed Assembly of Antibodies by Their Oligosaccharide Moieties onto APTES Derivatized Surfaces." *Journal of Colloid and Interface Science* 214 (1): 16–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jcis.1999.6151>.
235. Whitesides, George M, Emanuele Ostuni, Shuichi Takayama, Xingyu Jiang, and Donald E Ingber. 2001. "Soft Lithography in Biology and Biochemistry." *Annual Review of Biomedical Engineering* 3 (1): 335–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.3.1.335>.
236. Wong, Dana E., Minhui Dai, Joey N. Talbert, Sam R. Nugen, and Julie M. Goddard. 2014. "Biocatalytic Polymer Nanofibers for Stabilization and Delivery of Enzymes." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 110: 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.09.007>.
237. Wouters, Bert, Irena Dapic, Thalassa S.E. Valkenburg, Sam Wouters, Leon Niezen, Sebastiaan Eeltink, Garry L. Corthals, and Peter J. Schoenmakers. 2017. "A Cyclic-Olefin-Copolymer Microfluidic Immobilized-Enzyme Reactor for Rapid Digestion of Proteins from Dried Blood Spots." *Journal of Chromatography A* 1491 (March): 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.078>.
238. Wu, N., Liu, Y., & Lee, M. L. (2006). Sub-2µm porous and nonporous particles for fast separation in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1131(1–2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.042>
239. Wu, Hsin Yi, and Pao Chi Liao. 2008. "Analysis of Protein Phosphorylation Using Mass Spectrometry." *Chang Gung Medical Journal* 31 (3): 217–27. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18782944/>.
240. Wu, Tsung-Ta, Sung-Chyr Lin, and Je-Fu Shaw. 2013. "Enzymatic Processes for the Purification of Trehalose." *Biotechnology Progress* 29 (1): 83–90. <https://doi.org/10.1002/btpr.1669>.
241. Wu, Xia, Keith Fraser, Jian Zha, and Jonathan S Dordick. 2018. "Flexible Peptide Linkers Enhance the Antimicrobial Activity of Surface-Immobilized Bacteriolytic Enzymes." *ACS Applied Materials & Interfaces* 10 (43): 36746–56. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14411>.
242. Xiao, Jingyuan, Qingbiao Lu, Hailin Cong, Youqing Shen, and Bing Yu. 2021. "Microporous Poly(Glycidyl Methacrylate- Co -Ethylene Glycol Dimethyl Acrylate) Microspheres: Synthesis, Functionalization and Applications." *Polymer Chemistry* 12 (42): 6050–70. <https://doi.org/10.1039/D1PY00834J>.
243. Yamaguchi, Hiroshi, Yuhei Kiyota, and Masaya Miyazaki. 2018. "Techniques for Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates and Their Applications in Bioconversions." *Catalysts* 8 (5). <https://doi.org/10.3390/catal8050174>.
244. Yan, Yue, Jie Fu, Tianfu Wang, and Xiuyang Lu. 2017. "Controlled Release of Silyl Ether Camptothecin from Thiol-Ene Click Chemistry-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles." *Acta Biomaterialia* 51: 471–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.062>.
245. Yaohua, Gu, Xue Ping, Jia Feng, and Shi Keren. 2019. "Co-Immobilization of Laccase and ABTS onto Novel Dual-Functionalized Cellulose Beads for Highly Improved Biodegradation of Indole." *Journal of Hazardous Materials* 365 (March): 118–24. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.076>.
246. Yousefi, Maryam, Marzia Marciello, Jose Manuel Guisan, Gloria Fernandez-Lorente, Mehdi Mohammadi, and Marco Filice. 2020. "Fine Modulation of the Catalytic Properties of Rhizomucor Miehei Lipase Driven by Different Immobilization Strategies for the Selective Hydrolysis of Fish Oil." *MOLECULES* 25 (3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030545>.
247. Yu, Chia-Cherng, Jung-Jhih Chang, Yen-Hsien Lee, Yu-Cheng Lin, Meng-Hsiu Wu, Ming-Chien Yang, and Chiang-Ting Chien. 2013. "Electrospun Scaffolds Composing of Alginate, Chitosan, Collagen and Hydroxyapatite for Applying in Bone Tissue Engineering." *Materials Letters* 93 (February): 133–36. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.11.040>.
248. Yu, Xiaoling, Junzhu Xiao, and Fuquan Dang. 2015. "Surface Modification of Poly(Dimethylsiloxane) Using Ionic Complementary Peptides to Minimize Nonspecific Protein Adsorption." *Langmuir* 31 (21): 5891–98. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01085>.
249. Zatloukalová, Eva, and Zdenka Kučerová. 2004. "Separation of Cobalt Binding Proteins by Immobilized Metal Affinity Chromatography." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 808 (1): 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.03.066>.

250. Zdarta, Jakub, Katarzyna Anteck, Artur Jędrzak, Karol Synoradzki, Magdalena Łuczak, and Teofil Jesionowski. 2018. "Biopolymers Conjugated with Magnetite as Support Materials for Trypsin Immobilization and Protein Digestion." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 169 (September): 118–25. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.018>.
251. Zhang, Shen, Huiming Yuan, Baofeng Zhao, Lihua Zhang, and Yukui Zhang. 2018. "Integrated Platform with Combination of On-Line Protein Digestion, Isotope Dimethyl Labeling and Multidimensional Peptide Separation for High-Throughput Proteome Quantification." *Analytica Chimica Acta* 1000: 172–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.023>.
252. Zhang, Wen, Wenbo Ye, Yajun Wang, and Yunfeng Yan. 2022. "Microfluidic Fabrication of Tunable Alginate-based Microfibers for the Stable Immobilization of Enzymes." *Biotechnology Journal* 17 (9): 2200098. <https://doi.org/10.1002/biot.202200098>.
253. Zhao, Yongfeng, Yan Liu, Ilkeun Lee, Yang Song, Xiangdong Qin, Francisco Zaera, and Jiayu Liao. 2012. "Chemoselective Fabrication of High Density Peptide Microarray by Hetero-Bifunctional Tetra(Ethylene Glycol) Linker for Click Chemistry Conjugation." *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A* 100A (1): 103–10. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33214>.
254. Zhijiang, Cai, Xiong Ping, He Shiqi, and Zhu Cong. 2019. "Soy Protein Nanoparticles Modified Bacterial Cellulose Electrospun Nanofiber Membrane Scaffold by Ultrasound-Induced Self-Assembly Technique: Characterization and Cytocompatibility." *Cellulose* 26 (10): 6133–50. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02513-x>.
255. Zhou, Fanlin, Shudong He, Hanju Sun, Yongfei Wang, and Yi Zhang. 2021. "Advances in Epitope Mapping Technologies for Food Protein Allergens: A Review." *Trends in Food Science & Technology* 107 (January): 226–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.035>.
256. Zhou, Gui-xiong, Guan-yi Chen, and Bei-bei Yan. 2014. "Biodiesel Production in a Magnetically-Stabilized, Fluidized Bed Reactor with an Immobilized Lipase in Magnetic Chitosan Microspheres." *BIOTECHNOLOGY LETTERS* 36 (1): 63–68. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1336-x>.
257. Zhou, Wenfeng, Xiaohong Zhou, Yuan Rao, Rijia Lin, Lei Ge, Pengpeng Yang, Hongman Zhang, Chenjie Zhu, Hanjie Ying, and Wei Zhuang. 2022. "Stabilizing Biezymatic Cascade Catalysis via Immobilization in ZIF-8/GO Composites Obtained by GO Assisted Co-Growth." *COLLOIDS AND SURFACES B- BIOINTERFACES* 217. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112585>.
258. Zhu, Chao, Junru Zhu, Quyu Duan, Yue Jiang, Hao Yin, Yonglong He, Fu Li, and Xiao-Peng An. 2021. "Exploration of the Lactation Function of Protein Phosphorylation Sites in Goat Mammary Tissues by Phosphoproteome Analysis." *BMC Genomics* 22 (1): 703. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07993-5>.
259. Zlateski, Vladimir, Roland Fuhrer, Fabian M Koehler, Scott Wharry, Martin Zeltner, Wendelin J Stark, Thomas S Moody, and Robert N Grass. 2014. "Efficient Magnetic Recycling of Covalently Attached Enzymes on Carbon-Coated Metallic Nanomagnets." *Bioconjugate Chemistry* 25 (4): 677–84. <https://doi.org/10.1021/bc400476y>.