

Imobilizace enzymů

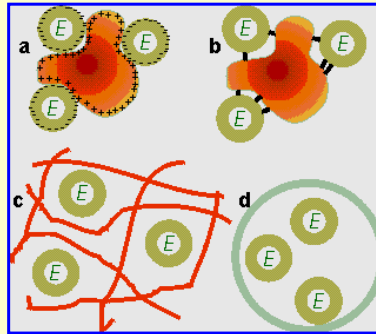
- **enzymy - průmyslové použití**
 - biokatalytické konverse
 - bioanalytické aplikace, enzymové sensory
- **ekonomický aspekt - snížení výrobních nákladů enzymových procesů díky opakovanému použití**
- **dlouhodobá stabilizace enzymové aktivity**
- **snadná separace výsledného produktu**
 - dvoufázový systém, enzym zachycen na heterogenní fázi
 - substrát, produkt volně v roztoku
 - realizace kontinuálně pracujících procesů (enzymové reaktory)
- **nevhodné, pokud je i enzymový substrát nerozpustný**

Ideální nosič enzymu

- **levný, inertní, mechanicky pevný, chemicky stabilní**
- **zachovává nebo zvyšuje specifitu enzymu (dána poměrem k_{cat}/K_m)**
- **snižuje inhibici enzymu produktem**
- **posunuje pH optimum enzymu žádaným směrem**
- **zabraňuje mikrobiální kontaminaci**
- **omezuje nespecifickou adsorpci**

Způsoby imobilizace

- **a** adsorbce
- **b** kovalentní vazba
- **c** zachycení v polymeru, "entrapment"
- **d** zachycení v membránovém váčku, "cofinement"



Volba nosiče

- nízká cena (po zničení enzymové aktivity se vyhodí)
- drahé nosiče - při malém rozsahu procesu, případně pokud je lze použít opakovaně (opakovaná imobilizace enzymu)
- uplatní se forma, tvar, mech. stabilita, hustota, porosita, distribuce velikosti pórů, povrchový náboj (posun pH optima reakce), hustota reaktivních skupin (vazebná kapacita)
- speciální vlastnosti
 - magnetismus
 - rozklad nežádoucích produktů (MnO_2 a peroxid vodíku)
 - povrch s redukčními vlastnostmi (TiO_2)

Geometrické uspořádání

- částice („beads“)
 - definovaná velikost a porosita
- filmové povlaky
 - tenké vrstvy na vhodném neutrálním nosném materiálu
- membrány
 - současně je možné realizovat biokatalytickou reakci a separaci na základě rozdílné velikosti substrátu a produktu
- vláknité materiály
 - vysoký podíl povrchu – velká objemová aktivita
- pěny - zachycení uvnitř (polyurethany)

Struktura

- mikroporesní 0.1 až 10 nm
- mesoporesní 3 až 10 nm – srovnatelné se velikostí enzymů
- makroporesní 8 až 1000 nm, povrch 25 až 100 m^2/g
- neporesní – výborná průtočnost, ale malá kapacita a malý povrch
- gelovitá – nemá stálé póry, ty vznikají až při nabobtnání; obdoba neporesního uspořádání

Adsorpce enzymů na nosič

- jednoduchý, široce použitelný postup – velmi mírné podmínky, zachování aktivity – není kovalentní vazba, není narušení konformace
- reversibilita – jak enzymu (purifikace), tak vlastní matrice – obojí lze regenerovat a použít znovu
- možnost vysokých obsahů (až 1 g enzymu na 1 g nosiče)
- ale slabá interakce – enzymy se mohou postupně spontánně uvolňovat z matrice
- zúčastněné interakce
 - nescifické (van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, hydrofilní interakce): CPG, silikagely
 - biospecifické – přes ligand interagující s enzymem (mimo aktivní místo)
 - interakce s imobilizovanými barvivy nebo ionty kovů
 - iontové interakce (ionexy)
 - hydrofobní interakce: PET, HDPE, polyethylentereftalát, latex (polystyren), poly(ST-DVB), amberlit XAD, silikáty, zeolity, talek
- částečná desolvatace v průběhu vazby na nosič, může docházet ke změnám konformace
 - stabilizace, změny aktivity a specifity katalyzované reakce

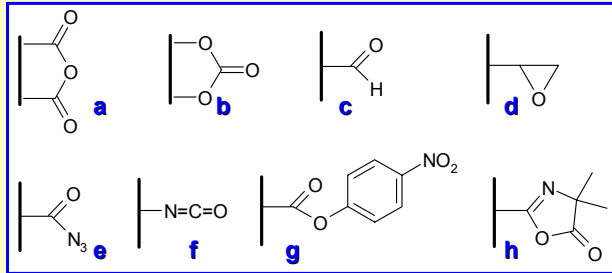
Iontové interakce

- syntetické pryskyřice (SP)
 - kopolymery akrylamidu a kys. maleinové nebo itakonové, fenolformaldehydové kondenzáty
- SP s povrchovými skupinami – Dowex, Amberlit, Duolit
- polysacharidové deriváty – DEAE-celulosa, DEAE-dextran, DEAE-Sephadex, CM-celulosa, CH-Sepharosa, AH-Sepharosa, Q-Sepharosa, S-Sepharosa
 - DEAE ... diethylaminoethyl, CM ... -O-CH₂-COOH, CH ... -NH(CH₂)COOH, AH ... NH-(CH₂)₆-NH₂, Q ... -CH₂-N⁺(CH₃)₃, S ... -CH₂-SO₃H
 - všeobecně velmi hydrofilní materiály, náboj závisí na pH okolního roztoku
- důležitou roli hrají podmínky, zejména pH, při adsorpci

Invertasa	Typ nosiče	
	DEAE-Sephadex (anex)	CM-Sephadex (katex)
% vazby		
pH 2.5	0	100
pH 4.7	100	75
pH 7.0	100	34

Kovalentní immobilizace enzymů

- poresní / neporesní nosiče, vzájemná velikost pórů a molekul enzymu
- povrchová hustota navázaných molekul
- reaktivní skupiny dostupné na speciálních nosičích



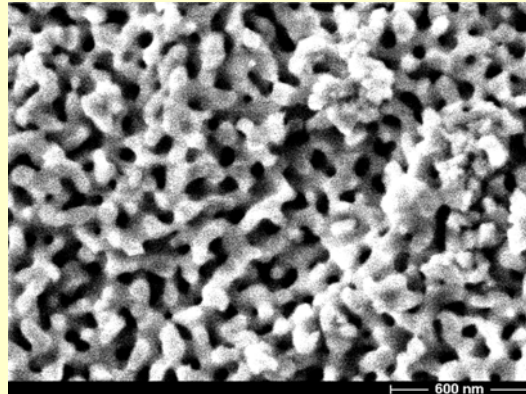
- **a** anhydrid, **b** karbonát, **c** aldehyd, **d** epoxid, **e** azid, **f** isothiokyanát, **g** nitrofenylester karboxylové kyseliny, **h** azlakton
- typické množství 0.02 g enzymu na 1 g nosiče

Silikagel

- "silica", $\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$, voda chemicky vázaná v nestechiometrickém poměru, obsahuje vazby
 - siloxanové (Si-O-Si)
 - silanolové (Si-OH) - aktivují se silanizací
- amorfní struktura, výborná mechanická stabilita - vysoké tlaky
- omezená pH stabilita (mezi 2 a 8), náchylný na nespecifické interakce
- **Porezní sklo** CPG, "controlled pore glass"
- výborné mechanické vlastnosti
 - pro techniky pracující s vysokými tlaky
 - poměrně křehké, při aktivacích raději jemně třepat a nemíchat
 - při výměně roztoků je dobré používat vakuum, aby se odstranily bublinky zachycené v pórech
- příprava - borosilikátové sklo se zahřeje - dojde k separaci borátové a silikátové fáze, boráty se odstraní vylouhováním, vzniknou uniformní póry
 - v alkalické oblasti nad pH 8 se rychle degraduje
- nízká nespecifická adsorpce

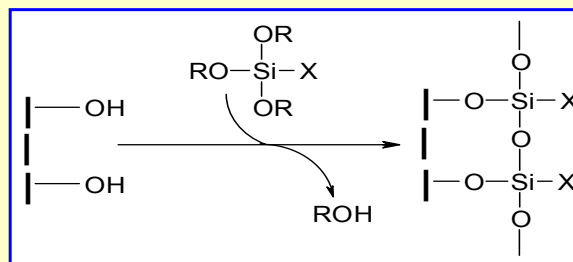
Vlastnosti CPG

Průměr pórů (nm)	Plocha (m ² /g)
7.5	340
17	150
35	75
100	25
200	13
300	9



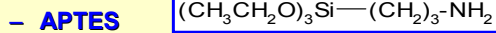
Silanizace

- aktivace inertních povrchů pokrytých vrstvou oxidu (sklo, silikáty, slída, oxidy kovů)
 - v hydratovaném stavu obsahuje hydroxylové skupiny, např. Si-OH, silanolový zbytek
- reakcí se silany vzniká spontánně uspořádaná vrstva
 - obvykle několik vrstev, ne monovrstva
 - nepoužívají se organické halogenované silany (jsou příliš reaktivní a žádná další skupina už by nezbyla), ale méně reaktivní alkoxyderiváty
- silanizací se na povrch modifikovaného nosiče zavedou vhodné reaktivní skupiny X



Silanizační činidla

- aminosilany



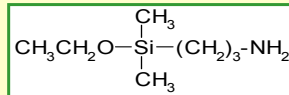
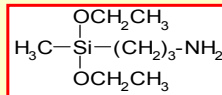
(3-aminopropyl)-triethoxysilan

- **APDEMS**

(3-aminopropyl)-diethoxy-methylsilan

- **APMES**

(3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilan,
monofunkční - vede ke vzniku monovrstvy



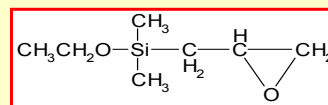
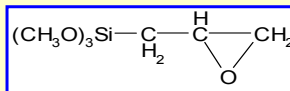
- glycidoxysilany

- **GOPS**

glycidoxypropyl-trimethoxysilan

- **GPMS**

(3-glycidoxypropyl)-dimethyl-ethoxysilan



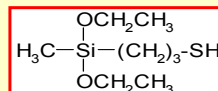
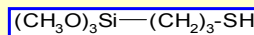
- merkaptosilany

- **MPTS**

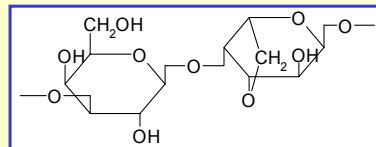
(3-merkaptopropyl)-trimethoxysilan

- **MPDMS**

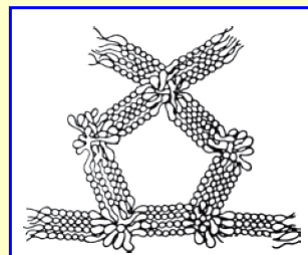
(3-merkaptopropyl)-methyl-dimethoxysilan



Agarosa (Sepharosa)



- polysacharid tvořen z D-galaktosy a 3-anhydrogalaktosy
- poly- $\{\beta\text{-}1,3\text{-D-galaktosa-}\alpha\text{-}1,4\text{-}(3,6\text{-anhydro})\text{-L-galaktosa}\}$
- sekundární a primární struktura je komplexní, vláknitá s přítomnými póry
- přirozená je mechanicky labilní (zahřátím nad 40 °C se rozpouští)
 - modifikuje se zesíťováním pomocí epichlorhydrinu nebo divinylsulfonu
 - ztratí se tím část využitelných hydroxylových skupin
 - zesíťovaná je relativně stabilní (rozpuštědla mísitelná s vodou, pH 3 až 14),
 - neměla by se nechat vyschnout



Sepharosa

- nejběžnější je Sepharosa CL-6B
 - zavedená firmou Pharmacia (Amersham Biosciences, dnes GE Healthcare)
 - CL = „crosslinked“, 6B = 6% „beaded“ agarose
 - póry dostatečné pro biomolekuly do 1 MDa, varianty 2B a 4B do 10 MDa
 - nosič dodávají i firmy BioRad jako Bio-Gel A a IBF jako Ultrogel
- pro aktivaci vhodné metody zaměřené na hydroxylové skupiny

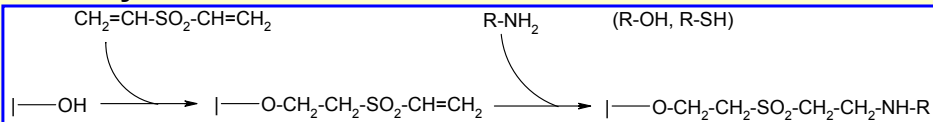
Sepharose	Forma (částice vesměs 90 μm)
High Performance	6% highly cross-linked agarose (34 μm)
6 Fast Flow	6% highly cross-linked agarose
4 Fast Flow	4% highly cross-linked agarose
CL-6B	6% cross-linked agarose
CL-4B	4% cross-linked agarose
6B	6% agarose
4B	4% agarose

Preaktivované Sepharosy

NHS-activated Sepharose High Performance	12-atom. hydrofil. můstek, přes -NH ₂
NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow	viz výše
CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow	vazba primárních -NH ₂ skupin
EAH Sepharose 4B	10-atom. můstek, přes -NH ₂
ECH Sepharose 4B	9-atom. můstek, přes -COOH
Epoxy-activated Sepharose 6B	12-atom. hydrofil. můstek, přes -OH, -NH ₂ nebo -SH skupiny
Activated Thiol Sepharose 4B	10-atom. můstek pro reversibilní vazbu přes volné thioskupiny
Thiopropyl Sepharose 6B	4-atom. hydrofilní pro reversibilní vazbu proteinů a thiolovaných ligandů. Reaguje i s těžkými kovy, alkyl- a arylhalogenidy a dává adiční reakce s C=O, C=C a N=N vazbami

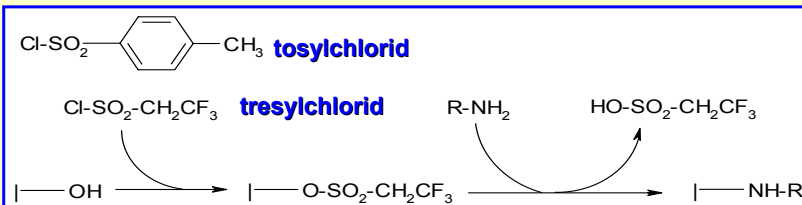
Aktivace -OH v sacharidových maticích

- epoxyskupiny (bisoxiran, epichlorhydrin)
- bromkyanová metoda
- divinylsulfon



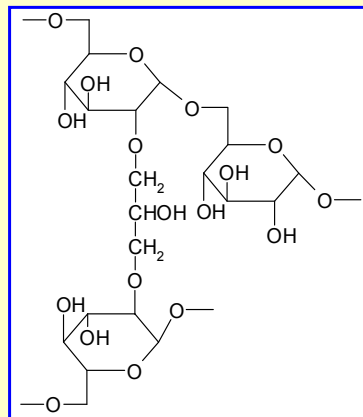
• sulfonylchloridy

- tosylchlorid = *p*-toluensulfonylchlorid
- tresylchlorid = 2,2,2-trifluoethansulfonylchlorid



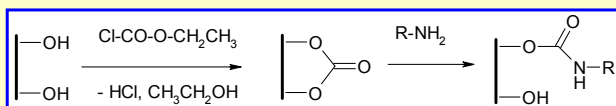
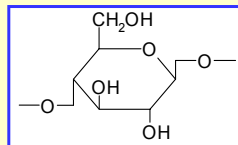
Dextranové nosiče

- materiály Sephadex, Superdex
- glukosové jednotky spojené 1,6 vazbou, větvení i přes 1,2 / 1,3 a 1,4 spoje
- mechanicky málo stabilní
- náchylné na bakteriální degradaci
- glykosidické vazby nestabilní při nízkém pH

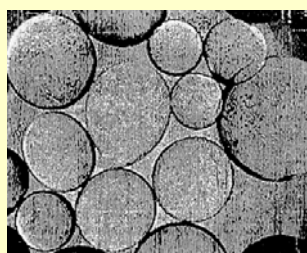


Celulosa

- použití není tak běžné, spíše v průmyslové oblasti
- velmi často se objevuje ve formě membrán
- lineární polymer z 1,4-β-D-glukosových jednotek
- nativní polymer je ve formě vláken bez poretní struktury, reinfornovaná celulosa je ve formě kuliček
- snáší pH 3 až 10, stabilnější je při kyselé oblasti pH, při pH 7 může být autoklávována
- vláknitá celulosa se dodává jako suchý prášek
 - Whatman, BioRad, Schleicher & Schuell
 - v roztoku je náchylná na mechanické poškození (NE magn. míchání)
- aktivace - karbonyldiimidazol a divinylsulfon chloroformiát



- celulosové částice, průměr kolem 450 μm

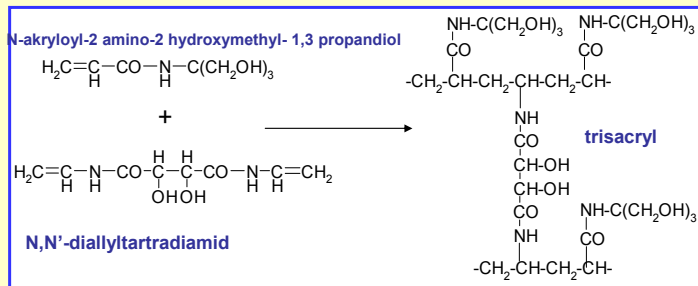


Polyakrylamidové nosiče

- v biochemické oblasti velmi oblíbené
- připravují se kopolymerací akrylamidu a N,N'-metylenbis(akrylamidu), probíhá radikálovým mechanismem v přítomnosti tetramethyldiaminu (TEMED) a peroxodvojsíranu amonného jako iniciátoru
- Bio-Gel P dodává materiál firma BioRad
 - póry poskytují vylučovací limity od 2 do 400 kDa
 - nízké nespecifické vazby
 - dobrá pH stabilita (2 – 10)
- nevýhodou je malá mechanická stabilita
 - variabilita matrice při změně složení pufřů
 - nízké průtočné rychlosti
- aktivace se nejnáz provádí částečnou hydrazinolýzou při 50 °C
 - dostupné jsou i preaktivované materiály (Enzacryl)
- glutaraldehydem - uplatní se adice amidové skupiny na dvojně vazby přítomné v polymerní formě glutaraldehydu.

Trisacryl

- kopolymerace:
- dodává IBF

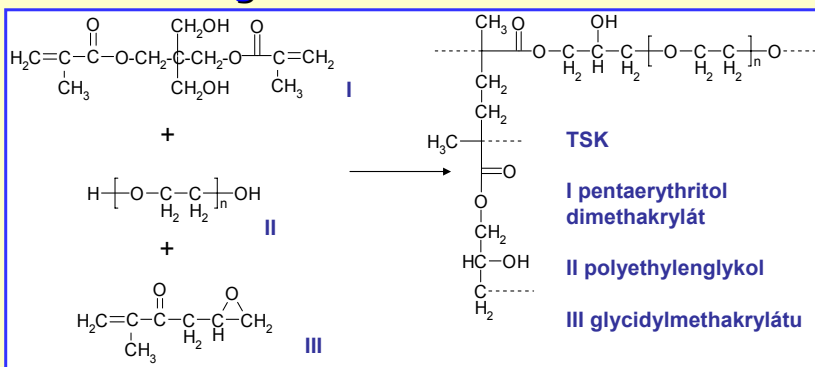


- tris(hydroxymethylové) uskupení poskytuje materiálu výborné hydrofilní vlastnosti
- zesíťovaný charakter přináší zlepšení mechanických vlastností oproti polyakrylamidu
- tolerance pH je od 1 do 11
- snáší zmrazení, teploty do 120 °C a organická rozpouštědla
- aktivace je možná pomocí
 - karbonyldiimidazolu
 - bromkyanu
 - divinylsulfonu

Sephacryl

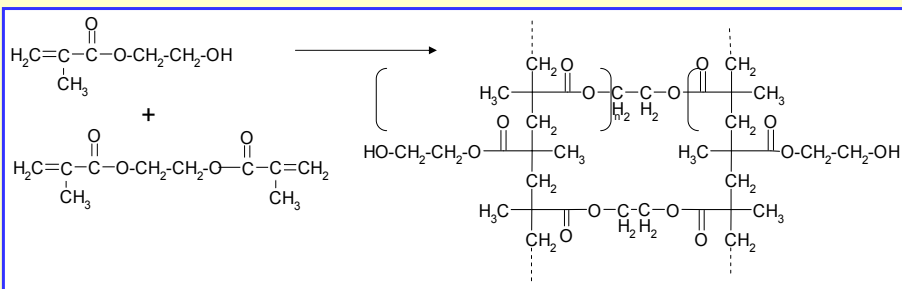
- na bázi dextranového gelu s vnesenými allylovými postranními skupinami zesíťovanými pomocí N,N'-metylen-bis(akrylamidu)
- obsahuje tedy lineární glukosové řetězce spojené přes molekuly bis(akrylamidu) a také lineární části polymerního bis(akrylamidu)
- Sephacryl S-300 a S-400 - vylučovací limity 1,5 a 8 MDa
- gely HR řady - vylepšené průtočné vlastnosti
- materiál je dostatečně chemicky i mechanicky odolný
- aktivace - přes sekundární hydroxylové skupiny

Methakrylátové matrice

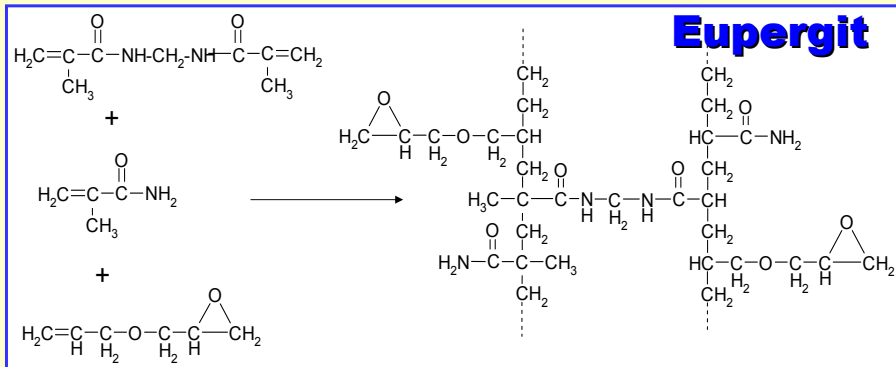


- **TSK-Gel Toyopearl (vyr. Tosoh, distribuce Merck jako Fractogel TSK)**
 - kopolymerace glycidylmethakrylátu, pentaerythritol dimethakrylátu a polyethylenglykolu - velký počet hydroxyků a etherových vazeb
- částečně hydrofilní, výborné mech. vlastnosti, tolerancí pH 2 až 12
- velikosti S („superfine“, 20 až 40 μm), F („fine“, 30 až 60 μm) a C („coarse“, 50 až 100 μm)

HEMA



- poprvé připraven v Československu
 - vzniká kopolymerací 2-hydroxyethylmethakrylátu se síťujícím ethyldimethakrylátem
 - zesíťovaná struktura vytváří makro i mikropóry, které poskytují vysokou odolnost vůči tlaku
- chemická odolnost je pro pH 2 až 12
- tepelná odolnost až do 170 $^\circ\text{C}$
- dodávané velikosti částic jsou 5, 10 a 60 μm
 - v tuzemsku nyní vyrábí firma Tessek, k dispozici i předaktivované matrice s různými reaktivními skupinami



- kopolymerací methakrylamidu, N,N'-metylen-bis(methakrylamidu) a složky s oxiranovou skupinou, glycidymethakrylátu nebo allylglycidyletheru (na obr. dole)
- Rohm Pharma, v USA jako Spectra/Cryl
- porézní částice 30, 150 a 250 μm , neporézní 1 μm , mechanická stab.
- imobilizace probíhá adicí na oxiranové uskupení
 - reagovat mohou primární aminy, sulfhydrylové skupiny či hydroxyly
 - doporučována přítomnost fosfátového pufru, urychlí se tím reakce a může probíhat blízko neutrálního pH

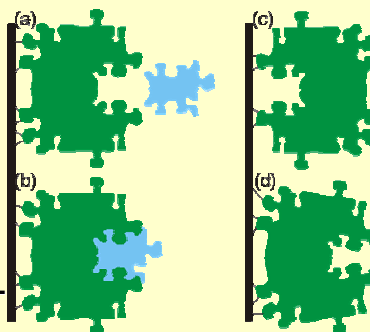
Srovnání reakčních parametrů

Aktivní skupina	Reagující skupiny ligandu	Reakční podmínky
epoxy	- NH ₂ - OH - SH - COOH	pH 5 - 12 doba 4 - 72 hod teplota 4 - 60° C
bromkyan	- NH ₂	pH 7 - 10, doba 1 - 12 hod, teplota 4 - 25° C
divinylsulfon	- NH ₂ - OH - SH	pH 6 - 11, doba 2 - 24 hod teplota 4 - 25° C
tresyl	- NH ₂	pH 7 - 9, doba 2 - 16 hod, teplota 4 - 25° C

Relativní užitečnost aa pro imobilizaci

AA zbytek	Obsah	Dostupnost	Reaktivita	Stabilita spojení	Použití
Asp	+	++	+	+	+
Arg	+	++	-	±	-
Cys	-	±	++	-	-
cystin	+	-	±	±	-
Glu	+	++	+	+	+
His	±	++	+	+	+
Lys	++	++	++	++	++
Met	-	-	±	-	-
Ser	++	+	±	+	±
Thr	++	±	±	+	±
Trp	-	-	-	±	-
Tyr	+	-	+	+ ₋	+
C konec	-	++	+	+	+
N konec	-	++	++	++	+
sacharid. zbytek	- ~ ++	++	+	+	±

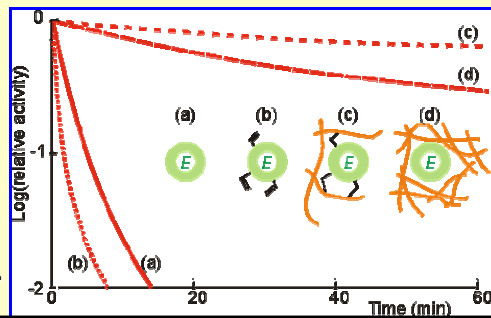
Orientace enzymu



- nesmí dojít (a) ke změně konformace vazebného místa, aby docházelo k optimální vazbě substrátu (b)
- nevhodné je nepřístupné aktivní místo (c) v důsledku sterické zábrany
- méně efektivní až nefunkční může být vazebné místo deformované v důsledku distorse (d)
- v obou případech může pomoci "oddálení" molekuly enzymu od nosiče použitím vhodně dlouhého raménka (spacer, linker, ...)

Zachycení enzymu v polymeru

- může se jednat o čistě fyzikální zachycení na základě velikosti
 - v gelu, zapolymerování uvnitř vhodné matrice
 - kombinace zachycení a kovalentní vazby
 - derivatizace lyzinových zbytků akryloylchloridem $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{Cl}$
 - vzniklý na enzym vázaný akrylamid se pak kopolymerizuje s klasickou směsí akrylamidu a bisakrylamidu
 - vhodné pro imobilizaci "komplexnějších" systémů obsahujících daný enzym (buňky, organely, ...)
 - metoda je vhodná pouze pro enzymy účinkující na nízkomolekulární substráty
-
- stabilita chymotrypsinu
 - v závislosti na způsobu imobilizace
 - volný (a), derivatizovaný akryloyl Cl (b)
 - zachycený v polymethakryl. gelu (d), kombinovaně (c)



Gelové matrice

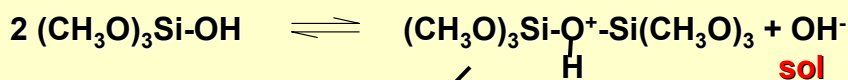
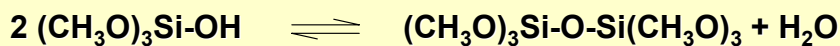
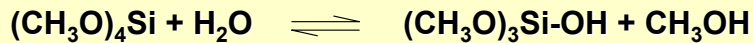
- enzym se zachytí v průběhu přípravy gelu
 - alginát, chitosan, želatina, PAG, PVA plus MNOHO dalších polymerů
- vznikne tak monolitický materiál

- enzym se nechá vsáknout do hotového gelu ve formě kuliček (Sepharsa, Sephadex) a následně se chemicky zesíťuje (glutaraldehydem)
- prosté zesíťování nedává geometricky definované tvary

- "smart" polymery - mění vlastnosti pod vlivem externích vlivů (pH, teplota, iontová síla) a mohou tak cíleně např. uvolnit vázaný enzym do roztoku

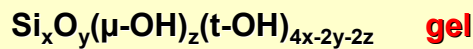
Sol-gel imobilizace

- sol-gel proces – vznik „skla“ hydrolytickou polymerací monomolekulárních prekursorů $(\text{CH}_3\text{O})_4\text{Si}$ tetramethyl-o-křemičitan (TMOS):



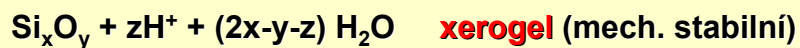
enzym

gelovatění



zachycení v pórech

stárnutí a vysychání



Zachycení v membránových systémech

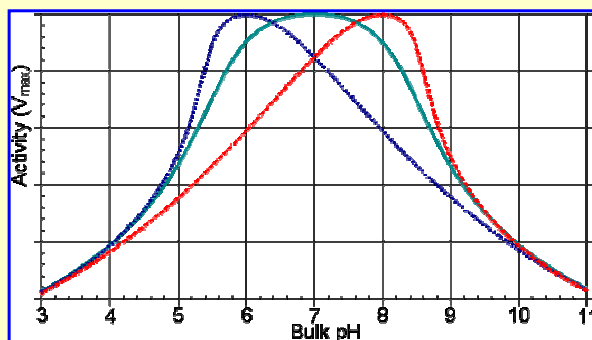
- enzym je od pracovního prostředí oddělen semipermeabilní membránou, průchozí pro substráty a produkty
- membránová dutá vlákna "hollow fiber membranes" obsahují enzym uvnitř, pracovní roztok proudí okolo
 - povrch membrány i více než 20 m²/l
- jednoduché - není třeba nic optimalizovat
- relativně drahé
- membrána může být i ve formě váčků ("droplets")
 - enzym se rozpustí ve vodném roztoku 1,6-diaminohexanu
 - disperguje se v roztoku 1,6-hexandiové kyseliny v chloroformu
 - vzniknou kapičky enzymu obalené tenkou membránou z nylonu (Nylon-6,6)
- je možné použít i liposomy s enzymem uvnitř

Srovnání imobilizačních postupů

Charakteristika	Adsorpce	Kovalentně	Entrapment	Zachycení v membráně
Příprava	snadné	obtížné	obtížné	snadné
Náklady	nízké	vysoké	střední	vysoké
Vazebná síla	různé	silné	slabé	silné
Únik enzymu	ano	ne	ano	ne
Použitelnost	široká	selektivní	široká	univerzální
Pracovní problémy	vysoké	nízké	vysoké	vysoké
Matricové efekty	ano	ano	ano	ne
Velká difúzní bariéra	ne	ne	ano	ano
Ochrana před mikroby	ne	ne	ano	ano

Vliv imobilizace na pH optimum

- náboj nosiče posouvá pH optimum
- důsledek partitice H^+ iontů v mikrookolí enzymu na povrchu nebo v pórech nosiče
- posun pH pracovního roztoku může být výhodný pro zlepšení rozpustnosti substrátu či produktu
- **nativní** enzym v roztoku
- imobilizace na **kladně** nebo **záporně** nabitý nosič

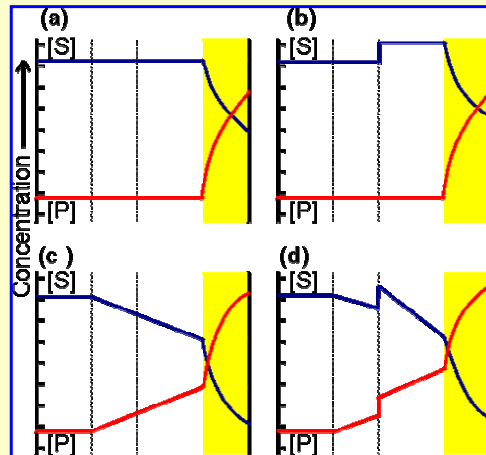


Difúzní vlivy

- substrát se musí dostat z okolního prostředí do aktivního místa
- překonává se nemíchaná vrstva na povrchu nosiče - externí difúze
- poté se pohybuje uvnitř pórů nosiče - interní difúze
- koncentrační gradienty substrátu a produktu v případě poremního nosiče

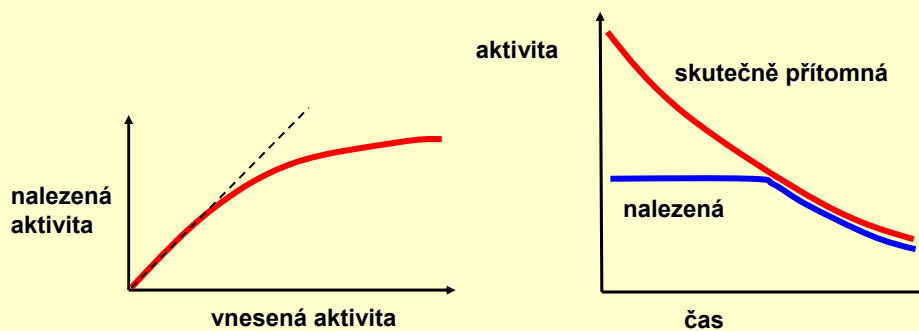
- a pouze reakce a interní difúze
- b navíc partitice S a P v mikro prostředí nosiče
- c jako a, navíc externí difúze
- d kombinace difúzních a partičních efektů

- partiční vrstva je cca 1000x tenčí než difúzní vrstva



Difúzní kontrola enzymové konverze

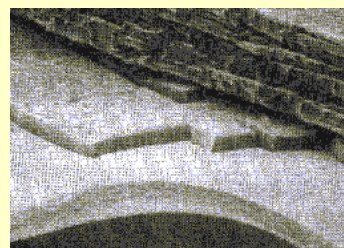
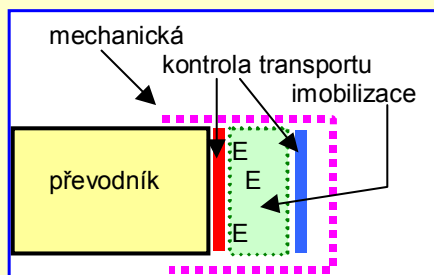
- při imobilizování velkého množství enzymu se jeho aktivita jakoby zdánlivě ztrácí
- efektivní aktivita enzymu na nosiči je mnohem menší než teoreticky navázaná - důsledek difúzních problémů - omezený pohyb substrátu
- pozitivní projev - zdánlivá stabilizace imobilizovaného enzymu



Imobilizace pro enzymové biosensory

- imobilizace enzymu na povrch fyzikálně-chemického převodníku
- využívají se postupy imobilizace zmíněné dříve i další speciální metodiky
- nejčastější jsou enzymové elektrody - kombinace enzymu a elektrochemického převodníku
- enzymové optody (optrody) - analogie, nosičem je ale obvykle světlovod (optické vlákno)

Membrány a biosensory



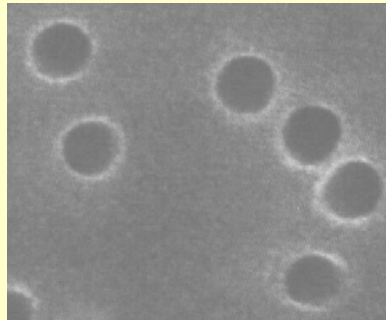
- **membrány v biosensorech plní několik funkcí:**
- imobilizace enzymových molekul – nosná funkce
- řízení transportu látek buď prostřednictvím difúzní kontroly nebo ovlivněním selektivity (antiinterferenční)
- zlepšení mechanické stability
- biokompatibilita

Rozdělení a příprava membrán

- membrána = porézní prostředí, rozdělení:
- **hrubě porézní** - póry nad 5 nm (skelná fritra), permeabilitu ovlivňuje rozdíl hydrostatického tlaku na obou stranách, osmotický tlak se neuplatňuje
- **jemně porézní** - póry 1 až 5 nm (např. acetylcelulosa), rozpouštědlo prochází konvekci a difúzí, permeabilita je dána velikostí rozpuštěných látek
- **neporézní** (husté) - nevykazují porézní strukturu, rozpouštědlo prochází pouze difúzí
- **fázová konverze** - roztok polymeru ve vhodném rozpouštědle se nalije na pevný povrch a vyčká se odpaření rozpouštědla
 - polyvinyl chlorid (tetrahydrofuran - THF), acetylcelulosa (aceton), polyethersulfonát (dimethylsulfoxid) nebo polyurethan (THF, aceton)
- **polymerace** z mono či oligomerů přímo na místě použití (tvorba „in situ“) - vhodná k přípravě fragilních gelovitých membrán (polyvinylalkohol, polyakrylamid), které obsahují velký podíl vody
- **dodatečná tvorba pórů** - tzv. nukleární membrány (Nucleopore)
 - vrstva polymeru se „prostřílí“ urychlenými nukleony, pak se naleptá

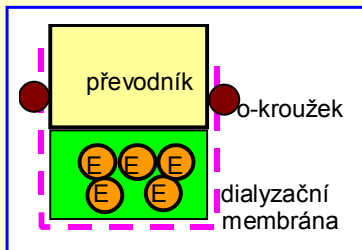
Úpravy membrán

Nucleopore membrána



- velikost pórů membrány lze dodatečně změnit:
- zvětšení průchodnosti se dosáhne naleptáním polymeru membrány, které vede ke zvětšení průměru pórů
 - alkalická hydrolyza acetylcelulosy nebo polykarbonátů
- zmenšení průchodnosti a zlepšení permselectivity se dosáhne depozicí vhodných látek uvnitř pórů
 - např. organosilanů nebo lipidických látek
- symetrické membrány - obě strany jsou rovnocenné, průchodnost oběma směry je stejná
- asymetrické membrány - připravují se na rozhraní dvou fází

Mechanické zachycení enzymu

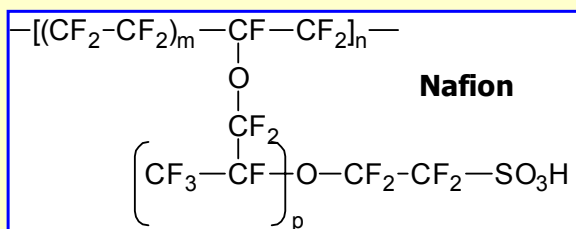


- nejjednodušší - kápne se roztok biokomponenty na povrch převodníku a překryje se dialyzační membránou
- alternativní metodou je zachycení biomolekul uvnitř vhodného polymeru (inkluze), polymerní vrstva se vytvoří na povrchu podpurné dialyzační membrány



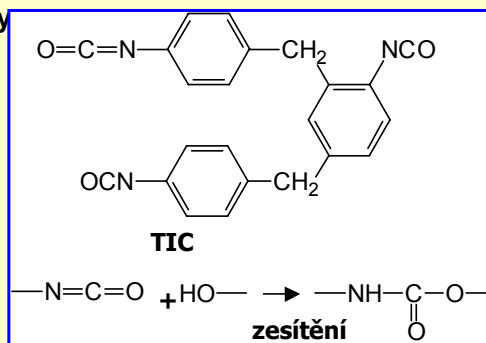
Zachycení v gelu

- **želatina** je často používána pro enzymové membrány; 5% roztok se rozpustí při zvýšené teplotě (až 50 °C) a přidá se enzym, promíchá se a naleje na podložku (např. dialyzační membrána)
- **Nafion** je polymer rozpuštěný ve směsi alkoholů s vodou
 - používá se pro tvorbu permselektivních membrán - jako iontoměnič
 - může zachycovat biomolekuly



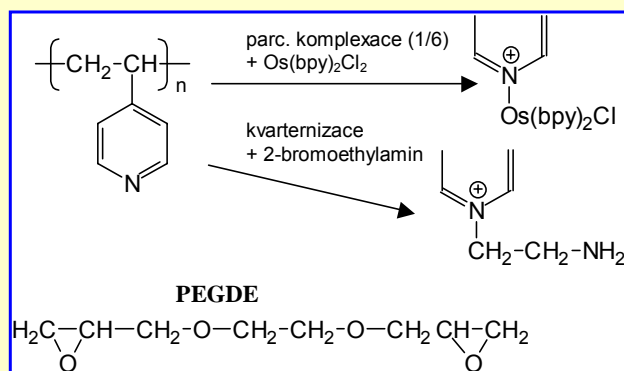
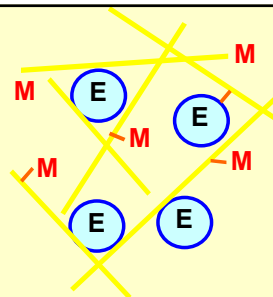
Zachycení v PVA

- polyvinylalkohol je hydrofilní, neutrální a biokompatibilní polymer, ve vodě silně bobtná; dostupný ve formě oligomerů (90 kDa), které po zesíťování vytvoří konečný polymer
- radiční polymerace využívá ozáření směsi oligomerů a enzymu γ-zářením (generuje ^{60}Co)
 - vzniklé radikály vyvolají další polymeraci a zesíťování
 - výsledná membrána neobsahuje žádné nežádoucí produkty a současně je sterilizována
- chemické síťování – triisokyanáty (TIC), spojí postranní hydroxyly
- UV polymerace - PVA obsahující styrylbipyridinové skupiny (PVA-SbQ, 1.3%)
 - vůbec nejšetrnější postup imobilizace pomocí PVA

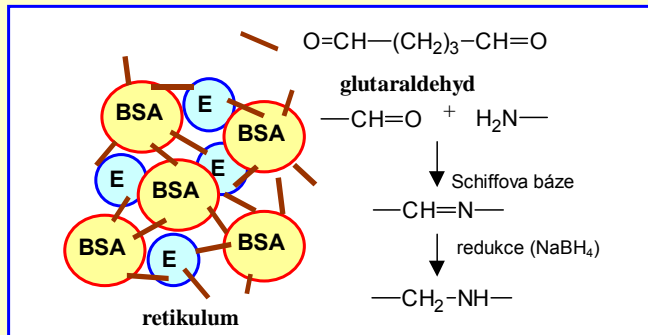


Multifunkční polymery

- kombinují imobilizaci enzymu s polymerní strukturou nesoucí skupiny mediátorů přenášející elektrony, tzv. **redox relays**
- poly-4-vinylpyridin (oligomer kolem 50 kDa) se částečně komplexuje s osmiem (mediátor), a částečně se do něj kvarternizací zavedou aminoskupiny
- směs modifikovaného oligomeru, enzymu a činidla PEGDE (polyethylenglykoldiglycidylether) se nanese na elektrodu



Zesíťování enzymu na povrchu



- zdaleka nejčastěji se používá glutaraldehyd; jeho směs s roztokem bílkoviny v závislosti na koncentraci složek vytváří spontánně retikulum buď přímo na povrchu sensoru, nebo na vhodném podkladovém materiálu (polyamidová síťka, dialyzační membrána)
- reakcí mezi aldehydovou skupinou činidla s aminoskupinou bílkoviny (postranní lyzinové zbytky) vzniká propojením Schiffova báze, která se ještě může zredukovat na stabilnější aminovou vazbu