

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK / REVIEW ARTICLE

METODY IMOBILIZACE MIKROBIÁLNÍCH ENZYMŮ NA PEVNÉ POVRCHY A JEJICH VYUŽITÍ METHODS OF IMMOBILIZATION OF MICROBIAL ENZYMES ON SOLID SURFACES AND THEIR USE

Tomáš Válek, Miroslav Pohanka ✉

Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové,
Česká republika

Přijato 21. září 2021.

Akceptováno 11. října 2021.

Zveřejněno 3. června 2022.

Souhrn

Mikrobiální enzymy jsou používány v širokém spektru průmyslové výroby, ve farmacii, v medicíně, nebo jako součást detekčních metod či biosenzorů, díky nízkým nákladům na produkci za krátkou časovou jednotku. Imobilizace enzymů na pevné povrchy se ukázala jako metoda zlepšující potřebné nároky, jako jsou vyšší efektivita enzymatické reakce v čase, lepší pH a tepelná stabilita, možnost opakovaného použití, snadná separace enzymu a dlouhodobá stabilita. V průmyslu se imobilizace využívá v mnoha procesech výroby potravin, v detergentech a při jejich přípravě, v textilním průmyslu nebo při produkci bio paliv. Ve farmacii jsou imobilizované enzymy součástí výroby léčiv, či jako složka léčiv samotných, v medicíně se imobilizace enzymů využívá k léčbě a diagnostice chorob. Imobilizované enzymy se ukázaly jako vhodná součást detekčních metod, jsou součástí biosenzorů pro stanovení specifických markerů otrav a nemocí nebo se využívají jako detekční zařízení pro stanovení znečištění vod, půd či jako ekologická varianta nahrazující toxické chemikálie. Imobilizace enzymů na pevné povrchy se prosazuje v mnoha oborech a do budoucna v sobě skýtá velký potenciál.

Klíčová slova: enzym; imobilizace; membrána; částice; mikroorganismus

Summary

Microbial enzymes are used in a wide range of industrial production, in pharmacy, medicine or as part of detection methods or biosensors, due to low-cost production in short time. Immobilization of enzymes on solid surfaces has been shown to improve essential requirements, such as higher efficiency of the enzymatic reaction per unit time, better pH and thermo stability, repeated use, easy separation of enzyme and long-term stability. In industry, immobilization is used in food production processes, in detergents and their preparation, in the textile industry or in the production of biofuels. In pharmacy, immobilized enzymes are a part of the production of drugs, or as a part of drugs themselves, in medicine, immobilized enzymes

✉ Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra molekulární patologie a biologie,
Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, Česká Republika
miroslav.pohanka@gmail.com
☎ + 420 973 253 028

are used to treat or diagnosis of diseases. Immobilized enzymes are a suitable part of detection methods, segment of biosensors for the determination of specific markers of poisoning and diseases, also are used for the determination of water and soil pollution or as an ecological variant replacing toxic chemicals. Immobilization of enzymes on solid surfaces is used in many areas and offers great potential for the future.

Key words: enzyme; immobilization; membrane; particle; microorganism

1. Úvod

Látková přeměna je základní vlastností všech živých organismů od nejjednodušších virů a bakterií až po savce (1, 2). Enzymy jsou katalyzátory biochemických reakcí a mají nezastupitelnou roli v buněčném metabolismu (3). Lidstvo využívalo enzymatickou aktivitu již v minulosti při výrobě mléčných výrobků, lihovin, v kožešnictví a dalších procesech. V posledních desetiletích se enzymy začaly hojně využívat v průmyslu, potravinářství, farmacii, medicíně, biotechnologiích a nahrazují chemikálie zatěžující životní prostředí (4, 5). V šedesátých letech minulého století se díky zvyšující poptávce začínají hojně využívat enzymy produkované mikroorganismy, do té doby byly používány enzymy výhradně z rostlinných či živočišných zdrojů (6). Mikroorganismy jsou vhodným zdrojem enzymů vzhledem k nízkým nárokům na vybavení, produkci velkého množství enzymu za krátkou časovou jednotku, snadné genetické manipulaci a specifitě (7). Imobilizace enzymů na mikro či nanomateriály se ukázala jako vhodná metoda pro efektivní a přesnou analýzu vzorků, urychlení výrobních procesů a snížení ekonomických nákladů napříč všemi obory. Velký povrch pro imobilizaci enzymu, vyšší pH a teplotní stabilita, lepší rozpustnost enzymu, a opětovné použití, jsou výhody, z nichž plyne vysoká technologická i ekonomická výhoda pro medicínské, analytické, obchodní i průmyslové využití (8, 9). Imobilizace enzymů na pevné materiály se jeví jako budoucí trend v analýze vzorků, ale i jako metoda nahrazující tradiční způsoby zpracování a výroby (10-15).

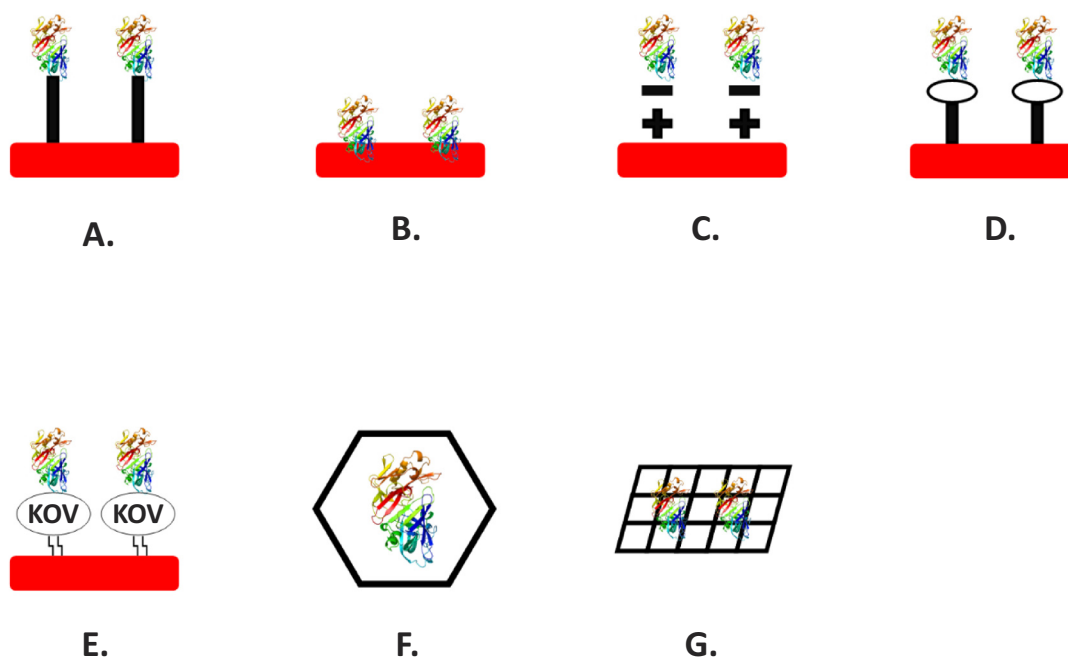
2. Mikrobiální enzymy

Enzymy jsou součástí výrobních procesů již tisíce let. Lidé, byť nevědomky, enzymatickou aktivitu využívali při výrobě mléčných výrobků, alkoholických nápojů, pečiva, octa, masných výrobků, zpracování kůže a v dalších výrobních procesech (16). V posledních padesáti letech, vzhledem k rostoucímu tlaku na snížení výrobních nákladů, na minimalizaci dopadu na životní prostředí a velké produkci za krátkou časovou jednotku, jsou nejhojněji využívány enzymy produkované mikroorganismy (17). Díky genetickému a proteinovému inženýrství lze produkovat a manipulovat mikroorganismy ve velkém množství, aby uspokojily stále se zvyšující poptávku trhu (18). Jako zdroj mikrobiálních enzymů slouží bakterie, kvasinky a houby. Zmínit můžeme například *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Saccharomyces fragilis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Escherichia coli*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas fluorescens* (19). V současnosti se enzymy využívají v biotechnologiích, medicíně, farmacii, zemědělství, v chemickém, potravinářském a kožešnickém průmyslu, energetice, nahrazují toxické chemikálie a používají se ekologická varianta při produkci surovin či koncových produktů (20, 21). Nejčastěji používanými skupinami enzymů napříč všemi odvětvími jsou lipázy, proteázy, laktázy, amylázy, transferázy, izomerázy a oxidoreduktázy (19).

3. Metody imobilizace

Imobilizace enzymů na pevné povrchy se uplatňuje v průmyslu, medicíně, farmacii, biotechnologiích, v analytických metodách a při konstrukci biosenzorů (22). Enzymy lze imobilizovat vratně i nevratně mnoha různými technikami (23). Existuje mnoho variant materiálů sloužících jako vhodné nosiče, mezi nejpoužívanější patří mikro či nanočástice a membrány, na které lze enzymy imobilizovat několika mechanismy (24). Kovalentní vazba je pevné a stabilní přímé spojení enzymu s podpůrným materiálem a lze provádět na polyakrylamid, porézní sklo či oxid křemičitý nebo na agarózu (25). Aktivní uhlí, oxid hlinitý nebo iontoměničová pryskyřice jsou vhodnými materiály, jak imobilizovat enzymy pomocí absorpce, nevýhodou je slabá vazebná síla mezi nosičem a enzymem. Iontové vazby mezi nosičem a enzymem slouží jako imobilizační postup s možností reverzního procesu při změně teploty nebo náboje (26). Afinitní imobilizace mezi matrix a enzymem lze provádět dvěma způsoby: aktivací matrice

nebo modifikací enzymu jinou molekulou schopnou přilnout k matici (27). Imobilizace enzymu pomocí kovových iontů přilnutých na povrch je snadná a rychlá metoda, díky vysokému procentu (30 – 80 %) navázaného enzymu (26, 28). Imobilizace formou enkapsulace je zapouzdření enzymu do polopropustné membrány se specifickými propustnými vlastnostmi (29). Enzymy lze také imobilizovat pomocí zachycení do syntetické nebo přírodní polymerové sítě umožňující produktům a substrátům projít skrz (30). Metody imobilizace enzymů na pevné povrchy jsou znázorněny na obrázku 1.



Obrázek 1. Grafické znázornění imobilizačních metod. A. Kovalentní vazba, B. Absorpce, C. Iontové vazby, D. Afinita, E. Kovové ionty, F. Enkapsulace, G. Zachycení.

3.1. Imobilizace na částice

Enzymy mohou být imobilizovány na částice, jejichž velikost může být v řádech milimetrů až nanometrů (31). Z praktických důvodů se nejvíce používají mikro a nano částice, vzhledem k celkové velikosti povrchu a množství aktivních míst vhodných pro navázání enzymu. Výhodou mikro či nanočástic je díky jejich velikosti, možnost snazšího šíření přes vnitřní překážky prostředí a snadná difúze v roztocích (32). Vyhovující materiály pro výrobu částic jsou oxid křemičitý či uhlíkaté struktury, jako jsou uhlíkaté nanotrubičky či nanotečky (33), zlaté nanočástice (34), nanočástice z oxidu měďnatého (35), grafenové mikro a nanočástice (36), částice z oxidu manganičitého nebo oxidů železa (37). V současné době se zvyšuje zájem o magnetické částice, vzhledem k snadnému oddělení od reakčního systému, schopnosti stabilizovat se na konkrétním místě a nižším ekonomickým nákladům vzhledem k zpětné extrakci a snadnému opětovnému použití (38).

3.2. Imobilizace na membrány

Imobilizaci enzymů lze provádět na membrány z přírodních nebo syntetických materiálů. Obecně platí, že membrána má velký porézní povrch a množství funkčních skupin na povrchu vhodných pro navázání enzymu (39). Problematické mohou být metody, kde dochází k filtraci substrátu přes membránu, která se postupně zanáší (40). Nejčastěji používanými materiály pro výrobu membrán se osvědčili poly(akrylonitril-maleinová kyselina) (41), poly(akrylonitril-2-hydroxyetyl metakrylát) (42), celulózoové membrány (43), nylon (44), polyakrylamid (45), agaróza a její deriváty (46), chitosanové membrány, porézní sklo (47), či sol gel (48).

4. Využití v biotechnologiích

Existuje mnoho biotechnologií, využívajících mikrobiální enzymy imobilizované na podpůrné nosiče. Nese to sebou mnoho výhod, velký aktivní povrch, pH a tepelná stabilita, možnost opětovného použití nebo lepší rozpustnost v substrátu (39). Nevýhodou pak je klesající citlivost s opakujícím se použitím, vymývání enzymu z povrchu, opotřebení enzymů nebo náročnost procesu imobilizace (23).

4.1. Průmysl

Běžnou součástí průmyslové výroby mnoha produktů jsou procesy využívající imobilizované enzymy. Výroba glukózo-fruktózoového sirupu je založena na imobilizované D-glukózo/xyulózo izomeráze na bentonitový jíl nebo oxid křemičitý (49). Beta-galaktosidáza imobilizovaná na styrene-divinylbenzenové kuličky se uplatňuje při výrobě tagatózy, sladidla nahrazujícího cukr (50). Pro komerční výrobu olejů a tuků s požadovanými fyzikálními vlastnostmi a eliminací hydrogenovaných trans-tuků, způsobujících vážné zdravotní problémy, se používá 1, 3 selektivní lipáza (EC 3.1.1.3) (51). Imobilizovaná beta-galaktosidáza z *Escherichia coli* na polyakrylamidový gel štěpí laktózu na glukózu a galaktózu a je používána v mlékárenském průmyslu k odstranění laktózy z mléčných produktů. Díky tomu se mléčné výrobky zpřístupnily i lidem s laktózovou intolerancí nebo alergií na laktózu (52). Chirální aminy se uplatňují jako enantioselektivní katalyzátory v organických reakcích, používají se jako chirální podpůrné prostředky, rozlišovací činidla a stavební bloky. Výrobu syntetickými činidly nahradil průtokový reaktor s imobilizovanou lipázou z *Candida antarctica* (CalB) pomocí absorpce na methakrylát/divinylbenzenový kopolymer (53). Aminoacyláza z *Aspergillus oryzae* (EC 3.5.1.14) je využívána k separaci racemických směsí aminokyselin. Enzym je imobilizován pomocí absorpce do aniontoměničové pryskyřice s funkčním poločasem 65 dní a může být reaktivován pouhým přidáním nového enzymu (54). Imobilizovaná α -amyláza na nanočástice oxidu křemičitého byla použita jako součást detergentů pro odstranění škrobových skvrn s vyšší účinností čištění, pH a teplotní stabilitou (55). Lipáza z *Pseudomonas fluorescens* imobilizovaná na polypropylen pomocí absorpce byla použita pro výrobu metanolu z řepkového oleje, potřebného pro výrobu biopaliv (56). Využití imobilizovaných enzymů v průmyslu je znázorněno v tabulce 1.

Tabulka 1. Výčet průmyslového využití imobilizovaných enzymů na pevné povrchy.

enzym	nosič	využití
D-glukózo/xyulózo isomeráza	bentonitový jíl nebo oxid křemičitý	Výroba glukózo-fruktózoového sirupu
beta-galaktosidáza	styrene-divinylbenzenové kuličky	výroba tagatózy
beta-galactosidáza z <i>E. Coli</i>	polyakrylamid gel	odstranění laktózy
lipáza z CalB	methacrylát/divinylbenzenový kopolymer	produkce chirálních aminů
aminoacyláza z <i>Aspergillus oryzae</i>	aniontoměničová pryskyřice	separace racemických směsí
α -amyláza	nanočástice oxidu křemičitého	součást detergentů
lipáza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	polypropylen	výroba metanolu pro biopaliva

4.2. Zdravotnictví a farmacie

Ve farmaceutickém průmyslu mají imobilizované enzymy vysokou stálost a vykazují větší odolnost vůči organickým rozpouštědlům a jsou součástí léčiv nebo se uplatňují při jejich výrobě (57). V medicíně se využití při diagnostice patologických stavů a jsou klíčovými léčebnými prostředky mnoha nemocí (58). Při léčbě osteoporózy nebo kostních metastáz se používá lék Odanacatib, při jehož výrobě se využívá imobilizovaná CalB na oktadecyl-metakrylátovou pryskyřici (59, 60). Kovalentní vazbou imobilizovaná penicilin G amidáza na epoxy nebo amino metakrylátový polymer se využívá při výrobě penicilínu pro získání 6-kyseliny aminopenicilanové (6-APA) (61). Sitagliptin je perorální antidiabetikum, při jehož produkci je používána R-selektivní amin transamináza imobilizovaná pomocí absorpce na oktadecyl-metakrylátovou pryskyřici (62). U pacientů trpících cystickou fibrózou nebo exokrinní pankreatickou insuficiencí může díky malabsorpci tuků docházet k nedostatečnému

kalorickému příjmu a nedostatku mastných kyselin důležitých pro růst a vývoj (63). Enterální výživa pomáhá zvýšit kalorický příjem, kovalentně imobilizovaná lipáza (EC 3.1.1.3) na metakrylových polymerních částicích, je součástí jednorázové kazety, která je kompatibilní se setem pro enterální výživu a napomáhá tak trávení tuků (64). Zvýšená hladina močoviny v krvi je hlavním problémem u pacientů trpících selháním ledvin, proto mají mobilní dialyzační přístroje zabudovaný selektivní kationtový měnič, jehož součástí je ureáza štěpící ureu na amoniak a oxid uhličitý imobilizovaná na hlinitokřemičitan, křemičitan zirkoničitý nebo pryskyřice (65). Imobilizovaná butyrylcholinesteráza na etylendiaminové disky byla použita jako vhodný prostředek pro zmírnění průběhu Alzheimerovy choroby, myastemie či otrav nervovými plyny (66). Křenová peroxidáza imobilizovaná na porézní oxid křemičitý se ukázala jako vhodná forma v terapeutických lécích proti rakovině (67). Přehled využití imobilizovaných enzymů ve zdravotnictví je v tabulce 2.

Tabulka 2. Výčet využití imobilizovaných enzymů na pevné povrchy ve zdravotnictví a farmacii.

enzym	nosič	využití
lipázou z CalB	oktadecyl-metakrylátová pryskyřice	výroba léku Olanecatib
penicilin G amidáza	epoxy or amino methakrylate polymer	výroba penicilínu
R-selektivní amin transamináza	oktadecyl-metakrylátová pryskyřice	výroba Sitagliptin
lipáza (EC 3.1.1.3)	metakrylové polymerní částice	součást kazety pro enterální výživu
ureáza	hlinitokřemičitan, křemičitan zirkoničitý, pryskyřice	součást dialyzačních přístrojů
butyrylcholinesteráza	etylendiaminové disky	léčka Alzheimerovy choroby a otrav
křenová peroxidáza	porézní oxid křemičitý	terapeutické léky proti rakovině

4.3. Biosenzory a analytické využití

Biosenzory a analytické metody využívající imobilizované enzymy se uplatňují v medicíně, průmyslu, ekologii, v diagnostice a všude, kde je třeba stanovit hledaný marker (68). Včasná diagnóza nemocí, otrav a patologických stavů, je zásadní pro další postup v léčbě (69). Léčba pacientů trpících Alzheimerovou chorobou, rakovinou prsu, či prostaty nebo diabetem prvního typu je efektivnější v primárních fázích onemocnění (70, 71, 72). Kolorimetrická metoda využívající magnetické mikročástice (Fe_3O_4), jako vhodný nosič pro proteázu (*Bacillus licheniformis*), byla použita ke stanovení proteinů (9). Amperometrický biosenzor za pomoci imobilizované acetylcholinesterázy (AChE) na uhlíkaté nanotrubičky byl vyvinut pro detekci organofosfátů (73). Biosenzor pro kolorimetrické stanovení redukováného glutationu za použití jaterního homogenátu, který obsahoval enzym glutation-S-transferázu imobilizovanou na sol-gelovou membránu, byl popsán v práci Martinkové a kolektivu (74). Pro detekci aflatoxinu B1 produkovaného plísní byla použita spektrofotometrická metoda založená na inhibici AChE imobilizované na polystyrenových mikrodestičkách (75). Biosenzor na principu iontové senzitivního tranzistoru s efektem pole

Tabulka 3. Výčet využití imobilizovaných enzymů na pevné povrchy v analytických metodách a biosenzorech.

enzym	nosič	využití
proteáza (<i>Bacillus licheniformis</i>)	magnetické mikročástice	stanovení proteinů
acetylcholinesteráza	uhlíkaté nanotrubičky	detekce organofosfátů
glutathion-S-transferáza	sol-gel	stanovení redukováného glutathionu
acetylcholinesteráza	polystyrenových mikrodestičkách	detekci aflatoxinu B1
ureáza	polymeru tuhnoucího pod UV zářením	detekce močoviny
glukóza oxidáza	polyanilinového filmu	stanovení krevní glukózy
D-fruktóza dehydrogenáza	pastu obsahující karbonové nanotyčky	detekce fruktózy
křenová peroxidáza	chitosanovou membrána	stanovení peroxidu vodíku

za použití polymeru tuhnoucího pod UV zářením (tekutá směs vinylpyrrolidonu, oligourethan metakrylátu a oligocarbonát metakrylátu) s imobilizovanou ureázou byl použit pro detekci močoviny (76). Amperometrická metoda pro stanovení krevní glukózy využívající imobilizovanou glukózo oxidázu na povrchu polyanilinového filmu za pomoci kovalentních vazeb byla představena v práci Li a kolektivu (77). Amperometrický biosenzor používající pastu obsahující karbonové nanotyčky s imobilizovanou D-fruktózo dehydrogenázou nanesenou na povrch elektrody byl použit pro detekci fruktózy (78). Při otravách, jako vedlejší produkt, často vzniká peroxid vodíku. Křenová peroxidáza imobilizovaná na chitosanovou membránu byla použita při konstrukci voltametrického biosenzoru pro stanovení peroxidu vodíku (79). Využití v biosenzorech a analytických metodách je shrnuto v tabulce 3.

5. Závěr

Imobilizované enzymy na pevné povrchy jsou důležitou součástí průmyslové výroby, mají široké využití ve farmacii a medicíně a slouží jako součást analytických zařízení. Imobilizace se ukázala jako vhodná metoda pro zlepšení potřebných parametrů v daném odvětví. Výhodami jsou velká plocha dostupná pro navázání enzymu, cílené či kontrolované místo enzymatické reakce, možnost snadné separace, opakované použití, vyšší pH a termová stabilita, možnost snadného skladování. V současné době existuje mnoho způsobů imobilizace na široké spektrum materiálů sloužících jako nosiče. Díky tomu je možné velmi efektivně nastavit potřebné parametry tak, aby ideálně vyhovovali požadavkům. Biotechnologie se v současnosti hojně využívají a do budoucna mají velký potenciál pro širší zařazení. Imobilizace se ukázala jako forma, která zefektivňuje proces výroby, snižuje finanční náklady, zlepšuje analytické parametry a mikro a nano částice slouží jako nosiče účinných látek. Biotechnologie a procesy je využívající, nahrazují tradiční metody výroby a zpracování používající toxické či nebezpečné chemikálie, nedochází tak ke znečišťování a není zapotřebí nákladné výroby chemikálií.

Funding

A long-term organization development plan DZRO ZHN is gratefully acknowledged.

Acknowledgement

N/A

Adherence to Ethical Standards

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest regarding the publication of this article.

References

1. Alagarsamy S, Larroche C, Pandey A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technology and Biotechnology*. 2006;44.
2. Valek T, Kostelník A, Valkova P, et al. Indoxyl Acetate as a Substrate for Analysis of Lipase Activity. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2019;2019:1-7.
3. Rocchitta G, Spanu A, Babudieri S, et al. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors (Basel)*. 2016;16(6):780.
4. Nahar S, Mizan M, Ha A, et al. Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018;17.
5. van Beilen JB, Li Z. Enzyme technology: an overview. *Current opinion in biotechnology*. 2002;13(4):338-44.
6. Kavanaugh D, Berge MA, Rosenthal GA. A higher plant enzyme exhibiting broad acceptance of stereoisomers. *Plant physiology*. 1990;94(1):67-70.
7. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21491-4.

8. Homaei AA, Sariri R, Vianello F, et al. Enzyme immobilization: an update. *J Chem Biol.* 2013;6(4):185-205.
9. Valek T, Valkova P, Pohanka M. Colorimetric Method for the Determination of Proteins Using Immobilized Microbial Protease and a Smartphone Camera. *analytical letters.* 2021;54(6):1023-37.
10. Shuai W, Das RK, Naghdi M, et al. A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. *Biotechnology and applied biochemistry.* 2017;64(4):496-508.
11. Khan A, Alzohairy M. Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review. *Research Journal of Biological Sciences.* 2010;5:565-75.
12. Soares J, Moreira P, Queiroga A, et al. Application of immobilized enzyme technologies for the textile industry: A review. *Biocatalysis and Biotransformation.* 2011;29:223-37.
13. Ansari SA, Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology advances.* 2012;30(3):512-23.
14. Boudrant J, Woodley J, Fernandez-Lafuente R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry.* 2019;90.
15. Patel SK, Choi SH, Kang YC, et al. Eco-Friendly Composite of Fe(3)O(4)-Reduced Graphene Oxide Particles for Efficient Enzyme Immobilization. *ACS applied materials & interfaces.* 2017;9(3):2213-22.
16. Valek T, Kostelnik A, Valkova P, et al. Indoxyl Acetate as a Substrate for Analysis of Lipase Activity. *International Journal of Analytical Chemistry.* 2019;2019:8538340.
17. Koivistoinen OM, Kuivanen J, Barth D, et al. Glycolic acid production in the engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Microbial cell factories.* 2013;12:82.
18. Liu L, Yang H, Shin HD, et al. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. *Bioengineered.* 2013;4(4):212-23.
19. Al-Maqtari Q, Al-Ansi W, Mahdi A. Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry -A review. 2019;8:62-82.
20. Li S, Yang X, Yang S, et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput Struct Biotechnol J.* 2012;2:e201209017-e.
21. Choi JM, Han SS, Kim HS. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances.* 2015;33(7):1443-54.
22. Jia F, Narasimhan B, Mallapragada S. Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: A review. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(2):209-22.
23. Krishnamoorthi S, Banerjee A, Roychoudhury A. Immobilized enzyme technology: potentiality and prospects. *J Enzymol Metab.* 2015;1.
24. Liu H, Gu C, Xiong W, et al. A sensitive hydrogen peroxide biosensor using ultra-small CuInS₂ nanocrystals as peroxidase mimics. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2015;209:670-6.
25. Wong LS, Thirlway J, Micklefield J. Direct site-selective covalent protein immobilization catalyzed by a phosphopantetheinyl transferase. *Journal of the American Chemical Society.* 2008;130(37):12456-64.
26. S N, Karthick A, Nallathambi G. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Chemical Science Reiew and Letters.* 2012;1:148-55.
27. Andreescu S, Bucur B, Marty J. Affinity Immobilization of Tagged Enzymes. 2008. p. 97-106.
28. Porath J, Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry.* 1983;22(7):1621-30.
29. Montané X, Bajek A, Roszkowski K, et al. Encapsulation for Cancer Therapy. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2020;25(7).
30. Nguyen HH, Kim M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology.* 2017;26:157-63.
31. Biró E, Németh Á, Sisak C, et al. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of biochemical and biophysical methods.* 2008;70:1240-6.
32. Guo Z, Bai S, Sun Y. Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. *Enzyme and Microbial Technology.* 2003;32:776-82.
33. Feng W, Ji P. Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnology advances.* 2011;29(6):889-95.
34. Zhang S, Wang N, Niu Y, et al. Immobilization of glucose oxidase on gold nanoparticles modified Au electrode for the construction of biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2005;109:367-74.
35. Movahedi M, Shariat S, Nazem H. Immobilization of Lactoperoxidase on Graphene Oxide Nanosheets and Copper Oxide Nanoparticles and Evaluation of Their Stability. *Catalysis Letters.* 2019;149.

36. Adeel M, Bilal M, Rasheed T, et al. Graphene and graphene oxide: Functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective. *International journal of biological macromolecules*. 2018;120(Pt B):1430-40.
37. Mani V. The immobilization of glucose oxidase at manganese dioxide particles decorated reduced graphene oxide sheets for the fabrication of glucose biosensor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2014.
38. Raghavendra T, Basak A, Manocha LM, et al. Robust nanobioconjugates of *Candida antarctica* lipase B--multiwalled carbon nanotubes: characterization and application for multiple usages in non-aqueous biocatalysis. *Bioresource technology*. 2013;140:103-10.
39. Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*. 2014;20.
40. Deng L, Guo W, Ngo H, et al. A comparison study on membrane fouling in a sponge-submerged membrane bioreactor and a conventional membrane bioreactor. *Bioresource technology*. 2014;165.
41. Ye P, Xu ZK, Wu J, et al. Nanofibrous poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization. *Biomaterials*. 2006;27(22):4169-76.
42. Huang XJ, Yu AG, Xu ZK. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) electrospun fibrous membranes for potential bioreactor application. *Bioresource technology*. 2008;99(13):5459-65.
43. Wang Y, Hsieh Y-L. Enzyme immobilization to ultra-fine cellulose fibers via Amphiphilic polyethylene glycol spacers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2004;42:4289-99.
44. Bruno L, Pinto G, Castro H, et al. Variables that Affect Immobilization of *Mucor Miehei* Lipase on Nylon Membrane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2004;20:371-5.
45. Amini N, Mazinani S, Ranaei-Siadat SO, et al. Acetylcholinesterase immobilization on polyacrylamide/functionalized multi-walled carbon nanotube nanocomposite nanofibrous membrane. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2013;170(1):91-104.
46. Zucca P, Fernandez-Lafuente R, Sanjust E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2016;21(11).
47. Gul I, Wang Q, Jiang Q, et al. Enzyme immobilization on glass fiber membrane for detection of halogenated compounds. *Anal Biochem*. 2020;609:113971.
48. Martinkova P, Pohanka M. Colorimetric sensor based on bubble wrap and camera phone for glucose determination. *Journal of applied biomedicine*. 2016;14.
49. Crabb WD, Shetty JK. Commodity scale production of sugars from starches. *Current opinion in microbiology*. 1999;2(3):252-6.
50. Garcia-Galan C, Barbosa O, Hernandez K, et al. Evaluation of Styrene-Divinylbenzene Beads as a Support to Immobilize Lipases. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2014;19:7629-45.
51. Chandra P, Enespa, Singh R, et al. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial cell factories*. 2020;19(1):169.
52. Panesar PS, Kumari S, Panesar R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme research*. 2010;2010:473137.
53. Basso A, Serban S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*. 2019;479:110607.
54. Savile C, Janey J, Mundorff E, et al. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science (New York, NY)*. 2010;329:305-9.
55. Soleimani M, Khani A, Najafzadeh K. α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2012;74:1-5.
56. Salis A, Pinna M, Monduzzi M, et al. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*. 2008;54:19.
57. Truppo M. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry – The Need for Speed. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2017;8.
58. Mehrotra P. Biosensors and their applications - A review. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2016;6(2):153-9.
59. Truppo M, Hughes G. Development of an Improved Immobilized CAL-B for the Enzymatic Resolution of a Key Intermediate to Odanacatib. *Organic Process Research & Development*. 2011;15:1033-5.
60. Basso A, Hesseler M, Serban S. Hydrophobic microenvironment optimization for efficient immobilization of lipases on octadecyl functionalised resins. *Tetrahedron*. 2016;72.
61. Kallenberg AI, van Rantwijk F, Sheldon R. Immobilization of Penicillin G Acylase: The Key to Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2005;347:905-26.

62. Truppo M, Strotman H, Hughes G. Development of an Immobilized Transaminase Capable of Operating in Organic Solvent. *ChemCatChem*. 2012;4.
63. Peretti N, Marcil V, Drouin E, Levy E. Mechanisms of lipid malabsorption in Cystic Fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency. *Nutr Metab (Lond)*. 2005;2(1):11.
64. Freedman S, Orenstein D, Black P, et al. Increased Fat Absorption From Enteral Formula Through an In-line Digestive Cartridge in Patients With Cystic Fibrosis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2017;65(1):97-101.
65. Ash SR. Extracorporeal blood detoxification by sorbents in treatment of hepatic encephalopathy. *Advances in renal replacement therapy*. 2002;9(1):3-18.
66. Bartolini M, Greig NH, Yu Q-S, et al. Immobilized butyrylcholinesterase in the characterization of new inhibitors that could ease Alzheimer's disease. *J Chromatogr A*. 2009;1216(13):2730-8.
67. Hung B-Y, Kuthati Y, Kankala RK, et al. Utilization of Enzyme-Immobilized Mesoporous Silica Nanocontainers (IBN-4) in Prodrug-Activated Cancer Theranostics. *Nanomaterials (Basel)*. 2015;5(4):2169-91.
68. Hart J, Serban S, Jones L, et al. Selective and Rapid Biosensor Integrated into a Commercial Hand-Held Instrument for the Measurement of Ammonium Ion in Sewage Effluent. *Analytical Letters*. 2006;39:1657-67.
69. Watson R, Bryant J, Sanson-Fisher R, et al. What is a 'timely' diagnosis? Exploring the preferences of Australian health service consumers regarding when a diagnosis of dementia should be disclosed. *BMC health services research*. 2018;18(1):612.
70. Dubois B, Padovani A, Scheltens P, et al. Timely Diagnosis for Alzheimer's Disease: A Literature Review on Benefits and Challenges. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2016;49(3):617-31.
71. Osuch JR, Bonham VL. The timely diagnosis of breast cancer. Principles of risk management for primary care providers and surgeons. *Cancer*. 1994;74(1 Suppl):271-8.
72. Battaglia M, Nigi L, Dotta F. Towards an Earlier and Timely Diagnosis of Type 1 Diabetes: Is it Time to Change Criteria to Define Disease Onset? *Current diabetes reports*. 2015;15(12):115.
73. Bhatt V, Joshi S, Becherer M, et al. Flexible, Low-Cost Sensor Based on Electrolyte Gated Carbon Nanotube Field Effect Transistor for Organo-Phosphate Detection. *Sensors*. 2017;17:1147.
74. Martinkova P, Vobornikova I, Pohanka M. Colorimetric sol gel based biosensor platform for determination of reduced glutathione. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;236.
75. Pohanka M. Spectrophotometric Assay of Aflatoxin B1 Using Acetylcholinesterase Immobilized on Standard Microplates. *Analytical Letters*. 2013;46.
76. Rebriev AV, Starodub N. Enzymatic Biosensor Based on the ISFET and Photopolymeric Membrane for the Determination of Urea. *Electroanalysis*. 2004;16:1891-5.
77. Li ZF, Kang ET, Neoh KG, et al. Covalent immobilization of glucose oxidase on the surface of polyaniline films graft copolymerized with acrylic acid. *Biomaterials*. 1998;19(1-3):45-53.
78. Antiochia R, Lavagnini I, Magno F. Amperometric Mediated Carbon Nanotube Paste Biosensor for Fructose Determination. *Analytical Letters - ANAL LETT*. 2004;37:1657-69.
79. Martinkova P, Pohanka M. Voltammetric Biosensor Based on a Modified Chitosan Membrane Enzyme Peroxidase. *International journal of electrochemical science*. 2016;11:10391-406.