

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

ŠTÚDIUM LAKTÁZY V IMOBILIZOVANÝCH BUNKÁCH A KULTIVAČNOM MÉDIU *Arabidopsis thaliana*

JÁN STANO^a, KLAUS NEUBERT^c, WERNER ROOS^d, KAROL MIČIETA^e, MARCELA KOREŇOVÁ^a a VÍTAZOSLAVA BLANÁRIKOVÁ^b

^a Záhrada liečivých rastlín, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava,

^b Katedra molekulárnej a subcelulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, ^c Ústav biochémie a biotechnológie, Univerzity Martina Luthera, ul. K. Mothesa 3, 06120 Halle, ^d Ústav farmaceutickej biológie a farmakológie, Oddelenie molekulárnej biológie University Martina Luthera, ul. K. Mothesa 3, 06120 Halle,

^e Katedra botaniky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Révová 39, 811 02 Bratislava
micieta@fns.uniba.sk

Venované Prof. RNDr. Danielovi Grančaiovi CSc. odborníkovi v oblasti farmakognózie z Farmaceutickej fakulty UK v Bratislave pri príležitosti 60. narodenín.

Došlo 16.10.09, prepracované 5.2.10, prijaté 18.2.10.

Kľúčové slová: distribúcia, imobilizácia, permeabilizácia, *Arabidopsis thaliana*, laktáza

Úvod

Je zaujímavé, že sacharidom, ako súčasťou každého živého organizmu a organickej súčasťou početných prírodných látok s dôležitými funkciami v širokom spektre rôznych biologických procesov popri aminokyselinách a nukleových kyselinách sa až v ostatných desaťročiach venuje náležitá pozornosť.

Kvalita potravín je vo veľkej miere podmienená a závislá na kvalite, kvantite, štruktúre a fyzikálno-chemických vlastnostiach sacharidov, peptidov a iných jej zložiek. Biotransformácia niektorých látok hrá dôležitú úlohu v rôznych biotechnologických procesoch^{1–3}. Pri biosyntéze, biotransformácii a štúdiu prírodných látok sa využíva celý rad multifunkčných enzýmových komplexov.

Ukázalo sa, že sacharidy, ako aj ich deriváty a glykozidázy majú dôležitú úlohu v rôznych oblastiach základného a aplikovaného výskumu^{4–6}.

Imobilizácia enzýmov reprezentuje efektívny spôsob ochrany početných biokatalyzátorov, ktoré nachádzajú uplatnenie vo výrobných procesoch. Rastlinné bunky prvýkrát imobilizoval Brodelius⁷. Obaľovanie (enkapsulácia) buniek a enzýmov hydrogélmi patrí medzi veľmi často používané imobilizačné techniky. Spontánnu adhéziu, ako aj kovalentnú väzbu buniek na povrch nosičov popísali Jirků a spol.⁸, Gill a Ballestros⁹. Pri imobilizácii sa nedávno použil polyvinylalkohol¹⁰ a glutaraldehyd¹¹.

Laktáza (β -D-galaktózid galaktohydroláza EC 3.2.1.23), β -galaktózidáza katalyzuje hydrolyzu laktózy na glukózu a galaktózu – štiepi β -(1-4)-0-glykozidickú väzbu. Okrem laktázy možno laktózu hydrolyzovať aj chemicky (kyslou hydrolyzou). Študovaný enzým sa používa aj pri biosyntéze galakto-oligosacharidov a cerebrálnych galaktolipidov¹².

Rozvoj imobilizačných techník, dôkaz a stanovenie aktivity biokatalyzátorov sú závislé na prograse biotechnologických procesov. Hlavnou bariérou transportu početných látok sú membrány buniek, a preto sme pozornosť sústredili aj na ich permeabilizáciu. Predpokladáme, že imobilizované bunky alebo biokatalyzátory rastlinného pôvodu, podobne ako mikrobiálne, môžu v budúcnosti zohrať dôležitú úlohu v biotechnologických procesoch⁷. V predloženej práci sa študoval vplyv permeabilizácie na enzýmovú hydrolyzu laktózy pomocou imobilizovaných buniek *Arabidopsis thaliana*, ako aj distribúcia intra- a extracelulárnej laktázy z testovaných buniek.

Dostupnosť jednoduchej a rýchlej skríningovej metódy detekcie laktázy a tiež imobilizácie študovaného enzýmu, má veľký význam ako pre vedecko-výskumné, tak aj pre priemyselné účely. Pri tejto jednoduchej a rýchlej metóde dôkazu a stanovenia laktázy sa výhodne používajú syntetické substráty: β -naftylamidy, *o*- resp. *p*-nitroanilidy galaktózy.

Experimentálna časť

Rastlinný materiál

Kalusové a suspenzné kultúry arábovky Thalovej [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cv. *Columbia*] sa odvodili z kľúčnych rastlín. Tieto kultúry sa pestovali v kultivačnom médiu podľa Linsmayera a Skooga¹³ s prídavkom 1 mg l⁻¹ kyseliny 2,4-dichlórfenoxiactovej, 0,1 mg l⁻¹ kinetínu a 3% sacharózy, na rotačnej trepačke v priebehu 14 dní podľa Viehwegera a spol.¹⁴.

Permeabilizácia buniek

Bunky pestované v suspenznej kultúre sa jednotlivito

permeabilizovali Tweenom, alkoholom, hexadecyltrimetylamoniumbromidom a hexadecylpyridiniumchloridom nasledovne: po 20 g suspenzne pestovaných buniek sa po odfiltrovaní a premytí 1,5 l 0,15 mol l⁻¹ NaCl permeabilizovalo 70 ml: 5 % Tweenu 20, 5 % Tweenu 80, 30 % etanolu, 50 % etanolu, 0,1 % hexadecyltrimetylamoniumbromidom, 0,1 % hexadecylpyridiniumchloridom resp. 3 hodiny za pomalého miešania (60 rpm) pri laboratórnej teplote. Permeabilizované bunky sa po premytí 3,5 l destilovanej vody a 4 l 0,15 mol l⁻¹ NaCl imobilizovali glutaraldehydom.

Imobilizácia buniek glutaraldehydom

20 g permeabilizovaných buniek sa prenieslo do 70 ml 0,15 mol l⁻¹ NaCl, pomaly sa pridalo 7 ml 25% glutaraldehydu a pri laboratórnej teplote sa za pomalého miešania (60 rpm) imobilizovali 2 hodiny. Imobilizované bunky sa premyli 3,5 l destilovanej vody, 4 l 0,15 mol l⁻¹ NaCl a uchovávali v 0,15 mol l⁻¹ NaCl pri 4 °C.

Stanovenie čerstvej hmotnosti a sušiny

Čerstvá hmotnosť a sušina suspenznej kultúry a imobilizovaných buniek sa stanovili gravimetricky po vysušení do konštantnej hmotnosti pri 105 °C.

Využitie glukózy

Využitie glukózy suspenznými a imobilizovanými bunkami sa sledovalo

60 minút. Bunky suspenzných kultúr a imobilizované bunky sa preniesli do roztoku glukózy 200 mg l⁻¹ v 0,05 mol l⁻¹ Na-fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,0 a úbytok glukózy sa sledoval podľa Trindera¹⁵.

Životaschopnosť buniek

Životaschopnosť buniek sa sledovala podľa Dixon⁶ za použitia trifenylnitrofenylchloridu (TTC), fluoresceín-diacetátu a kyslíkovej elektródy.

Dôkaz a stanovenie intra- a extracelulárnej laktázy

Pri dôkaze a stanovení intra- a extracelulárnej laktázy sa použili syntetické chromogénne substráty β-naftylamid a p-nitroanilid β-D-galaktózy.

Dôkaz extracelulárnej enzýmovej aktivity

Pri dôkaze extracelulárnej laktázy sa použil ako substrát 1-naftyl-β-D-galaktopyranozid. Laktáza enzýmov hydrolyzuje substrát. Uvoľnený 2-naftol po reakcii s hexazotovaným p-rozanilínom alebo Fast Blue BB tvorí korešpondujúce azofarbivo. Extracelulárna laktáza sa identifikovala metódou podľa Lojdu a spol.¹⁷ a Stowarda a Pearsa¹⁸.

10 mg 1-naftyl-β-D-galaktopyranozidu sa rozpustilo v 0,5 ml dimetylformamidu a 10 ml Mc Ilvainovho tlmivého roztoku pH 5,0. Do tohoto roztoku sa pridalo 10 mg Fast Blue BB alebo 10 ml pufrovaného hexazonium p-rozanilínu (9,4 ml Mc Ilvainovho tlmivého roztoku pH 5,0; 0,6 ml roztoku hexazonium p-rozanilínu a tento

roztok sa 0,1 N NaOH upravil na pH 5,0). K tejto zmesi sa pridalo ešte 10 ml 2% agaru v Mc Ilvainovom tlmivom roztoku pH 5,0 a autoklávovalo obvyklým spôsobom¹⁶.

Hexazonium p-rozanilín sa pripravil podľa Lojdu a spol.¹⁷ nasledovne: Roztok A: 400 mg p-rozanilínu sa rozpustilo v 8 ml destilovanej vody a 2 ml HCl. Roztok B: 4% NaNO₂. Roztok A a B sa zmiešali v rovnakých množstvách.

Takto pripravené agarové platne sa inokulovali bunkami kalusových kultúr a sterilne vypestovanými kľúčnymi rastlinami (3–5 dní starých) a inkubovali 20–100 minút.

Stanovenie intra- a extracelulárnej aktivity laktázy

Príprava enzýmu

Intracelulárna aktivita laktázy sa stanovila za použitia buniek suspenznej kultúry. Bunky (10 g) sa odfiltrovali a premyli 3 l destilovanej vody, zhomogenizovali vo vychladenej trecej miske s Mc Ilvainovým tlmivým roztokom pH 4,7 v pomere 1:1 (g ml⁻¹). Homogenát sa prefiltraval cez silikónovú tkaninu, centrifugoval (10 min, 15 000 g pri 4 °C) a použil ako enzýmový preparát.

Pri stanovení extracelulárnej aktivity sa použilo kultivačné médium bez buniek (centrifugácia 10 min, 2000 g, mikroskopická kontrola neprítomnosti buniek). Supernatant sa použil na stanovenie extracelulárnej aktivity enzýmu.

Stanovenie aktivity enzýmu

Aktivita študovaného enzýmu sa stanovila modifikovanou metódou podľa Kim a spol.¹⁹ za použitia p-nitrofenyl-β-D-galaktopyranozidu ako substrátu. Reakčná sústava obsahovala vhodné množstvo enzýmu (0,1–0,3 ml) 3·10⁻³ mol l⁻¹ substrát v 2 ml Mc Ilvainovho tlmivého roztoku pH 4,7. V kontrolných pokusoch bol enzýmový preparát tepelne inaktívovaný (10 min pri 100 °C). Zmes sa inkubovala 15 min pri 30 °C a reakcia sa zastavila pridaním 2 ml 1 mol l⁻¹ Na₂CO₃. Koncentrácia enzýmovo uvoľneného p-nitroanilínu sa stanovila spektrofotometricky pri 405 nm oproti kontrole. Enzýmová aktivita je vyjadrená v kataloch. Obsah bielkovín sa stanovil podľa Doumasa a spol.²⁰ za použitia hovädzieho sérumalbumínu ako štandardnej bielkoviny.

Výsledky a diskusia

Rozvoj imobilizačných techník má veľký vplyv na vývoj biotechnológií. Imobilizácia buniek resp. biokatalyzátorov predstavuje veľmi dôležitý spôsob uchovávaní (stabilizácie) vysokoúčinných biokatalyzátorov (enzýmov), ktoré sú dôležité pre biotransformačné procesy^{7,9,21}.

Enkapsulácia (obaľovanie) buniek resp. enzýmov hydrogélmi prírodného resp. syntetického pôvodu nachádza široké uplatnenie v základnom a aplikovanom výskume, ako aj v priemyselnom meradle⁹. V tejto práci sme

zamerali svoju pozornosť na štúdium permeabilizácie a imobilizačnej techniky pomocou glutaraldehydu (bez použitia nosiča) na aktivitu laktázy v bunkách *Arabidopsis thaliana*.

Pri histochemickom a biochemickom štúdiu hydrolytických enzýmov sa výhodne aplikujú rôzne chromogénne substráty^{10,19}. V predloženej práci sa použili tieto syntetické substráty 1-naftyl- β -D-galaktopyranozid a *p*-nitroanilid- β -D-galaktopyranozid^{15–17}. Inokulá sa ponechali na kultivačných médiách so substrátom a bez substrátu 1–2 h. Rastlinné extracelulárne β -galaktozidázy sa detekovali pomocou červenohnedého zafarbenia, ktoré vzniká simultánnou azokopoláciou hexazotovaného *p*-roznilínu alebo Fast Blue BB resp. a zo substrátu enzýmovovo uvoľneného 2-naftolu. Po inokulácii kultivačného média bez substrátu resp. inaktivovaným kalusom (10 min pri 100 °C) sa žiadne zafarbenie nepozorovalo. Červenohnedé zafarbenie vzniká na mieste kontaktu inokula s kultivačným médiom, v ktorom je prítomný 1-naftyl- β -D-galaktopyranozid a hexazotovaný *p*-roznilín alebo Fast Blue BB.

Po vysadení sterilných klíčnych rastlín na agarové platne s 1-naftyl- β -D-galaktopyranozidom a hexazotovaným *p*-roznilínom resp. bázickým fuksínom sa pozorovali farebné zmeny na koreňku a koreňových vláskoch ako aj na mieste ich kontaktu s platňou. Po inokulácii agarových platní kalusmi s 1-naftyl- β -D-galaktopyranozidom a hexazotovaným *p*-roznilínom resp. bázickým fuksínom sa na mieste kontaktu kalusu s platňou pozorovali farebné zmeny, spôsobené tvorbou azofarbív. Tieto sa tvoria simultánnou azokopoláciou enzýmovovo uvoľneného 2-naftolu s hexazotovaným *p*-roznilínom resp. bázickým fuksínom. V prípade tepelne inaktivovaného rastlinného materiálu (klíčne rastliny resp. kalusy 5 min 100 °C) sa azofarbivo netvorí. Laktáza ako aj iné hydrolázy majú významnú úlohu v metabolizme bunkovej steny a v jej prestavbe^{21–24} v priebehu ontogenézy.

Porovnanie distribúcie intra- (38,8 %) a extracelulárnej (61,2 %) aktivity študovaného enzýmu poukazuje na minoritné zastúpenie intracelulárnej a majoritné zastúpenie extracelulárnej formy laktázy (tab. I).

Tabuľka I

Aktivita laktázy v 10-dňových bunkách suspenznej kultúry a v kultivačnom médiu *Arabidopsis thaliana*

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g ⁻¹ sušiny]	Aktivita [pkat g ⁻¹ sušiny]	Špecifická aktivita [pkat mg ⁻¹ proteínov]
Intracelulárna aktivita (homogenat izolovaných buniek)	1	14,36±0,10	3,70±0,07	0,26
Extracelulárna aktivita (kultivačné medium bez buniek) ^a	10	6,36±0,10	5,83±0,10	0,92

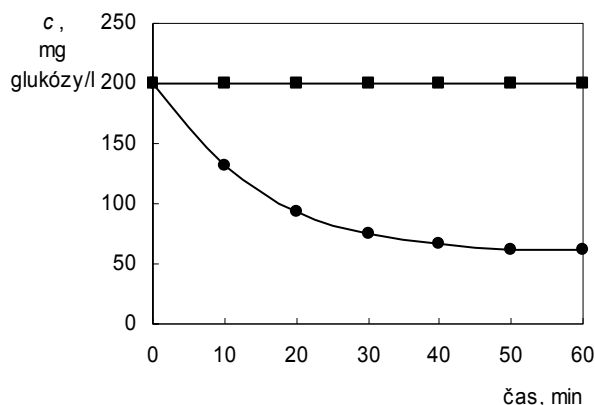
^a Odpovedajúce obsahu izolovaných buniek

Pri imobilizácii *Arabidopsis thaliana* glutaraldehydom sa v porovnaní s bunkami suspenzných kultúr pozorovali niektoré menšie zmeny – mierna plazmolýza a zhlukovanie buniek. U buniek imobilizovaných glutaraldehydom sa pri testovaní s 2,3,5-trifenylnitroazoliumchloridom (TTC), fluoresceindiacetátom a meraní spotreby kyslíka nezaznamenala životaschopnosť (obr. 1).

Permeabilizácia buniek *Arabidopsis thaliana* Tweenom 20, Tweenom 80, etanolom, hexadecyltrimetylamoniumbromidom a hexadecylpyridiniumchloridom vedie k preukaznému poklesu proteínov a miernejšiemu poklesu aktivity enzýmu. Špecifická aktivita študovaného enzýmu sa okrem aplikácie etanolu mierne zvyšuje (tab. II).

Srinivasan a spol.²² zistili, že po permeabilizácii bunkovej steny kvasiniek dochádza k preukaznému zvýšeniu aktivity fenylalanínamoniumlyázy (PAL). Pri permeabilizácii bunkovej steny suspenzných kultúr rastlinných buniek sa také signifikantné zvýšenie enzýmovej aktivity nepozorovalo.

Enzýmová hydrolýza substrátu *p*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranozidu (β PNG) je v priebehu 3,5 h lineárna,



Obr. 1. Časový priebeh využitia glukózy v bunkách *Arabidopsis thaliana* imobilizovaných glutaraldehydom a v bunkách suspenznej kultúry (10 g buniek, 20 ml tlmivého roztoku s glukózou); ■ glutaraldehyd, ● suspenzná kultúra

Tabuľka II

Obsah bielkovín a aktivita laktázy v 10-dňových bunkách *Arabidopsis thaliana* a v bunkách suspenznej kultúry permeabilizovanej 5% Tweenom 20, 5% Tweenom 80, 30% etanolom, 50% etanolom, 0,1% hexadecyltrimetylamóniumbromidom (HTAB), 0,1% hexadecylpyridíniumchloridom (HPCH) v bunkách imobilizovaných glutaraldehydom

Bunky		Proteíny [mg g ⁻¹ sušiny]	Aktivita [pkat g ⁻¹ sušiny]	Špecifická aktivita [pkat mg ⁻¹ proteínov]
Suspenzia		14,40 ± 0,1	3,70 ± 0,01	0,26
Permeabilizované	0,1%HTAB	6,80 ± 0,14	4,05 ± 0,03	0,59
	0,1%HPCH	6,80 ± 0,07	4,05 ± 0,05	0,59
	5% Tween 20	6,80 ± 0,14	4,03 ± 0,03	0,59
	5% Tween 80	6,80 ± 0,18	4,03 ± 0,04	0,59
	30% etanol	6,80 ± 0,18	3,62 ± 0,02	0,53
	50% etanol	6,80 ± 0,18	3,61 ± 0,01	0,53
Imobilizované	0,1%HTAB	6,80 ± 0,18	3,51 ± 0,02	0,52
	0,1%HPCH	6,70 ± 0,07	3,51 ± 0,02	0,52
	5% Tween 20	6,70 ± 0,14	3,52 ± 0,01	0,52
	5% Tween 80	6,70 ± 0,07	3,50 ± 0,01	0,52
	30% etanol	6,70 ± 0,14	3,31 ± 0,01	0,49
	50% etanol	6,70 ± 0,07	3,30 ± 0,01	0,49

dosiahne 60–70% konverzie substrátu a potom sa prakticky zastaví. Výsledky nášho štúdia ukázali, že hodnota optimálneho pH laktázy v kultivačnom médiu a v imobilizovaných bunkách je 4,7. Tepelné optimum študovaného enzýmu imobilizovaných buniek je pri 60 °C a suspenznej kultúry pri 56 °C. Podobné vlastnosti má aj invertáza buniek medovky²³.

Porovnanie distribúcie intra- a extracelulárnej laktázy poukazuje na to, že prevažná časť enzýmu (tab. I) sa na rozdiel od invertázy a aminopeptidázy nachádza v kultivačnom médiu^{23,24}. Špecifická aktivita extracelulárnej laktázy je 4,15 vyššia než intracelulárnej laktázy.

Sacharóza je pravdepodobne najčastejším zdrojom uhlika a energie pri kultivácii pletivových a suspenzných kultúr^{14,26}.

Ako už bolo uvedené, laktáza katalyzuje enzýmovú hydrolyzu laktózy na glukózu a galaktózu. Popri laktáze sa v rastlinách nachádza aj melibiáza a invertáza²³, a preto sme v predloženej práci sledovali vplyv glukózy, fruktózy, melibiózy, rafinózy, stachyózy a sacharózy na aktivitu laktázy v nativných a imobilizovaných bunkách *Arabidopsis thaliana*. Výsledky testov ukázali, že sacharóza a fruktóza aktivitu študovaného enzýmu neovplyvňuje, kým glukóza a stachyóza mierne inhibuje. Miera inhibície galaktózidázy galaktózou, melibiózou a rafinózou je funkciou jej koncentrácie (tab. III).

Hamilton a spol.²⁵ zistili, že pri využití sacharózy rastlinnými pletivovými kultúrami sa sacharóza najskôr enzýmovo transformuje na glukózu a fruktózu. Obsah oboch sacharidov v kultivačnom médiu je v prvých dňoch inokulácie približne rovnaký. V prítomnosti glukózy bunky fruktózu nevyužívajú.

Inhibičný účinok 2-sulfanyletanolu 0,1–0,5 mmol l⁻¹ možno odstrániť pridaním 5–10 mmol l⁻¹ ditiotritolu, čo

poukazuje na to, že –SH skupiny sú pre enzýmovú reakciu nepostrádateľné²⁷.

Bunky imobilizované glutaraldehydom uchovávané v 0,15 mol l⁻¹ NaCl v prítomnosti konzervačných látok (chloramfenikol, chlortetracyklíniumchlorid, (1-metyldodecyl)dimetylamín *N*-oxid²⁸ a azid sodný si v priebehu 6 mesiacov uchovávajú pomerne vysokú enzýmovú aktivitu (tab. IV). Mierne zvýšenie aktivity v priebehu uchovávaní spôsobuje pravdepodobne disociácia inhibítora, ktorý sa na enzým naviazal v priebehu imobilizácie.

Imobilizované bunky možno po vysušení pri laboratórnej teplote uchovávať aj v uzavretých nádobách pri 4 °C, resp. 20 °C. Dehydratované imobilizované bunky sa nechajú pred použitím nabobtnať vo fyziologickom alebo tlmivom roztoku 10–30 min. Aktivita takto stabilizovaného biokatalyzátora (enzýmu) sa periodicky testovala (každé 2 týždne) v priebehu 6 mesiacov. Po 2 týždňoch bola zostatková aktivita 92%, po 1 mesiaci 74 % a po 2 mesiacoch 52 %. V nasledujúcom období (4.– 6. mesiac) sa nepozorovali výrazné zmeny aktivity sledovaného enzýmu. Po 6 mesiacoch sa zistila 46% zostatková aktivita. Je všeobecne známe, že imobilizované bunky majú v porovnaní so suspenznými kultúrami tieto výhody: zabezpečenie nepretržitého prítoku, zlepšenie separácie biokatalyzátora, predĺženie polčasu biokatalyzátora, fyzikálnu ochranu voči strižným silám, ochranu pred zhlukovaním, stimuláciu produkcie sekundárnych metabolitov, konzerváciu multifunkčného systému^{6–9,21}.

V bunkách imobilizovaných zosieťovaním glutaraldehydom je aktivita sacharázy, tyrozindekarboxylázy, DOPA dekarboxylázy a laktázy v porovnaní s aminopeptidázami pomerne vysoká^{11,24,28}.

Kravske mlieko obsahuje 4,8 % vo vode nedostatočne rozpustného mliečného cukru – laktózy. Konzumácia väč-

Tabuľka III

Vplyv vybraných cukorných efektorov na aktivitu laktázy v imobilizovaných bunkách a v bunkách suspenznej kultúry *Arabidopsis thaliana*

Efektor	Koncentrácia [mmol l ⁻¹]	% pôvodnej aktivity ^a	
		A	B
Galaktóza	100	9	15
	50	13	24
	10	26	30
	5	51	57
	1	84	87
	0,1	97	98
Melibióza	100	77	78
	50	82	83
	20	87	88
	10	92	94
Rafinóza	100	91	93
	50	95	96
	20	98	99
Stachyóza	100	94	95
	50	96	97
	20	99	99
Glukóza	100	84	95
	50	90	97
	20	95	99
Fruktóza	100	100	100
	50	100	100
	20	100	100
Sacharóza	100	100	100
	50	100	100
	20	100	100

^a A – imobilizované bunky, B – bunky suspenznej kultúry

šieho množstva laktózy sa môže prejavovať laxatívnym účinkom, ktorý sa v niektorých prípadoch upravuje medikamentózne. Príprava mlieka so zníženým obsahom laktózy má z uvedeného dôvodu veľký praktický význam. Vedľajším produktom výroby syrov je srvátka s vysokým obsahom laktózy. Jej využitie je pre spomínané vlastnosti limitované^{1,29}.

Výsledky práce Wena a spol.³⁰ poukazujú na dôležitú úlohu enzýmov pri výžive rastlín, úrodnosti pôdy, bioremediácii a rezistencii rastových vrcholov koreňov voči patogénom. Rozsiahle laboratorné experimenty nasvedčujú, že k sekrécii laktózy, bunkami rastových vrcholov a koreňových vláskov, podnecuje predovšetkým edafón. Objasnenie mechanizmu tejto reakcie si vyžaduje ďalšie štúdiu.

Biotransformácie sú nielen dôkazom alternatívneho a účinného riešenia syntézy početných biologicky účin-

ných látok, ale sú súčasne zárukou environmentálne nezávadných technológií, čím prispievajú k ochrane životného prostredia^{6,9}.

Vzhľadom na už spomenuté vlastnosti laktózy v súvislosti s mliekom²⁹, ako aj význam laktázy pri výžive a raste rastlín, delení buniek a štúdiu jednotlivých zložiek bunkovej steny kontinuálne modifikovaných v priebehu rastu a diferenciacie^{12,31–33}, predpokladáme, že imobilizovaná laktáza spolu s inými glykozidázami rastlinného pôvodu nájde uplatnenie pri biotransformácii látok dôležitých pre farmaceutický a potravinársky priemysel. Nové zdroje laktázy sa môžu využiť pri biotransformácii laktózy a derivátov galaktozyl-polyolov (galaktooligosacharidov), ktoré majú široké uplatnenie vo farmácii^{12,31,34}.

Štúdium štruktúry početných biologicky aktívnych látok a aplikácia testovaného enzýmu, ako aj iných biokatalyzátorov je ďalšou možnosťou ich uplatnenia^{34–43}.

Tabuľka IV

Stabilita laktázy v imobilizovaných bunkách *Arabidopsis thaliana* v priebehu skladovania

Konzervačná látka	Pôvodná aktivita [%] ^c				
	0 mesiacov	1 mesiac	2 mesiace	3 mesiace	6 mesiacov
—	100	—	—	—	—
CLCTC (50 mg l ⁻¹) ^a	65	67	70	78	89
ATDNO (100 mg l ⁻¹) ^b	64	65	69	79	90
Chloramfenikol (50 mg l ⁻¹)	64	65	69	79	91
Azid sodný (200 mg l ⁻¹)	64	65	70	78	91
Zamrznuté v 0,15 mol l ⁻¹ NaCl	65	66	70	80	93

^a CLCTC – chlortetracyklíniumchlorid, ^b ATDNO – (1-metyldodecyl)dimetylamín *N*-oxid, ^c pôvodná aktivita = enzýmová aktivita (100 %) v bunkách suspenznej kultúry pred imobilizáciou

Na základe uvedených skutočností možno konštatovať, že dostupnosť jednoduchej a rýchlej skríningovej metódy detekcie laktázy má veľký význam ako pre vedecko-výskumné, tak aj technologické účely.

Záver

V práci sa študovala vhodnosť aplikácie glutaraldehydu pri imobilizácii buniek suspenzných kultúr *Arabidopsis thaliana*. Výsledky experimentov ukázali, že bunky *Arabidopsis thaliana* po permeabilizácii Tweenom 20, Tweenom 80, etanolom, hexadecylpyridiniumchloridom možno pri zachovaní pomerne vysokej aktivity laktázy imobilizovať glutaraldehydom. Takto imobilizované bunky je vhodné uchovávať v roztoku 0,15 mol l⁻¹ NaCl v prítomnosti konzervačných látok (chloranfenikol, chlortetracyklíniumchlorid, (1-metyldodecyl)dimetylamín *N*-oxid a azid sodný alebo ich vysušiť a takto uchovávať. Prevažná časť testovaného enzýmu 61,2 % sa nachádza v kultivačnom médiu (extracelulárna forma), kým intracelulárna forma je minoritná 38,8 %.

Pomocou histochemických testov sa potvrdila sekrécia laktázy kalusom a bunkami suspenzných kultúr resp. ako aj koreňovými vláskami a rastovými vrcholmi koreňa kľúčnych rastlín na svoj povrch.

Využitie laktázy v potravinárstve a vo farmácii ako aj pri štúdiu jej úlohy pri výžive rastlín, bioremediácii a rezistencii rastových vrcholov voči parazitom si vyžaduje vyhľadávanie vhodných zdrojov študovaného enzýmu. Dostupnosť jednoduchej a rýchlej skríningovej metódy laktázy je pre toto štúdium nepostrádateľná.

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia grantového projektu VEGA 1/0182/09. Za odbornú a technickú spoluprácu touto cestou ďakujeme doc. Dr. S. Königovi a pani I. Bayreuthovej z Ústavu biochémie a biotechnológie, Univerzity Martina Luthera v Halle.

LITERATÚRA

1. Szczodrac J.: Acta Biotechnol. 19, 235 (1999).
2. Siekel P., Mičieta K.: Biológia (Bratislava) 53, 791 (1998).
3. Timko J., Siekel P., Turňa J., Ferenčík I., Glasa M., Kuchta T., Kúdela O., Lacinová L., Valková D.: Geneticky modifikované organizmy. Veda, Bratislava 2004.
4. Pereira R. A., Batista J. A. N., Da Silva M. C. M., Neto O. B. O., Figuiera E. L. Z., Jiméz A. V., Grosside-Sa M. F.: Phytochemistry 67, 2009 (2006).
5. Romero-Gómez S., Augur C., Viniestra-González G.: Biotechnol. Lett. 22, 1255 (2000).
6. Trelles J. A., Bentancor L., Schoijet A., Porro S., Lewkowicz E. S., Sinisterra J., Iribarren A. M.: Chem. Biodiversity 1, 280 (2004).
7. Brodelius P., Deus B., Moesbach K., Zenk M. H.: FEBS Lett. 103, 93 (1979).
8. Jirků V., Macek T., Vaněk T., Krumphanzl V., Kubánek V.: Biotechnol. Lett. 3, 447 (1981).
9. Gill I., Ballesteros A.: Trends Biotechnol. 18, 282 (2000).
10. Wu K. Y. A., Wisecarver K. D.: Biotechnol. Bioeng. 39, 221 (1992).
11. Stano J., Nemeč P., Weissová K., Kovács P., Kákoniová D., Lišková D.: Phytochemistry 38, 859 (1995).
12. O'Connells, Walsh G.: Appl. Biochem. Biotechnol. 141, 1 (2007).
13. Linsmeyer, E.M., Skoog, F.: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18, 100 (1965).
14. Viehweger K., Dordschbal B., Roos W.: Plant Cell 14, 1509 (2002).
15. Trinder P.: J. Clin. Pathol. 22, 158 (1969).
16. Dixon R. A.: Plant Cell Culture. A Practical Approach. IRL Press, Oxford 1991.
17. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T. H.: Enzyme Histochemistry. A Laboratory Manual. Springer, Berlin 1979.

18. Stoward P. J., Pearse A. G. E.: *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Vol. 3. Churchill Livingstone, Edinburgh 1991.
19. Kim W. D., Kobayashi O., Kaneko S., Sakakibara Y., Park G. G., Kusakabe I., Tanaka H., Kobayashi H.: *Phytochemistry* 55, (2002).
20. Dumas T. B., Bayse D. D., Carter R. J., Peters T., Schaffer R.: *Clin. Chem.* 27, 1642 (1981).
21. Bálež V., Gemeiner P., Kuniak E., Rexová-Benková E., Vojtíšek V., Zemek J.: *Enzymové inžinierstvo*, Alfa, Bratislava 1987.
22. Srinivansan-Nagajyothi A. R., Gowda L. R., Bhat S. G.: *Biotech. Tech.* 8, 729 (1994).
23. Stano J., Diettrich B., Mičieta K., Blanáriková V., Koreňová M.: *Chem. Listy* 102, 815 (2008).
24. Stano J., Mičieta K., Koreňová M., Blanáriková V.: *Chem. Listy* 101, 65 (2007).
25. Hamilton R., Pedersen H., Chin C. K.: *Biotechnol. Bioeng.* 14, 383 (1984).
26. Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
27. Machová B.: *Diplomová práca*. Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava 1994.
28. Devinsky D., Lacko I., Nagy A., Krasnec L.: *Chem. Pap.* 32, 106 (1978).
29. Rogalski J., Lobarzewski J.: *Acta Biotechnol.* 15, 211 (1995).
30. Wen F., Celay R., Price I., Eboho J. J., Hawes M. C.: *Plant Soil* 304, 133 (2008).
31. Klewicki R.: *Eng. Life Sci.* 7, 268 (2007).
32. Ali M. S., Jahangir M., Hussan S. S., Choudhary M. I.: *Phytochemistry* 60, 295 (2002).
33. Saura-Walls M., Fauré R., Brumer H., Teeri T. T., Cottaz S., Driguez H., Planas A.: *J. Biol. Chem.* 283, 21853 (2008).
34. Hemavathi A. B., Hebbar H. V., Raghavarao K. S. M. S.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, 522 (2008).
35. El Ashry E. H. S., Rashed N., Shobier A. S. H.: *Pharmazie* 55, 251 (2000).
36. Gantulga D., Turan Y., Bevan D. R., Esen A.: *Phytochemistry* 69, 1161 (2008).
37. Shimoda K., Hamada H., Hamada H.: *Phytochemistry* 69, 1135 (2008).
38. Zhang L., Liao Ch. Ch., Huang H. Ch., Shen Y. Ch., Yang L. M., Kuo Y. H.: *Phytochemistry* 69, 1398 (2008).
39. Hitagawa H., Tsutsumi K., Ikegami-Kuzuhara A., Nadanaka S., Goto F., Ogawa T., Sugahara K.: *J. Biol. Chem.* 283, 27 438 (2008).
40. Barth A., Siekel P., Sedlářová E., Valent A., Tokhteva E.: *Acta Histochem.* 107, 253 (2005).
41. Bilka F., Balážová A., Bilková A., Šubr Z., Pšenák M.: *Biol. Plantarum* 47, 111 (2003).
42. Shimoda K., Ishimoto H., Kamiue T., Kobayashi T., Hamada H., Hamada H.: *Phytochemistry* 70, 207 (2009).
43. Bilková A., Balážová A., Obložinský M., Bilka F.: *Farm. Obzor* 75, 152 (2006).

J. Stano^a, K. Neubert^c, W. Roos^d, K. Mičieta^e, M. Koreňová^a, and V. Blanáriková^b (^a Botanic Gardens, ^b Department of Molecular and Subcellular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovakia, ^c Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin Luther University, Halle/Saale, Germany, ^d Department of Molecular Biology, Institute of Pharmaceutical Biology and Pharmacology, Martin Luther University, Halle/Saale, Germany, ^e Department of Botany, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovakia): **Study of Immobilized and Extracellular Lactase in Mouse-ear Cress**

Cells in suspension culture of mouse-ear cress (*Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh. cultivar, Columbia were permeabilized with Tween 20, Tween 80, ethanol, and hexadecyltrimethylammonium bromide or hexadecylpyridinium chloride, and immobilized using glutaraldehyde. Lactase showed a pH optimum at 4.7 and the optimal temperatures for immobilized cells and cell cultures was 60 °C and 56 °C, respectively. Four-hour enzyme hydrolysis of the tested substrate proceeded with a conversion of 60–70 %. The immobilized cells showed a high lactase activity, fair stability in long-term storage and convenient physicochemical properties. The culture medium after removing cells was used for identification and determination of enzyme activity. The extracellular activity of lactase estimated in cell suspension accounts for 61 % of the total activity, the rest being due to the intracellular activity. The specific extracellular activity is 4.15 times higher than the intracellular one. Using a histochemical method, secretion of lactase by root tips, root hairs, callus and suspension cells was detected. The described method permits a rapid, simple and specific identification of lactase.