

## ŠTÚDIUM EXTRACELULÁRNEJ A IMOBILIZOVANEJ SACHARÁZY NÁPRSTNÍKA

JÁN STANO<sup>a</sup>, BEATE DIETRICH<sup>c</sup>, KAROL  
MIČIETA<sup>d</sup>, VÍŤAZOSLAVA BLANÁRIKOVÁ<sup>b</sup>  
a MARCELA KOREŇOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Záhrada liečivých rastlín, <sup>b</sup> Katedra molekulárnej  
a subcelulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta  
Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava

<sup>c</sup> Ústav farmaceutickej biológie Univerzity Martina Luthe-  
ra, Hoher Weg 8, 06120 Halle

<sup>d</sup> Katedra botaniky, Prírodovedecká fakulta Univerzity  
Komenského, Révová 39, 811 02 Bratislava  
micieta@fns.uniba.sk, korenova@fpharm.uniba.sk,  
beate.dietrich@pharmazie.uni-halle.de

Došlo 20.2.07, prepracované 13.11.07, prijaté 15.12.07.

Kľúčové slová: distribúcia, imobilizácia, permeabilizácia,  
náprstník, *Digitalis*, sacharáza

### Úvod

Glykozidázy sa podieľajú na významných biologických procesoch ako trávenie, anabolizmus glykoproteínov a katabolizmus glykokonjugátov. Biotechnologické procesy predstavujú alternatívnu cestu pre získanie mnohých, teraz už limitovaných biologicky aktívnych látok. Poznatky o totipotencii a zvládnutie kultivačných techník sa úspešne aplikovali v poľnohospodárstve pri mikropropagácii rastlín<sup>1</sup>.

Totipotencia je vlastnosť somatickej bunky niest' kompletnú genetickú informáciu potrebnú pre vývin celej rastliny. Každá živá bunka, pletivo a orgán predstavujú teda potenciálny základ pre vytvorenie celého rastlinného organizmu<sup>2</sup>.

Pri biosyntéze a biotransformácii prírodných látok sa využíva celý rad multifunkčných enzýmových komplexov. Kvalita potravín je vo veľkej miere podmienená a závislá na kvalite, kvantite, štruktúre a fyzikálno-chemických vlastnostiach peptidov, cukrov a iných zložiek potravín. Biotransformácia takýchto látok hrá dôležitú úlohu v rôznych biotechnologických procesoch<sup>1-4</sup>. Zistilo sa, že cukry a glykozidázy majú dôležitú úlohu v rôznych oblastiach základného a aplikovaného výskumu<sup>5-7</sup>.

Voľné alebo imobilizované enzýmy, prípadne živočíšne alebo rastlinné bunky, reprezentujú dôležitú cestu produkcie účinných enzýmových katalyzátorov aplikovateľných v celom rade technologických procesov<sup>7</sup>.

Rastlinné bunky imobilizoval prvý raz Brodelius<sup>8</sup>. Obaľovanie (enkapsulácia) buniek a enzýmov hydrogélmi

reprezentuje frekventovanú imobilizačnú techniku. Kovalentnú väzbu buniek na povrch nosičov, ako aj spontánnu adhéziu, popísali viacerí autori<sup>9-11</sup>. Tvorba bunkových agregátov, ako aj stupeň diferenciácie buniek v suspenznej kultúre, sú z biotechnologického hľadiska veľmi dôležité.

Sacharáza ( $\beta$ -D-fruktofuranozidáza EC 3.2.1.26), nazývaná aj invertáza, katalyzuje hydrolýzu sacharózy na glukózu a fruktózu. Študovaný enzým sa využíva aj pri výrobe invertných sacharidov (zo sacharózy) s následnou možnosťou prípravy fruktózových prípravkov<sup>12</sup>.

Vývoj imobilizačných techník, dôkaz a stanovenie aktivity biokatalyzátorov je úzko spojený s progresom biotechnologických procesov<sup>7,10</sup>. Vzhľadom na to, že membrány bunky sú hlavnou bariérou transportu mnohých látok, zamerali sme svoju pozornosť na ich permeabilizáciu. Predpokladáme, že imobilizované bunky alebo biokatalyzátory rastlinného pôvodu, podobne ako mikrobiálne, môžu v budúcnosti zohrať dôležitú úlohu v biotechnologických procesoch<sup>7,13</sup>. V predloženej práci sa študoval vplyv permeabilizácie na enzýmovú hydrolýzu sacharózy pomocou imobilizovaných buniek náprstníka a distribúcia intra- a extracelulárnej sacharózy testovaných buniek.

Dostupnosť jednoduchej a rýchlej skríningovej metódy detekcie sacharózy má veľký význam pre vedecko-výskumné a technologické účely.

### Experimentálna časť

#### Rastlinný materiál

Suspenzné kultúry náprstníka vlnatého (*Digitalis lanata* Ehrh.) sa pestovali v kultivačnom médiu podľa Murashigeho a Skooga<sup>14</sup>, modifikovaného Diettrichovou a spol.<sup>15</sup> na rotačnej trepačke (80 rpm min<sup>-1</sup>) pri 25 °C a difúznom osvetlení v priebehu 10 dní.

#### Permeabilizácia buniek

15 g suspenzne pestovaných buniek sa po odfiltrovaní a premytí 1 l 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl permeabilizovalo 50 ml: 5% Tweenom 20, 5% Tweenom 80, 30% etanolom, 50% etanolom, 0,1% hexadecyltrimetylamoniumbromidom, 0,1% hexadecylpyridiniumchloridom resp. 3 hodiny za pomalého miešania (60 rpm) pri laboratórnej teplote. Permeabilizované bunky sa po premytí 2,5 l destilovanej vody a 3 l 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl imobilizovali glutaraldehydom.

#### Imobilizácia buniek glutaraldehydom

15 g permeabilizovaných buniek sa vložilo do 50 ml 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl, pomaly sa pridalo 5 ml 25% glutaraldehydu a pri laboratórnej teplote sa za pomalého miešania (60 rpm) imobilizovali 2 hodiny. Imobilizované bunky sa premyli 2,5 l destilovanej vody, 3 l 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl a uchovávali v 0,15 mol l<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> v 0,05 mol l<sup>-1</sup> Na-fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,0 a úbytok glukózy sa sledoval podľa Trindera<sup>16</sup>.

#### Životaschopnosť buniek

Životaschopnosť buniek sa sledovala podľa Dixona<sup>17</sup> za použitia trifenylnitrazóliumchloridu (TTC), fluoresceín-diacetátu a kyslíkovej elektródy.

#### Dôkaz a stanovenie intra- a extracelulárnej sacharázy

Pri štúdiu aktivity intra- a extracelulárnej sacharázy sa použil prirodzený substrát sacharóza. Ako zdroj intracelulárnej sacharázy sa použili bunky suspenznej kultúry, pričom kultivačné médium slúžilo ako zdroj extracelulárnej sacharázy. Suspenzne kultivované bunky sa po odfiltrovaní na silónovej tkanine (10 g) premyli 2,5 l destilovanej vody. 15 g takto premytých buniek sa zhomogenizovalo vo vychladenej trecej miske s 15 ml 0,1 mol l<sup>-1</sup> Mc Ilvainovým tlmivým roztokom pH 4,6 pri 4 °C. Homogenát sa prefiltroval, odcentrifugoval (10 min, 15 000 g pri 4 °C) a použil na stanovenie aktivity intracelulárnej sacharázy.

Pri dôkaze a stanovení extracelulárnej sacharázy sa použilo kultivačné médium bez buniek, ktoré sa odstránili centrifugáciou (10 min, 15 000 g pri 4 °C).

#### Stanovenie aktivity enzýmu

Enzýmová aktivita sa sledovala modifikovanou metódou podľa Trindera<sup>16</sup> pomocou testovacích prúžkov na stanovenie glukózy (Intes Poprad s r.o., Slovenská republika) a meracieho prístroja Accutrend (fy F. Hoffmann – La Roche Ltd., Nemecko).

Reakčná zmes obsahovala vhodné množstvo enzýmového preparátu (0,1–0,3 ml), sacharózu (6 mmol l<sup>-1</sup>) v celkovom objeme 2 ml 0,1 mol l<sup>-1</sup> Mc Ilvainovho tlmivého roztoku pH 4,6. Zmes sa inkubovala 60 min pri 30 °C. V kontrolnom pokuse sa použil tepelne inaktivovaný enzýmový preparát (10 min pri 100 °C).

Na testovací prúžok sa aplikovalo požadované množstvo inkubačnej zmesi (40 µl) a pomocou meracieho prístroja Accutrend sa stanovila koncentrácia glukózy uvoľnenej enzýmovou hydrolyzou sacharózy. Enzýmová aktivita je vyjadrená v kataloch (označuje sa skratkou kat). Enzýmový preparát má aktivitu 1 kat, ak je schopný pri nasýtení substrátom za definovaných podmienok (teplota, pH, zloženie a koncentrácia) za prítomnosti aktivátorov a neprítomnosti inhibítorov premeniť 1 mol substrátu za 1 sekundu. Katal je pomerne veľká jednotka a preto sa často používajú odvodené jednotky ako nanokatal (nkat), mikrokatal (µkat) a pod. Uvádzané výsledky sú aritmetickým priemerom z piatich paralelných stanovení a hodnotene

né v rozsahu špecifickosti, citlivosti a reprodukovateľnosti uvedenej metódy kvantifikácie glukózy. Jej výhodou je jednoduchosť a rýchlosť stanovenia.

#### Stanovenie proteínov

Obsah proteínov sa stanovil podľa Doumasy a spol.<sup>18</sup> za použitia hovädzieho sérumalbumínu ako štandardného proteínu.

#### Stanovenie efektu glukózy, fruktózy a galaktózy na aktivitu sacharázy

Efekt glukózy, fruktózy a galaktózy na aktivitu sacharázy v bunkách suspenzných kultúr a imobilizovaných bunkách sa testoval pri koncentráciách 1, 5, 10, 20 mmol l<sup>-1</sup> študovaných cukrov.

#### Sledovanie vplyvu pH na aktivitu sacharázy

Vplyv pH na aktivitu sacharázy sa testoval v rozsahu pH 4,2–5,6 v 0,1 mol l<sup>-1</sup> Mc Ilvainovho tlmivého roztoku.

#### Stabilita enzýmu v imobilizovaných bunkách

Stabilita sacharázy v priebehu uchovávaní buniek sa sledovala nasledovne: imobilizované bunky sa uchovávali pri 4 °C v 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl s prídavkom týchto konzervačných látok: a) chloramfenikol 50 mg l<sup>-1</sup>, b) chlór-tetracyklíniumchlorid (CLCTC) 50 mg l<sup>-1</sup>, c) (1-metyldodecyl) dimetylamin N-oxid (ATDNO) 100 mg l<sup>-1</sup> (cit.<sup>20</sup>). Imobilizované bunky sa uchovávali aj v dehydratovanej forme po ich vysušení pri laboratornej teplote v uzavretých nádobách. Vysušené bunky pred použitím nabobtnávali 1 h v 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl.

## Výsledky a diskusia

Rozvoj imobilizačných techník má veľký vplyv na vývoj biotechnológií. Imobilizácia buniek resp. biokatalyzátorov predstavuje veľmi dôležitý spôsob uchovávaní (stabilizácie) vysoko účinných biokatalyzátorov (enzýmov), ktoré sú dôležité pre biotransformačné procesy<sup>7,10,19</sup>.

Pri histochemickom a biochemickom štúdiu hydrolytických enzýmov sa výhodne aplikujú rôzne chromogénne substráty<sup>10,19</sup>. Pretože chromogénne substráty (4-nitrofenyl-β-D-fruktofuranozid a 1-naftyl-β-D-fruktofuranozid) neboli pripravené, pri štúdiu sacharázy sa používal prirodzený substrát – sacharóza. Pri štúdiu intracelulárnej frakcie sa použil enzýmový preparát pripravený homogenizáciou suspenzne kultivovaných buniek náprstníka (po 10 dňoch kultivácie). Kultivačné médium (bez buniek) sa použilo pri dôkaze a stanovení intracelulárnej frakcie sacharázy. Distribúcia intra- a extracelulárnej sacharázy je prezentovaná v tab. I.

Prevažná časť (88,4 %, intracelulárna sacharáza) je lokalizovaná v bunkách suspenznej kultúry. Minoritná časť (11,6 %) sa exkretuje do média (extracelulárna sacharáza). Špecifická aktivita intracelulárnej sacharázy je 4,5×

Tabuľka I

Aktivita sacharázy v 10-dňových bunkách suspenznej kultúry náprstníka a v kultivačnom médiu

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g <sup>-1</sup> čerstvej hmotnosti]	Aktivita [nkat g <sup>-1</sup> čerstvej hmotnosti]	Špecifická aktivita [nkat mg <sup>-1</sup> proteínov]
Intracelulárna aktivita (homogenát izolovaných buniek)	0,2	0,63 ± 0,06	18,3 ± 0,36	28,2
Extracelulárna aktivita (kultivačné médium bez buniek) <sup>a</sup>	1,0	0,38 ± 0,05	2,4 ± 0,25	6,3

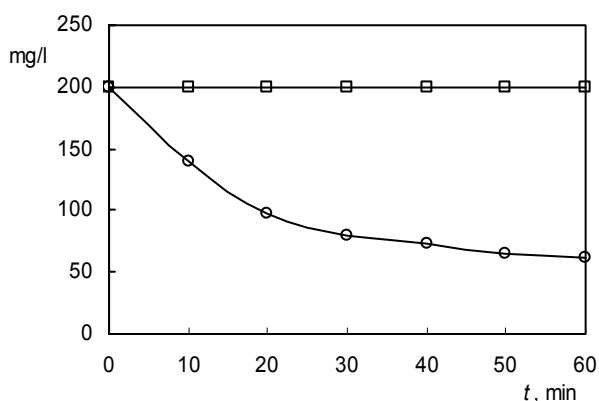
<sup>a</sup> Zodpovedajúca obsahu izolovaných buniek

vyššia ako špecifická aktivita extracelulárnej sacharázy. Pri porovnaní distribúcie intra- a extracelulárnej aktivity galaktozidázy a sacharázy možno konštatovať, že bunky suspenzných kultúr exkretujú do kultivačného média oveľa menej sacharázy ako galaktozidázy<sup>21</sup>.

Glutaraldehydom imobilizované bunky nevyužívajú glukózu (obr. 1) a nie sú životaschopné – nevykazujú respiračnú aktivitu a nefarbia sa fluoresceínom a ani 2,3,5-trifenylnitrotetrazóliumchloridom.

Pri permeabilizácii buniek náprstníka Tweenom 20, Tweenom 80, etanolom, hexadecyltrimetylamoniombromidom a hexadecylpyridiniumchloridom dochádza k preukaznému poklesu proteínov. Aktivita študovaného enzýmu s výnimkou aplikácie etanolu mierne stúpa; špecifická aktivita enzýmu sa zvyšuje vo všetkých prípadoch. Pri permeabilizácii kvasiniek na rozdiel od buniek náprstníka dochádza k preukaznému vzostupu aktivity fenylalaninamoniaklyázy (PAL)<sup>22</sup>. Pri zosieťovaní buniek glutaraldehydom dochádza k poklesu enzymovej aktivity (tab. II).

V imobilizovaných a životaschopných bunkách má sacharáza pH optimum pri 4,6 a pri pH 5,4 (obr. 2). Dve pH optimá sacharázy zistili aj u mikroorganizmov<sup>23</sup>.



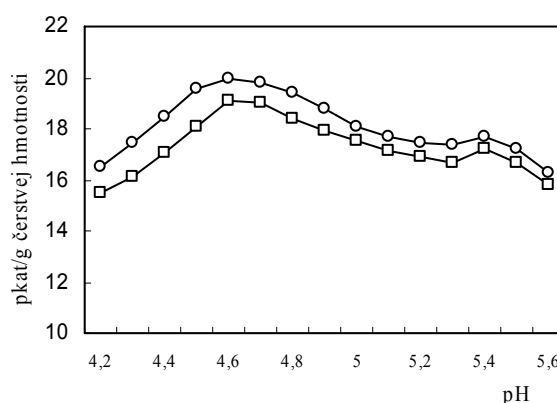
Obr. 1. Časový priebeh využitia glukózy v bunkách náprstníka imobilizovaných glutaraldehydom a v bunkách suspenznej kultúry; 10 g buniek, 20 ml tlmivého roztoku s glukózou, □ glutaraldehyd, ○ suspenzná kultúra

Enzymová hydrolyza sacharózy má lineárny priebeh 4 h, dosahuje 63 % konverzie substrátu a potom sa zastavuje. Tepelné optimum imobilizovaných buniek je pri 50 °C a buniek suspenznej kultúry pri 45 °C (obr. 3). V porovnaní s  $\alpha$ -galaktozidázou sú tieto hodnoty oveľa nižšie<sup>24</sup>.

Sacharóza je pravdepodobne najčastejším zdrojom uhlíka a energie pri kultivácii pletivových a suspenzných kultúr<sup>14,25</sup>. V predloženej práci sme sledovali vplyv glukózy, fruktózy a galaktózy na aktivitu sacharázy vo vitálnych a imobilizovaných bunkách. Prítomnosť glukózy a fruktózy aktivitu testovanej hydrolyzy mierne inhibuje, zatiaľ čo galaktóza aktivuje (tab. III).

Hamilton a spol.<sup>25</sup> zistili, že pri využití sacharózy rastlinnými pletivovými kultúrami sa tento sacharid najskôr enzymovo transformuje na glukózu a fruktózu. Obsah oboch sacharidov v kultivačnom médiu je v prvých dňoch po inokulácii približne rovnaký. V prítomnosti glukózy bunky fruktózu nevyužívajú.

V imobilizovaných a vitálnych bunkách je zdanlivá hodnota Michaelis-Mentenovej konštanty  $K_m$  sacharázy rovná 4,6 mmol l<sup>-1</sup>. Podobné vlastnosti má aj sacharáza



Obr. 2. pH optimum sacharázy suspenznej kultúry a buniek náprstníka imobilizovaných glutaraldehydom; 2,5 g buniek v 10 ml tlmivého roztoku so sacharózou, □ glutaraldehyd, ○ suspenzná kultúra

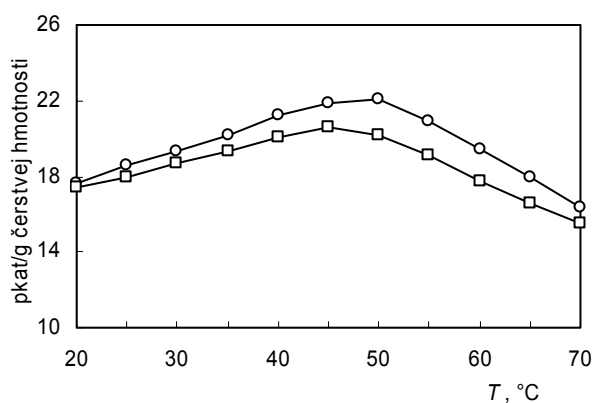
Tabuľka II

Obsah bielkovín a aktivita sacharázy v 10-dňových bunkách náprstníka 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 <sup>-1</sup> čerstvej hmotnosti]	Aktivita [nkat g <sup>-1</sup> čerstvej hmotnosti]	Špecifická aktivita [nkat mg <sup>-1</sup> proteínov]
Suspenzia		0,63 ± 0,03	18,3 ± 0,42	29,1
Permeabilizované	0,1%HTAB	0,28 ± 0,013	20,3 ± 0,61	72,5
	0,1%HPCH	0,28 ± 0,012	20,2 ± 0,61	72,2
	5% Tween 20	0,28 ± 0,013	20,0 ± 0,62	71,4
	5% Tween 80	0,28 ± 0,014	20,0 ± 0,63	71,4
	30% etanol	0,28 ± 0,013	17,1 ± 0,62	61,1
	50% etanol	0,28 ± 0,014	17,1 ± 0,63	61,1
Imobilizované	0,1%HTAB	0,29 ± 0,014	15,6 ± 0,60	53,8
	0,1%HPCH	0,29 ± 0,013	15,6 ± 0,59	53,8
	5% Tween 20	0,29 ± 0,013	15,3 ± 0,58	52,7
	5% Tween 80	0,29 ± 0,014	15,3 ± 0,59	52,7
	30% etanol	0,29 ± 0,014	12,8 ± 0,58	44,1
	50% etanol	0,29 ± 0,015	12,7 ± 0,57	43,8

izolovaná z ryže  $K_m = 6,6 \text{ mmol l}^{-1}$  (cit.<sup>26</sup>), maku  $K_m = 5,5 \text{ mmol l}^{-1}$  (cit.<sup>27</sup>), kukurice  $K_m = 2,9 \text{ mmol l}^{-1}$  a *Schizophyllum commune*  $K_m = 4,8 \text{ mmol l}^{-1}$  (cit.<sup>28</sup>).

Kyselina 4-(chlórmerkuri)benzoová v koncentrácii 0,1–0,5 mmol l<sup>-1</sup> inhibuje sacharázu. Jej účinok možno eliminovať 5–10 mmol l<sup>-1</sup> cysteínom, 5–10 mmol l<sup>-1</sup> 2-merkptoetanolom alebo 5–10 mmol l<sup>-1</sup> ditiotreitólom, čo dokazuje, že SH skupiny sú pre enzýmovú aktivitu esenciálne<sup>27,29</sup>. Glukóza a fruktóza inhibujú aktivitu sacharázy izolovanej z uhoriek a maku<sup>27,29</sup>, podobný efekt sa pozoroval aj pri imobilizovaných bunkách. Isla a spol.<sup>26</sup>



Obr. 3. Vplyv teploty na aktivitu sacharázy suspenznej kultúry buniek náprstníka imobilizovaných glutaraldehydom; 2,5 g buniek v 10 ml tlmivého roztoku so sacharózou, □ glutaraldehyd, ○ suspenzná kultúra

zistili, že fruktóza je kompetitívnym a glukóza nekompetitívnym inhibítorom študovaného enzýmu.

Glutaraldehydom imobilizované bunky uchovávané v 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl v prítomnosti konzervačných látok (chloramfenikol, chlórtricyklíniumchlorid, (1-metyldodecyl)dimetylamín *N*-oxid a azid sodný si v priebehu 6 mesiacov uchovávajú pomerne vysokú enzýmovú aktivitu (tab. IV). Podobnú aktivitu sacharázy majú aj glutaraldehydom imobilizované bunky, ktoré sa usušili v tenkej vrstve pri laboratórnej teplote a udržiavali v uzavretých nádobách. Takto udržiavané bunky možno po 60-minútovom nabobtnaní v 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl použiť ako imobilizované bunky uchovávané v 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl v predošlom prípade (množstvo vysušených buniek je ekvivalentné množstvu imobilizovaných buniek uchovávaných v roztoku NaCl). Je všeobecne známe, že imobilizované bunky majú v porovnaní so suspenznými kultúrami tieto výhody: zabezpečenie nepretržitého prítoku, zlepšenie separácie biokatalyzátora, predĺženie počasu biokatalyzátora, fyzikálnu ochranu voči strižným silám, ochranu pred zhlukovaním, stimuláciu produkcie sekundárnych metabolitov, konzerváciu multifunkčného systému<sup>7,9,10,19</sup>.

V bunkách imobilizovaných zosieťovaním glutaraldehydom je aktivita sacharázy, tyrozín-dekarboxylázy, DOPA-dekarboxylázy, α- a β-galaktózidázy v porovnaní s aminopeptidázami pomerne vysoká<sup>30–32</sup>.

Glutaraldehyd možno preto výhodne využiť aj pri imobilizácii rastlinných buniek. Predložené výsledky poukazujú na to, že extracelulárne a imobilizované glykozidázy a iné enzýmy rastlinného pôvodu nájdu biotechnologické uplatnenie v potravinárskom, farmaceutickom priemysle ako aj vo výskume<sup>33,34</sup>. Tieto enzýmy sú všeobecne prí-

Tabuľka III

Efekt glukózy, fruktózy a galaktózy na aktivitu sacharázy (%) imobilizovaných buniek a suspenznej kultúry náprstníka

Koncentrácia cukrov [mmol l <sup>-1</sup> ]	Pôvodná aktivita [%]					
	glukóza		fruktóza		galaktóza	
	A	B	A	B	A	B
0	100	100	100	100	100	100
1	74	75	63	64	147	145
5	73	74	58	57	142	140
10	67	68	54	55	133	132
20	64	65	51	52	128	126

Pozn.: A – suspenzná kultúra, B – imobilizované bunky

Tabuľka IV

Stabilita sacharázy v imobilizovaných bunkách náprstníka v priebehu skladovania

Konzervačná látka	Pôvodná aktivita [%]				
	0 mesiacov	1 mesiac	2 mesiace	3 mesiace	6 mesiacov
–	100	–	–	–	–
CLCTC (50 mg l <sup>-1</sup> )	88	87	84	82	78
ATDNO (100 mg l <sup>-1</sup> )	88	87	84	82	78
Chloramfenikol (50 mg l <sup>-1</sup> )	88	86	83	81	77
Azid sodný (200 mg l <sup>-1</sup> )	88	86	83	81	76
Zamrznuté v 0,15 mol l <sup>-1</sup> NaCl	89	85	81	79	74
Dehydratované bunky	90	85	82	79	75

Pozn.: CLCTC – chlortetracyklíniumchlorid, ATDNO – (1-metyldodecyl)dimetylamin *N*-oxid, pôvodná aktivita = enzýmová aktivita (100 %) v bunkách suspenznej kultúry pred imobilizáciou

tomné v rastlinách. Žiaľ, doposiaľ sa v biotechnologických procesoch neaplikovali.

Náklady na horeuvedenú imobilizáciu sú nízke a nevyžadujú ani náročné prístrojové vybavenie. Pri imobilizácii celých buniek sa zachováva vysoká aktivita enzýmu bez jeho izolácie. Fyzikálne vlastnosti biokatalyzátora a kinetické parametre reakcie sú porovnateľné s biokatalyzátorom pripraveným imobilizáciou na rozpustný, resp. nerozpustný nosič<sup>35</sup>. Biotransformácia poskytuje okrem alternatívneho a účinného riešenia početných syntetických problémov aj environmentálne nezávadné technológie, čím prispieva k ochrane životného prostredia<sup>7,9,10</sup>.

Prezentovaným spôsobom imobilizovaná sacharáza a iné hydrolázy sa môžu perspektívne uplatniť v biotransformačných procesoch farmaceuticky a potravinársky dôležitých substancií. Štúdiom štruktúry niektorých látok a ich participácia v biologických systémoch je ďalšou možnosťou ich praktického využitia<sup>36–40</sup>.

## Záver

V práci sa testovala vhodnosť aplikácie glutaraldehydu pri imobilizácii suspenzných kultúr náprstníka. Výsledky experimentov ukázali, že bunky náprstníka po permeabilizácii Tweenom 20, Tweenom 80, etanolom, hexadecyltrimetylamoniombromidom a hexadecylpyridiniumchloridom možno pri zachovaní pomerne vysokej aktivity sacharázy imobilizovať glutaraldehydom. Takto imobilizované bunky je vhodné uchovávať v roztoku 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl v prítomnosti konzervačných látok (chloramfenikol, chlortetracyklíniumchlorid,

(1-metyldodecyl)dimetylamin *N*-oxid a azid sodný alebo ich vysušiť a skladovať v tomto stave.

Majoritná časť aktivity študovaného enzýmu predstavuje intracelulárnu a iba minoritná časť extracelulárnu sacharázu.

Pomocou testovacích prúžkov na stanovenie koncen-

trácie glukózy a meracieho prístroja Accutrend sa vypracovala rýchla, jednoduchá a spoľahlivá metóda dôkazu extracelulárnej sacharózy.

*Práca bola vypracovaná v rámci riešenia grantového projektu VEGA 1/3289/06. Za technickú spoluprácu touto cestou ďakujeme p. P. Kečkešovi.*

#### LITERATÚRA

- Tilemann I., Tokhtaeva E., Sedlárová E., Barth A., Valent A., Siekel P., Ďuriček M.: *Chem. Nat. Prod.* 39, 394 (2003).
- Hudák J., Dvořák M., Herichová A., Lux A., Nátr L., Peterková I.: *Biológia rastlín*. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava 1991.
- Szczodrac J.: *Acta Biotechnol.* 19, 235 (1999).
- Obložinský M., Shoeps R., Ulbrich-Hoffmann R., Bezáková L.: *Biochim. Biophys. Acta* 1631, 153 (2003).
- Pereira R. A., Batista J. A. N., Da Silva M. C. M., Neto O. B. O., Figuera E. L. Z., Jiméz A. V., Grosside-Sa M. F.: *Phytochemistry* 67, 2009 (2006).
- Romero-Gómez S., Augur C., Vinięgra-González G.: *Biotechnol. Lett.* 22, 1255 (2000).
- Trelles J. A., Bentancor L., Schoijet A., Porro S., Lewkowicz E. S., Sinisterra J., Iribarren A. M.: *Chem. Biodiversity* 1, 280 (2004).
- Brodélius P., Deus B., Moesbach K., Zenk M. H.: *FEBS Lett.* 103, 93 (1979).
- Jirků V., Macek T., Vaněk T., Krumphanzl V., Kubánek V.: *Biotechnol. Lett.* 3, 447 (1981).
- Gill I., Ballesteros A.: *Trends Biotechnol.* 18, 282 (2000).
- Platková Z., Polakovič M., Štefuca V., Vandáková M., Antošová M.: *Chem. Pap.* 60, 469 (2006).
- Schlee D., Kleber H. P.: *Biotechnologie*. Vol. 2. Gustav Fischer Verlag, Jena 1991.
- Barth A., Siekel P., Sedlárová E., Valent A., Tokhtaeva E.: *Acta Histochem.* 107, 253 (2005).
- Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
- Diettrich B., Steup C., Neumann N. D., Schreiber H., Reinbothe C., Luckner M.: *J. Plant Physiol.* 124, 441 (1986).
- Trinder P.: *J. Clin. Pathol.* 22, 158 (1969).
- Dixon R. A.: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1991.
- Doumas T. B., Bayse D. D., Carter R. J., Peters T., Schaffner R.: *Clin. Chem.* 27, 1642 (1981).
- Báleš V., Gemeiner P., Kuniak L., Rexová-Benková E., Vojtíšek V., Zemek J.: *Enzymové inžinierstvo*. Alfa, Bratislava 1987.
- Devínsky D., Lacko I., Nagy A., Krasnec L.: *Chem. Pap.* 32, 106 (1978).
- Stano J., Kovács P., Mičieta K., Neubert K., Tintemann H., Koreňová M.: *Acta Histochem.* 4, 441 (2002).
- Srinivansan-Nagajyothi A. R., Gowda L. R., Bhat S. G.: *Biotech. Tech.* 8, 729 (1994).
- Rubio M. C., Runco R., Navarro A. R.: *Phytochemistry* 61, 605 (2002).
- Stano J., Bezáková L., Kovács P., Kákoniová D., Lišková D.: *Pharmazie* 51, 245 (1996).
- Hamilton R., Pedersen H., Chin C. K.: *Biotechnol. Bioeng.* 14, 383 (1984).
- Isla M. I., Salermo G., Pontis H., Vattuone M. A., Sampietro A. R.: *Phytochemistry* 38, 321 (1995).
- Kováčiková M.: *Diplomová práca*. Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava 1991.
- Rajo H. P., Vattuone M. A., Sampietro A. R.: *Phytochemistry* 37, 119 (1994).
- Machová B.: *Rigorózná práca*. Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava 1994.
- Stano J., Nemeč P., Weissová K., Kovács P., Kákoniová D., Lišková D.: *Phytochemistry* 38, 859 (1995).
- Mičieta K., Tokhtaeva E., Stano J., Koreňová M., Neubert K., Ulbrich-Hoffmann R., Blanáriková V.: *Chem. Nat. Comp.* 38, 284 (2002).
- Stano J., Mičieta K., Koreňová M., Blanáriková V.: *Chem. Listy* 101, 65 (2007).
- Assano N., Nash R., Molyneus R., Fleet C. W. J.: *Tetrahedron: Asymmetry* 11, 1645 (2000).
- Czigle Sz., Veres K., Háznagy-Randai E., Tóth L., Mučaji P., Máthé I., Grančai D.: *J. Essent. Oil Res.* 18, 423 (2006).
- Hasal P., Vojtíšek V., Čejková A., Kleczek P., Kofronová O.: *Enzyme Mikrob. Technol.* 14, 211 (1992).
- Tekeľová D., Tóth J., Mrlianová M., Czigle Sz., Filipová A., Grančai D.: *Farm. Obzor* 10–11, 85 (2006).
- Neubert K., Stano J., Mičieta K., Koreňová M., Blanáriková V.: *Eng. Life Sci.* 4, 281 (2004).
- Gupta P., Achari B., Pal B. C.: *Phytochemistry* 66, 615 (2005).
- Bezáková L., Obložinský M., Sýkorová M., Paulíková I., Košťálová D.: *Czech. Slov. Pharm.* 67, 225 (2002).
- Nehls U., Grunze N., Willmann M., Reich M., Küster H.: *Phytochemistry* 68, 82 (2007).

**J. Stano<sup>a</sup>, B. Diettrich<sup>c</sup>, K. Mičieta<sup>d</sup>, V. Blanáriková<sup>b</sup>, and M. Koreňová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> Medicinal Plants Garden, <sup>b</sup> Department of Molecular and Subcellular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, <sup>c</sup> Institute of Pharmaceutical Biology, Martin Luther University, Halle/Saale, Germany, <sup>d</sup> Department of Botany, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava): **Study of Extracellular and Immobilized Saccharase in Foxglove**

Cells in suspension culture of foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh.) were permeabilized with Tween 20, Tween 80, ethanol, hexadecyltrimethylammonium bromide or hexadecylpyridinium chloride and immobilized using glutaraldehyde. Saccharase showed a pH optimum at 4.6 and

5.4; the optimum temperature for immobilized cells and for cell suspension culture were 50 °C and 45 °C, respectively. Four-hour hydrolysis of the substrate proceeded with a conversion of 63 %. The immobilized cells showed a high saccharase activity, good stability of plant saccharase in long-term storage and convenient physico-mechanical properties. The culture medium (without cells)

was used for identification and determination of extracellular enzyme activity. The intracellular activity of saccharase estimated in cell suspension accounts for 88.4 % of the total activity the rest is due to the extracellular activity. The specific intracellular activity is 4.6 times higher than the extracellular one. The described method permits a rapid, simple and specific identification.