

## **Aktivita vybraných aminopeptidáz v imobilizovaných bunkách uhoriek**

KLAUS NEUBERT - JÁN STANO\* - KAROL MIČIETA  
- DANIEL GRANČAI - IVO ŠAFAŘÍK

**SÚHRN.** Suspenzné kultúry uhorky siatej (*Cucumis sativus* L.) sa permeabilizovali Tweenom 80 a imobilizovali glutaraldehydom. pH optimum L-arginínaminopeptidázy a L-prolíniminopeptidázy v natívných a imobilizovaných bunkách je 7,6, resp. 7,4. V bunkách imobilizovaných glutaraldehydom je v porovnaní s natívnymi bunkami veľmi nízka aktivita sledovaných enzýmov. Pri imobilizácii aminopeptidáz v bunkách uhorky siatej sa úspešne aplikoval alginátový gél.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** imobilizácia; permeabilizácia; aminopeptidáza; suspenzné bunkové kultúry; uhorka

Poznanie a zvládnutie techniky imobilizácie izolovaných buniek a enzýmov je nevyhnutným predpokladom rozvoja biotechnológií a preto sa v ostatných rokoch štúdiu tejto problematiky venuje zvýšená pozornosť. Rastlinné bunky prvýkrát imobilizoval v roku 1979 Brodelius so spolupracovníkmi. Pri tejto imobilizácii použili alginát sodný [1]. Imobilizácia buniek alebo izolovaných enzýmov je veľmi dôležitou cestou uchovávaní (stabilizácie) vysokoúčinných katalyzátorov (enzýmov), dôležitých pre biotransformačné procesy [2,3]. Pri imobilizácii sa používajú hlavne gély prírodného alebo syntetického pôvodu: agar, agaróza, karagénan, polyuretán, celulóza alebo polyakrylamid [4-6].

---

Prof. RNDr. Klaus NEUBERT, DrSc., Institute für Biochemie, Martin Luther Universität, Kurt Mothes Str. 3, 06120 Halle, Deutschland.

\*RNDr. Ján STANO, CSc., Záhrada liečivých rastlín, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava. (korešpondujúci autor)

Doc. RNDr. Karol MIČIETA, CSc., Katedra botaniky, Prírodovedecká fakulta UK, Révová 39, 811 02 Bratislava.

Doc. RNDr. Daniel GRANČAI, CSc., Katedra farmakognózie a botaniky, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava.

Doc. Ing. Ivo ŠAFAŘÍK, CSc., Laboratórium biochemie a biotechnológie, Ústav ekologie krajiny, Branišovska 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika.

Suspenzné kultúry maku imobilizované alginátom vápenatým sú za optimálnych podmienok vitálne 6 mesiacov a transformujú kodeinón na kodeín [7]. Rastlinné proteolytické enzýmy majú dôležitú úlohu pri degradácii oligopeptidov a proteínov, pri postranlačnej modifikácii proteínov a v ďalších procesoch [8-11]. Aminopeptidázy (EC 3.4.11) sú prítomné v rôznych rastlinách [8,9,12,13].

Predpokladáme, že imobilizované rastlinné bunky nájdu uplatnenie aj pri biotransformácii oligopeptidov a oligosacharidov [8-11,13-15].

V predloženej práci sme zamerali svoju pozornosť na enzýmovú hydrolyzu syntetických substrátov: aminokyselina-4-(fenylazo)-fenylamid intaktnými a imobilizovanými suspenznými kultúrami buniek uhoriek (*Cucumis sativus* L.).

## **Materiál a metódy**

### *Pletivové kultúry*

Kalusové a suspenzné kultúry uhorky siatej (*Cucumis sativus* L. cv. Mělnické) sa odvodili z kľúčnych rastlín na Chemickom ústave Slovenskej akadémie vied v Bratislave (RNDr. Daniela Kákoniová, CSc.). Uvedené kultúry sa pestovali v živnom médiu podľa Murashigeho a Skooga [14] na rotačnej trepačke za štandardných podmienok ( $24 \pm 1$  °C, 60 % relatívnej vlhkosti, v tme a 20 ot.min<sup>-1</sup>) po dobu 14 dní [15].

### *Imobilizácia buniek glutaraldehydom*

Suspenzne pestované bunky sa permeabilizovali 5 % Tweenom 80 a po premytí destilovanou vodou a 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl sa imobilizovali podľa Stano a kol. [15] za použitia 5 % glutaraldehydu (15 g/50 ml). Imobilizované bunky sa odfiltrovali, premyli 3000 ml destilovanej vody, 3000 ml 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl a ponechali v 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl s prídavkom azidu sodného (200 mg.l<sup>-1</sup>).

### *Imobilizácia buniek alginátom*

Zo suspenzne pestovaných buniek sa 3 g zmiešali s 10 ml 3 % alginátu sodného a pomocou kapiláry (Ø 1,5 mm) sa aplikovalo do 100 ml 0,05 mol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>. Takto vytvorené častice - guľôčky alginátu vápenatého, ktorý obaľuje bunky suspenznej kultúry (Ø 3–4 mm) sa ponechali za stáleho miešania v roztoku 0,05 mol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 1 h a potom sa preniesli do kultivačného média. Množstvo 4 g častíc obsahuje 1g buniek (čerstvej hmotnosti) [1,15].

*Stanovenie čerstvej a suchej hmotnosti*

Čerstvá hmotnosť suspenznej kultúry a imobilizovaných buniek sa stanovila po centrifugácii gravimetricky (10 min, 15000 m.s<sup>-2</sup>). Suchá hmotnosť suspenznej kultúry a imobilizovaných buniek sa stanovila gravimetricky po ich vysušení do konštantnej hmotnosti pri 100 °C.

*Stanovenie aktivít enzýmov*

Enzýmová aktivita aminopeptidáz sa stanovila modifikovanou metódou podľa Stano a kol. [17]. Ako substráty sa použili: L-arginín-4-(fenylazo)-fenylamid (L-Arg-PAP-amid) a L-prolín-4-(fenylazo)-fenylamid (L-Pro-PAP-amid). Reakčná zmes obsahovala 1,7 ml Theorel-Stenhagenovho tlmivého roztoku (0,1 mol.l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - NaOH pH 7,6, resp. 7,4) a 0,3 ml substrátu (1,6.10<sup>-3</sup> mol.l<sup>-1</sup> L-Arg-PAP-amid a 2,5.10<sup>-3</sup> mol.l<sup>-1</sup> L-Pro-PAP-amid jednotlivo). Po predinkubácii (10 min pri 30 °C) sa pridalo vhodné množstvo natívnych alebo imobilizovaných buniek (0,1 až 0,3 g). V kontrolnom pokuse sa použili tepelne inaktivované bunky (10 min pri 100 °C). Takto pripravené zmesi sa ponechali 20 min pri 30 °C na rotačnej trepačke (60 ot.min<sup>-1</sup>), a reakcia sa zastavila pridaním 0,5 ml 40 % kyseliny trichlóroctovej. Po ukončení sa bunky oddelili (centrifugácia) [1], vysušili a enzýmová aktivita sa vyjadrila na 1 g sušiny. Množstvo protonizovaného 4-fenylazofenylamínu sa stanovilo spektrofotometricky pri 500 nm podľa kalibračnej krivky. Enzýmová aktivita je vyjadrená v kataloch. Proteíny sa stanovili podľa Bradforda [11].

*pH optimum aminopeptidáz*

Pri sledovaní vplyvu tlmivého roztoku na aktivitu aminopeptidáz sa použil Theorel-Stenhagenov tlmivý roztok (0,1 mol.l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - NaOH) s pH 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8 a 8,0.

*Viabilita buniek*

Viabilita buniek sa stanovila podľa Dixona [19] s 2,3,5-trifenyltetrazoliumchloridom (TTC), fluoresceíndiacetátom a s pomocou kyslíkovej elektródy.

*Utilizácia glukózy*

Utilizácia glukózy suspenznými a imobilizovanými bunkami sa sledovala 60 min. Bunky suspenzných kultúr (100 mg) a imobilizované bunky (100 mg) sa preniesli do roztoku glukózy 200 mg.l<sup>-1</sup> v 0,05 mol.l<sup>-1</sup> Na-fosforečnanovom tlmivom roztoku pH 7,2 a úbytok glukózy sa sledoval podľa Trindera [20].

## Výsledky a diskusia

Imobilizácia buniek a enzýmov našla široké uplatnenie v technológii. V tejto práci sa skúmala imobilizácia buniek uhorky sietej pomocou glutaraldehydu (vnútorné zosieťovanie) a alginátu vápenatého (zabudovanie buniek do gélu). V bunkách imobilizovaných glutaraldehydom sa zaznamenala vysoká aktivita tyrozín-dekarboxylázy, DOPA-dekarboxylázy, invertázy, ako aj  $\alpha$ - a  $\beta$ -galaktozidázy [15,21-23]. V bunkách imobilizovaných alginátom je aktivita aminopeptidáz vyššia než v bunkách imobilizovaných glutaraldehydom (tab. 1 a 2).

TABUĽKA 1. Aminopeptidázové aktivity v suspenznej kultúre a glutaraldehydom imobilizovaných bunkách uhoriek.

TABLE 1. Aminopeptidase activity of cell suspension culture and of cucumber cells immobilized with glutaraldehyde.

Bunky <sup>1</sup>	Proteíny [mg/g sušiny] <sup>2</sup>	Aktivita [nkat/g sušiny] <sup>3</sup>		Špecifická aktivita [pkat/mg proteínov] <sup>4</sup>	
		A	B	A	B
Suspenzné <sup>5</sup>	43,2	62,9	77,3	1,45	1,78
Permeabilizované <sup>6</sup>	13,1	67,8	84,1	5,17	6,41
Imobilizované <sup>7</sup>	13,0	2,4	3,3	0,18	0,25

A - L-arginínaminopetidáza (L-Arg-AP), B - L-prolíniminopetidáza (L-Pro-IP).

A - L-arginine aminopetidase (L-Arg-AP), B - L-proline iminopetidase (L-Pro-IP).

1 - cells, 2 - proteins [mg/g of dry weight], 3 - activity [nkat/g of dry weight], 4 - specific activity [pkat/mg of proteins], 5 - suspension, 6 - permeabilized, 7 - immobilized.

TABUĽKA 2. Aminopeptidázové aktivity v suspenznej kultúre a alginátom imobilizovaných bunkách uhoriek.

TABLE 2. Aminopeptidase activity of cell suspension culture and of cucumber cells immobilized with alginate.

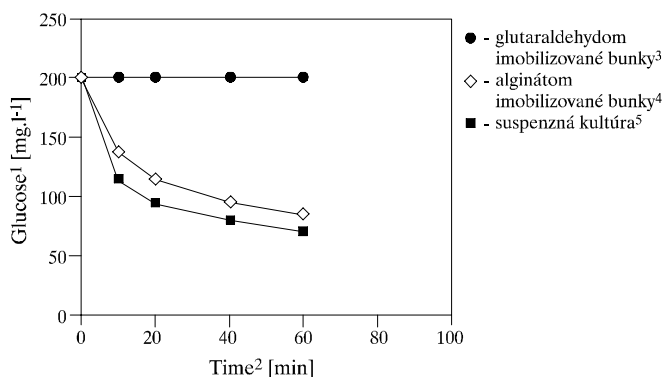
Bunky <sup>1</sup>	Proteíny [mg/g sušiny] <sup>2</sup>	Aktivita [nkat/g sušiny] <sup>3</sup>		Špecifická aktivita [pkat/mg proteínov] <sup>4</sup>	
		A	B	A	B
Suspenzné <sup>5</sup>	43,2	62,9	77,3	1,45	1,78
Imobilizované <sup>6</sup>	43,2	20,4	26,8	0,47	0,62

A - L-arginínaminopetidáza (L-Arg-AP), B - L-prolíniminopetidáza (L-Pro-IP).

A - L-arginine aminopetidase (L-Arg-AP), B - L-proline iminopetidase (L-Pro-IP).

1 - cells, 2 - proteins [mg/g of dry weight], 3 - activity [nkat/g of dry weight], 4 - specific activity [pkat/mg of proteins], 5 - suspension, 6 - immobilized.

Pri imobilizácii glutaraldehydom dochádza k plazmolýze a miernemu zhlukovaniu buniek. Takto imobilizované bunky pri testovaní s 2,3,5-trifenylnyltetrazoliumchloridom (TTC), fluoresceíndiacetátom a meraní spotreby kyslíka nejavili viabilitu. Glutaraldehydom imobilizované bunky glukózu neutilizujú (obr. 1). Bunky imobilizované alginátom na rozdiel od buniek imobilizovaných glutaraldehydom glukózu využívajú.



OBR. 1. Časový priebeh využitia glukózy bunkami suspenznej kultúry, glutaraldehydom a alginátom imobilizovanými bunkami.

FIG. 1. Course of glucose utilization by cells of suspension culture and by cells immobilized with glutaraldehyde and alginate.

1 - glucose, 2 - time, 3 - cells immobilized with glutaraldehyde, 4 - cells immobilized with alginate, 5 - cell suspension culture.

Po permeabilizácii Tweenom 80 dochádza k poklesu obsahu proteínov a miernemu zvýšeniu aktivity aminopeptidáz. Pri imobilizácii buniek glutaraldehydom dochádza k výraznému poklesu aktivity všetkých sledovaných aminopeptidáz (tab. 1). U skúmaných aminopeptidáz v natívnych a imobilizovaných bunkách, ako aj v čiastočne purifikovaných enzýmoch, sú zhodné pH optimá [24].

Je všeobecne známe, že rastlinné bunky imobilizované alginátom vápenatým majú v porovnaní so suspenznými bunkami niektoré výhody. Imobilizované bunky sa menej agregujú, sú chránené pred prudkými nárazmi, produkty biotransformácie sa lepšie uvoľňujú, zvyšuje sa ich vzájomný kontakt a zvyšuje sa stabilita multienzymových systémov [25,26]. Pri imobilizácii alginátom sú oveľa vyššie náklady, ako pri imobilizácii glutaraldehydom.

Aktivita tyrozín-dekarboxylázy, DOPA-dekarboxylázy,  $\alpha$ - a  $\beta$ -galaktozidázy po imobilizácii glutaraldehydom - bifunkčným činidlom (priechnym zosieťovaním) je v porovnaní s aktivitou aminopeptidáz pomerne vysoká [21-23].

Glutaraldehyd sa použil pri imobilizácii rôznych rastlinných buniek [15,21,22]. Výdavky spojené s imobilizáciou sú pomerne nízke, prístrojové vybavenie je nenáročné a zostatková aktivita enzýmu je pomerne vysoká. Takto imobilizované bunky sú porovnateľné s bunkami imobilizovanými pomocou nosičov [27].

Pri imobilizácii aminopeptidáz je vzhľadom na uvedené skutočnosti výhodnejšie zabudovanie buniek do alginátu vápenatého. Aminopeptidázy, ako aj niektoré proteázy, sa môžu perspektívne využiť pri biotransformácii farmaceuticky a potravinársky dôležitých látok [3,11,23,29,30]. Predložené výsledky poukazujú, že enzýmovú aktivitu aminopeptidáz v bunkách imobilizovaných alginátom sodným možno využiť v biotechnologických postupoch prípravy niektorých oligopeptidov, prípadne pri štúdiu ich štruktúry, taktiež glykoproteínov [11,21,29,31,32].

#### Podakovanie

Za poskytnutý rastlinný materiál ďakujeme RNDr. D. Kákoniovej, CSc z Chemického ústavu Slovenskej akadémie vied v Bratislave a p. K. Prítyiovej z firmy Lestra v Nesvadoch. Za finančnú podporu ďakujeme agentúram DAAD v Bonne a VEGA.

### Literatúra

1. BRODELIUS, P. - DEUS, B. - MOSBACH, K. - ZENK, M. H.: Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. *FEBS Letters*, 103, 1979, s. 93-97.
2. KLIBANOV, A. M.: Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science*, 219, 1983, s. 722-727.
3. JANOUSEK, D. - SPHON, U.: Poroses Glas als Enzymträger. *Bioforum International*, 1, 1998, s. 38-39.
4. TAMPION, J. - TAMPION, M. D.: Immobilized cells. Principles and applications. Cambridge : Cambridge University Press, 1987. 324 s.
5. HULST, A. C. - TRAMPER, J.: Immobilized plant cells: A literature survey. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 1989, s. 546-558.
6. IQBAL, M. - ZAFAR, S. I.: Petiolar felt-sheat of palm: A new matrix for fungal immobilization. *Biotechnology and Technology*, 11, 1994, s. 755-759.
7. FURUYA, T. - YOSHIKAWA, T. - TARA. M.: Biotransformation of codeinone to codeine by immobilized cells of *Papaver somniferum* L. *Phytochemistry*, 23, 1984, s. 999-1001.
8. RADLOWSKI, M. - KALINOWSKI, A. - KRALIKOWSKI, Z. - BARTOWIAK, S.: Protease activity from maize pollen. *Phytochemistry*, 35, 1994, s. 24-32.
9. TACHI, H. - ITO, H. - ICHISHIMA, E.: An X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase from

- Aspergillus oryzae*. Phytochemistry, 31, 1992, s. 3707-3709.
10. HEYMAN, E. - ERLANSEN-ALBERTSON, R. - MENTLEIN, J. - NAUSH, W. - SHOLTZ, G. - STRUCKHOFF, G. - YOSHIMOTO, T.: Dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV, EC 3.4.14.5) as an enzyme of the plasma membrane. Beiträge zur Wirkstoffforschung, 38, 1990, s. 22-37.
  11. GUO, E. J. - LAMB, CH. - DIXON, R. A.: A serine protease from suspension-cultured soybean cells. Phytochemistry, 47, 1998, s. 547-553.
  12. BENEŠOVÁ, M. - KOVÁCS, P. - SENKPIEL, K.: Aminopeptidase activity in poppy seedlings (*Papaver somniferum* L.). Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 165, 1974, s. 173-175.
  13. DOI, H. - KAWAKAMI, M.: Purification of aminopeptidase from australian classified barley flour. International Journal of Biochemistry and Cellular Biology, 29, 1997, s. 345-352.
  14. MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco culture. Physiologia Plantarum, 15, 1962, s. 473-497.
  15. STANO, J. - BEZÁKOVÁ, L. - KOVÁCS, P. - KÁKONIOVÁ, D. - LIŠKOVÁ, D.:  $\alpha$ -Galactosidase in immobilized plant cells. Pharmazie, 51, 1996, s. 245-247.
  16. BERLIN, J. - MARTIN, B. - NOVAK, J. - WHITE, L. - WRAY, V. - STRACK, D.: Effect of permeabilization on the biotransformation of phenylalanine by immobilized tobacco cell cultures. Zeitschrift für Naturforschung, 44, 1989, s. 249-254.
  17. STANO, J. - KOVÁCS, P. - PŠENÁK, M. - BARTH, A. - BENEŠ, K.: Aminopeptidases isolated from seedlings of *Cucumis sativus* L. Biológia (Bratislava), 44, 1989, s. 321-328.
  18. BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 1976, s. 248-254.
  19. DIXON, R. A.: Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: Plant cell culture. Practical Approach. Ed. Dixon, R.A. Washington D.C. : IRL Press, 1991, s. 1-20.
  20. TRINDER, P.: Determination of blood glucose using an oxide-peroxidase systems with a non-carcinogenic chromogen. Annals of Clinical Biochemistry, 6, 1969, s. 24-32.
  21. STANO, J. - KOVÁCS, P. - BLANÁRIKOVÁ, V. - BEZÁKOVÁ, V.:  $\beta$ -galaktozidáza v imobilizovaných bunkách lastovičníka. Česká a Slovenská Farmacie, 45, 1996, s. 302-304.
  22. STANO, J. - NEMEC, P. - KÁKONIOVÁ, D. - KOVÁCS, P. - NEUBERT, K. - LIŠKOVÁ, D.:  $\alpha$ -Galactosidase in immobilized cells of *Cucumis sativus* L. Biologia (Bratislava), 50, 1995, s. 279-281.
  23. STANO, J. - NEMEC, P. - WEISSOVÁ, K. - KOVÁCS, P. - KÁKONIOVÁ, D. - LIŠKOVÁ, D.: Decarboxylation of L-tyrosine and L-DOPA by immobilized cells of *Papaver somniferum*. Phytochemistry, 38, 1995, s. 859-860.
  24. KONDÁŠOVÁ, J.: Dôkaz aminopeptidáz v semenách a v klíčnych rastlinách uhoriek *Cucumis sativus* L. [Diplomová práca.] Bratislava, 1980. 68 s. - Univerzita Komenského. Farmaceutická fakulta.
  25. ROSEVEAVER, A. J.: Immobilized biocatalysts. A critical review. Journal of Chemistry and Biotechnology, 34B, 1984, s. 127-135.
  26. HAMILTON, R. - PEDERSEN, H. - CHIN, C. K.: Immobilized plant cells for the production of biochemicals. Biotechnology and Bioengineering Symposium, 14, 1984, s. 383-396.
  27. HASAL, P. - VOJTÍŠEK, V. - ČEJKOVÁ, A. - KLECZEK, P. - KOFRONOVÁ, O.: An immobilized whole yeast cell biocatalyst for enzymatic sucrose hydrolysis. Enzyme and Microbial Technology, 14, 1992, s. 221-229.
  28. STANO, J. - KOVÁCS, P. - NEMEC, P. - BENEŠOVÁ, M.: Dipeptidyl-peptidáza IV. 1. Teoretické a klinicko-diagnostické aspekty. Farmaceutický Obzor, 41, 1992, s. 395-399.
  29. TOMASCHOVÁ, J. - BUCHINGER, W. - ZEMANOVIČ, J. - HAMPEL, W.: Purifikácia a separácia extracelulárnych proteínáz *Brevibacterium linens*. Bulletin potravinárskeho výskumu, 36,

- 1997, s. 21-26.
30. LUKÁČOVÁ, V. - ZEMANOVIČ, J.: Enzymová hydrolyza proteínov pri výrobe potravín. Bulletin potravinárskeho výskumu, 37, 1998, s. 19-31.
31. FUKASE, K. - YASUKOCHI, T. - SUDA, Y. - YOSHIDA, M. - KUSUMOTO, S.: Chemoenzymatic synthesis of Gal( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Xyl( $\beta$ )-L-Ser and Gal( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Xyl( $\beta$ )-L-MU by the use of  $\alpha$ -D-galactosidase. Tetrahedron Letters, 37, 1996, s. 6763-6766.
32. ZAPROMENTOVA, O. M. - ULEZLO, I. V.: Isolation and purification of a mold  $\alpha$ -galactosidase. Biotechnology and Applied Biochemistry, 10, 1988, s. 232-341.

Do redakcie došlo 18.5.1999.

#### **The activity of the choice aminopeptidases in the immobilized cucumber cells**

NEUBERT, K. - STANO, J. - MIČIETA, K. - GRANČAI, D. - ŠAFAŘÍK, I.:  
Bull. potrav. Výsk., 38, 1999, p. 163-170.

SUMMARY. Cell suspension cultures of cucumber (*Cucumis salivus* L.) were permeabilized with Tween 80 and immobilized with glutaraldehyde. The activity pH optimum of L-arginine aminopeptidase (L-Arg-AP) and L-proline iminopeptidase (L-Pro-IP) in native and immobilized cells is 7.6 and 7.4, respectively. In the cells immobilized with glutaraldehyde the activity of the enzymes is very low in compare with native cells. Alginate jelly was applied successfully at aminopeptidase immobilization of cucumber cells.

KEYWORDS: permeabilization; immobilization; aminopeptidases; cells suspension cultures; cucumber