

## Aktivita $\alpha$ -galaktozidázy v imobilizovaných bunkách rajčiaka

JOZEF POÓR - JÁN STANO - KLAUS NEUBERT - JOZEF ČIŽMÁRIK -  
FILS ANDRIAMAINTY - NIKOLAJ BOROVKOV

**SÚHRN.** Bunky suspenznej kultúry rajčiakov (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sa permeabilizovali Tweenom 20, Tweenom 80, 30 % etanolom alebo 50 % etanolom a imobilizovali glutaraldehydom. pH optimum  $\alpha$ -galaktozidázy v imobilizovaných bunkách je 5,4 a teplotné optimum je pri 65 °C. Enzymová reakcia má lineárny priebeh 3,5 hodiny a dosahuje 70 % konverzie substrátu. Imobilizované bunky majú pomerne vysokú  $\alpha$ -galaktozidázovú aktivitu, dlhodobú stabilitu a vhodné mechanické vlastnosti.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:**  $\alpha$ -galaktozidáza, permeabilizácia, imobilizácia, rajčiak

Imobilizácia buniek, resp. enzýmov reprezentuje veľmi dôležitý spôsob uchovávanía (stabilizácie) vysoko účinných katalyzátorov (enzýmov), ktoré sú dôležité pre biotransformačné procesy [1]. Pri imobilizácii buniek obalovaním (enkapsuláciou) sa často používajú hydrogély prírodného alebo syntetického pôvodu: agar, polyakrylamid, alginát, kolagén, chitozan, polyuretán alebo celulóza [2-4]. Popri enkapsulácii sa bunky imobilizovali aj spontánnou adhéziou alebo kovalentnou väzbou buniek na povrch nosiča [5-7]. Nedávno sa bunky imobilizovali polyvinylalkoholom a glutaraldehydom [8-9] alebo Tweenom 80 a glutaraldehydom [10].

$\alpha$ -Galaktozidáza ( $\alpha$ -D-galaktozid-galaktohydroláza EC 3.2.1.22) katalyzuje hydrolyzu terminálne viazanej  $\alpha$ -galaktózy sacharidov resp. iných látok. Študovaný enzým mikrobiálneho pôvodu sa používa pri hydrolyze rafi-

---

RNDr. Jozef POÓR, EBA, s.r.o., Miletičova 23, 829 56 Bratislava.

RNDr. Ján STANO, CSc., Záhrada liečivých rastlín, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava.

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

Prof. RNDr. Jozef ČIŽMÁRIK, CSc. a RNDr. Fils ANDRIAMAINTY, CSc., Katedra farmaceutickej chémie, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava.

Dr. Nicolaj BOROVKOV, Chimičeskij institut, Rossijskaja akademija nauk, Ivanovo 153 000, Rossija.

nózy a stachyózy [11].  $\alpha$ -Galaktozidáza je hojne rozšírená aj v rastlinách. Tento zdroj enzýmu zostáva zatiaľ nepovšimnutý.

V predloženej práci sme zamerali svoju pozornosť najmä na enzýmovú hydrolýzu terminálne viazanej  $\alpha$ -galaktózy bunkami suspenznej kultúry a imobilizovanými bunkami rajčiakov (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

## **Materiál a metódy**

### *Rastlinný materiál*

Kalusové a suspenzné kultúry rajčiakov sa odvodili zo sterilných kľúčnych rastlín *Lycopersicon esculentum* Mill. na Biochemickom ústave Univerzity Martina Luthera v Halle (Dr. H. Tintemann) a pestovali na živnom médiu Murashige-Skooga podľa [12] na rotačnej trepačke v tme, za štandardných podmienok ( $23 \pm 1$  °C, 60 % relatívna vlhkosť, 120 rpm) počas 7 dní.

### *Permeabilizácia buniek*

Suspenzne pestované bunky sa po odfiltrovaní na silonovej tkanine permeabilizovali jednotlivo 5 % Tweenom 80, 5 % Tweenom 20, 30 % etanolom alebo 50 % etanolom v 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl (15g/50ml) 3 hodiny pri laboratórnej teplote za pomalého miešania (60 rpm). Potom sa bunky postupne premýli 2000 ml destilovanej vody a 3000 ml 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl.

### *Imobilizácia buniek*

Permeabilizované bunky sa preniesli 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 potom uchovávali v 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl s prídavkom konzervačných látok (pozri uchovávanie imobilizovaných buniek) v chlade (4 °C) 1-6 mesiacov.

### *Stanovenie čerstvej hmotnosti a sušiny*

Čerstvá hmotnosť a sušina suspenznej kultúry a imobilizovaných buniek sa stanovili gravimetricky po ich vysušení na konštantnú hmotnosť pri 105 °C.

### *Vplyv teploty na aktivitu enzýmu*

Vplyv teploty na aktivitu enzýmu sa sledoval v teplotnom rozsahu 20-100 °C.

### *Uchovávanie imobilizovaných buniek*

Stabilita  $\alpha$ -galaktozidázy sa v priebehu uchovávania monitorovala nasledovne prostredníctvom týchto experimentov. Imobilizované bunky sa ucho-

vávali v 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl s prídavkom nasledovných konzervačných látok:

- a) chloramfenykol 50 mg.l<sup>-1</sup>,
- b) chlór-tetracyklínhydrochloridu (CLCTC) 50 mg.l<sup>-1</sup>,
- c) (1-metyldodecyl)-dimetylamín-N-oxidu (ATDNO) 100 mg.l<sup>-1</sup> [13].

#### *Utilizácia glukózy*

Utilizácia glukózy suspenznými a imobilizovanými bunkami sa sledovala 60 minút. Bunky suspenzných kultúr a imobilizované bunky sa preniesli do kultivačného média [14] bez sacharózy s prídavkom 200 mg.l<sup>-1</sup> glukózy. Koncentrácia glukózy sa stanovila podľa Trindera [15].

#### *Stanovenie aktivity enzýmu*

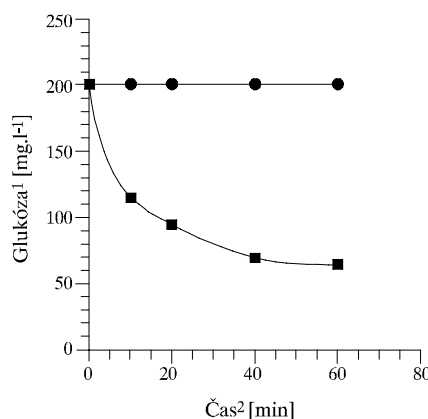
Enzýmová aktivita sa stanovila podľa Simonsa a kol. [16] za použitia *p*-nitrofenyl- $\alpha$ -D-galaktopyranozidu ( $\alpha$ -PNG) ako substrátu. Reakčná zmes obsahovala 0,1 g buniek a 0,5 mg  $\alpha$ -PNG v 2 ml McIlvainovho tlmivého roztoku pH 5,4. V kontrolnom pokuse sa použili tepelné inaktivované bunky (100 °C, 5 min). Reakčné zmesi sa ponechali 20 minút až 5 hodín pri 30 °C za stáleho pohybu (rotačná trepačka, 80 rpm). Reakcia sa zastavila pridaním 2 ml 2 mol.l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Uvoľnený *p*-nitrofenol sa stanovil spektrofotometricky pri 420 nm. Bunky sa odcentrifugovali, vysušili a enzýmová aktivita sa prepočítala na 1 g sušiny [17]. Enzýmová aktivita je vyjadrená v kataloch. Proteíny sa stanovili podľa Bradforda [18] za použitia sérumalbumínu ako štandardného proteínu.

#### *Viabilita buniek*

Viabilita buniek sa stanovila pomocou 2,3,5-trifenyltetrazóliumchloridu (TTC), fluoresceíndiacetátu alebo kyslíkovou elektródou podľa Dixona [19].

### **Výsledky a diskusia**

Bunky imobilizované obaľovaním (enkapsuláciou hydrogélmi) alginátom vápenatým sa kultivujú podobne ako suspenzné kultúry [3,4,20]. Pri imobilizácii buniek glutaraldehydom sa v porovnaní so suspenznými bunkami pozorovali výrazné zmeny. Po permeabilizácii buniek dochádza k stenčeniu bunkovej steny, plazmolýze a miernemu zhlukovaniu buniek. U buniek imobilizovaných glutaraldehydom sa pri testovaní s TTC, fluoresceíndiacetátom a meraní spotreby kyslíka nezaznamenala viabilita. Glutaraldehydom imobilizované bunky neutilizujú glukózu (obr. 1).



OBR. 1. Časový priebeh utilizácie glukózy glutaraldehydom imobilizovanými bunkami (●) a bunkami suspenznej kultúry (■).

FIG. 1. Time course of glucose utilization by cells immobilized by glutaraldehyde (●) and by cells in suspensions (■).

TABUĽKA 1. Aktivita  $\alpha$ -galaktozidázy v suspenznej kultúre a v imobilizovaných bunkách rajčiaka.

TABLE 1. The  $\alpha$ -galactosidase activity in the cell suspension and in immobilized cells of tomato.

Bunky <sup>1</sup>	Proteíny <sup>2</sup> $\frac{\text{mg}}{\text{g sušiny}^3}$	Aktivita <sup>4</sup> $\frac{\text{pkat}}{\text{g sušiny}}$	Špecifická aktivita <sup>5</sup> $\frac{\text{pkat}}{\text{mg proteínu}^6}$
Suspenzné <sup>7</sup>	17,6	5,4	0,31
Permeabilizované <sup>8</sup> :			
- Tween 20	8,9	4,2	0,47
- Tween 80	8,9	4,3	0,48
- 30 % etanol	8,8	3,2	0,36
- 50 % etanol	8,8	3,1	0,35
Imobilizované po permeabilizácii <sup>9</sup> :			
- Tween 20	8,8	4,1	0,46
- Tween 80	8,8	4,2	0,47
- 30 % etanol	8,7	3,1	0,36
- 50 % etanol	8,7	3,2	0,34

1 - cells, 2 - protein, 3 - dry weight, 4 - activity, 5 - specific activity, 6 - protein, 7 - suspension, 8 - permeabilized, 9 - immobilized after permeabilization.

Po permeabilizácii Tweenom alebo alkoholom a následnej imobilizácii glutaraldehydom nastáva výraznejší pokles obsahu proteínov a menej výrazný pokles aktivity enzýmu (tabuľka 1).

Srinivasan a kol. [21] zistili, že po permeabilizácii bunkovej steny kvasiniek dochádza k preukaznému zvýšeniu aktivity fenylalanín-amoniaklyázy (PAL). Pri permeabilizácii bunkovej steny suspenzných kultúr (rastlinných buniek) sa takéto signifikantné zvýšenie enzymovej aktivity nepozorovalo. Uvedené výsledky poukazujú na to, že permeabilizácia bunkovej steny (suspenzných kultúr rastlinného pôvodu) si vyžaduje ďalšie štúdium.

V imobilizovaných bunkách rajčiakov a iných rastlín sa pri  $\alpha$ -galaktozidáze pozoroval výraznejší pokles aktivity tohto enzýmu ako pri L-tyrozín-dekarboxyláze a L-DOPA-dekarboxyláze [10,22]. Po 4-6 mesiacoch uchovávania imobilizovaných buniek v 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl a 0,02 % azide sodnom, ako aj po pridaní konzervačných látok dochádza k vzostupu aktivity  $\alpha$ -galaktozidázy (tabuľka 2). Machová [23] a Budík [24] zistili, že glukóza a fruktóza mierne inhibujú aktivitu  $\alpha$ -galaktozidázy. Glukóza a fruktóza majú rovnaký vplyv aj na aktivitu sledovaného enzýmu v suspenznej kultúre uhoriek a maku [17,24]. Táto skutočnosť poukazuje na to, že v priebehu uchovávania imobilizovaných buniek pravdepodobne dochádza k disociácii enzým-efektorových komplexov (monosacharidov alebo iných látok), čo vedie k aktivácii enzýmu.

TABUĽKA 2. Stabilita enzýmu v imobilizovaných bunkách.  
TABLE 2. The stability of enzyme in immobilized cells.

Konzervačná látka <sup>1</sup>	% pôvodnej aktivity <sup>2</sup>				
	Doba uchovávania [mesiace] <sup>3</sup>				
	0	1	2	3	6
CLCTC (50 mg.l <sup>-1</sup> )	66	69	73	82	92
ATDNO (100 mg.l <sup>-1</sup> )	66	70	73	83	93
chloramfenykol <sup>4</sup> (50 mg.l <sup>-1</sup> )	66	70	73	84	95
azid sodný <sup>5</sup> (200 mg.l <sup>-1</sup> )	64	70	72	83	98
zamrznuté v 0,15 mol.l <sup>-1</sup> NaCl <sup>6</sup>	65	69	72	85	100

CLCTC - chlór-tetracyklín hydrochlorid, ATDNO - (1-metyldodecyl)-dimetylamin-N-oxid.  
Pôvodná aktivita = aktivita enzýmu (100 %) v suspenznej kultúre pred imobilizáciou.

CLCTC - chlorotetracycline hydrochloride, ATDNO - (1-methyldodecyl)-dimethylamin-N-oxide.  
Original activity = enzyme activity (100 %) in cell suspension without immobilization.

1 - preservative, 2 - % of original activity, 3 - storage time [months], 4 - chloramphenicol, 5 - sodium azide, 6 - frozen in 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl.

pH optimum enzýmu v suspenznej kultúre a v imobilizovaných bunkách je 5,4. Hydrolyza má lineárny priebeh 3,5 hodiny, dosahuje 70 % konverzie substrátu a potom sa spomaľuje. Teplotné optimum enzýmu v imobilizovaných bunkách je pri 65 °C.

Inhibičný efekt kyseliny *p*-chlórmerkuribenzoovej  $0,1-0,5 \cdot 10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup> možno odstrániť pridaním  $5-10 \cdot 10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup> 2-merkaptotanolu,  $5-10 \cdot 10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup> cysteínu alebo  $5-10 \cdot 10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup> ditiotreitolu, čo poukazuje na to, že -SH skupiny sú pre enzýmovú aktivitu nevyhnutné [17,22-24].

Imobilizáciou buniek rajčiakov a iných rastlín glutaraldehydom a ich uchovávaním v 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl s 0,02 % azidom sodným resp. inými konzervačnými látkami sa v nich dlhodobo uchováva aktivita niektorých enzýmov [17,22,25].

Tieto výsledky poukazujú na to, že enzýmovú aktivitu  $\alpha$ -galaktozidázy v bunkách imobilizovaných glutaraldehydom by bolo možné využiť v biotechnológii niektorých sacharidov (rafinózy, stachyózy a iných) [17,25], pri štúdiu štruktúry oligo- a polysacharidov, prípadne glykoproteínov [26,27].

#### Podakovanie

Za poskytnuté suspenzné kultúry rajčiaka ďakujeme p. RNDr. Herbertovi Tintemannovi, CSc. z Biochemického ústavu Univerzity Martina Luthera v Halle.

### Literatúra

1. KLIBANOV, A. M.: Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science*, 219, 1983, s. 722-727.
2. TAMPION, J. - TAMPION, M. D.: Immobilized cells. Principles and applications. Cambridge, Cambridge University Press, 1987. 324 s.
3. JEN, A. C. - WAKE, M. C. - MIKOS, A. G.: Review. Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 1996, s. 357-364.
4. HULST, A. C. - TRAMPER, J.: Immobilized plant cells: A literature survey. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 1989, s. 546-558.
5. CABRAL, J. M. S - CADETE, M. M. - NOVAIS, J. M - CARDOSO, J. P.: Immobilized of yeast cells on transition metal-activated pumice stone. *Annals of New York Academy of Science*, 434, 1984, s. 483-486.
6. PARASCANDOLA, P. - SCARDI, V. - TARTAGLIONE, O.: Immobilization of yeast cells by adhesion on tuff granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26, 1987, s. 507-510.
7. ROGALSKI, J. - LOBARZEWSKI, J.: The purification and immobilization of *Penicillium notatum*  $\alpha$ -galactosidase. *Acta Biotechnologica*, 15, 1995, s. 211-222.
8. HASAL, P. - VOJTÍŠEK, V. - ČEJKOVÁ, A. - KLECZEK, P. - KOFROŇOVÁ, D.: An immobilized whole yeast cell biocatalyst for enzymatic sucrose hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 1992, s. 221-229.

9. WU, K. Y. A. - WISECARVER, K. D.: Cell immobilization using PVA crosslinked with boric acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 1992, s. 447-449.
10. 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.
11. KANEKO, R. - KUSABE, I. - SAKAI, Y. - MURAKAMI, K.: Substrate specificity of  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Agriculture and Biological Chemistry*, 54, 1990, s. 237-238.
12. BLANÁRIKOVÁ, V. - BENEŠOVÁ, M. - ŠULKOVÁ, A. - PŠENÁK, M.: Callus culture of *Chelidonium majus* L. *Biológia*, 51, 1996, s. 76.
13. DEVÍNSKY, F. - MLYNÁRČÍK, D. - LACKO, I. - KRASNEC, L.: Antibacterial activity of some ammonium salts of 11-aminoundecanoic acid. Part 5. Organic ammonium salts. *Pharmazie*, 34, 1979, s. 574-576.
14. MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 1962, s. 473-497.
15. TRINDER, P.: Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase systems with a non-carcinogenic chromogen. *Annals of Clinical Biochemistry*, 6, 1969, s. 24-32.
16. SIMONS, G. - GIANNAKOULOS, T. - GEORGATSOS, J. G.: Plant  $\alpha$ -galactosidases: Purification by affinity chromatography and properties. *Phytochemistry*, 28, 1989, s. 2587-2592.
17. STANO, J. - NEMEC, P. - KÁKONIOVÁ, D. - KOVÁCS, P. - NEUBERT, K. - LIŠKOVÁ, D.:  $\alpha$ -Galactosidase in immobilized cells of *Cucumis sativus* L. *Biologia*, 50, 1995, s. 279-281.
18. BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein 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. A Practical Approach*. Ed. R. A. Dixon. Oxford, Washington, Washington IRL Press 1991, s. 1-20.
20. FURUYA, T. - YOSHIKAWA, T. - TAIRA, M.: Biotransformation of codeinone to codeine by immobilized cells of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 23, 1984, s. 999-1001.
21. SRINIVASAN, NAGAJYOTHI, A. R. - GOWDA, L. R. - BHAT, S. G.: Phenylalanine ammonia-lyase activity in permeabilized yeast cells (*Rhodotorula glutinis*). *Biotechnology Techniques*, 8, 1994, s. 729-732.
22. STANO, J. - BEZÁKOVÁ, L. - KOVÁCS, P. - KÁKONIOVÁ, D. - LIŠKOVÁ, D.:  $\alpha$ -Galactosidase in immobilized plant cells. *Pharmazie*, 51, 1996, s. 245-247.
23. MACHOVÁ, B.: Dôkaz a štúdium niektorých vlastností  $\alpha$ -galaktozidázy v kľúčnych rastlinách uhoriek *Cucumis sativus* L. [Diplomová práca.] Bratislava 1984. 84 s. - Univerzita Komenského. Farmaceutická fakulta.
24. BUDÍK, D.:  $\alpha$ -Galaktozidáza v suspenzných kultúrach maku (*Papaver somniferum* L.) [Diplomová práca.] Bratislava 1991. 46 s. - Univerzita Komenského. Farmaceutická fakulta.
25. STANO, J. - KOVÁCS, P. - NEUBERT, K. - BLANÁRIKOVÁ, V. - ANDRIAMAINTY, F.:  $\alpha$ -Galaktozidáza v imobilizovaných bunkách zemežľče. *Farmaceutický obzor*, 46, 1997, s. 222-224.
26. 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( $\beta$ )-MU by the use of  $\alpha$ -D-galactosidase. *Tetrahedron Letters*, 37, 1996, s. 6763-6766.
27. ZAPROMENTOVA, O. M. - ULEZLO, I. V.: Isolation and purification of a mold  $\alpha$ -galactosidase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10, 1988, s. 232-241.

Do redakcie došlo 22.7.1998.

**Activity of  $\alpha$ -galactosidase in immobilized tomato cells**

POÓR, J. - STANO, J. - NEUBERT, K. - ČIŽMÁRIK, J. - ANDRIAMAINTY, F. - BOROVKOV, N.:  
Bull. potrav. Výsk., 37, 1998, p. 127-134.

**SUMMARY.** The cell suspension culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) was permeabilized with Tween 20, Tween 80, 30 % ethanol and 50 % ethanol respectively, and immobilized with glutaraldehyde.  $\alpha$ -Galactosidase in immobilized cells showed a pH optimum at 5,4 and temperature optimum at 65 °C. The enzyme hydrolysis was linear within 3,5 h and reached 70 % conversion of the substrate. The immobilized cells are characterized with a high enzyme activity, longterm stability and convenient physico-mechanical properties.

**KEYWORDS:**  $\alpha$ -galactosidase, permeabilization, immobilization, tomato