

Dôkaz a stanovenie extracelulárnej invertázy v suspenzných kultúrach mrkvy

JÁN STANO - KAROL MIČIETA - VÍTAZOSLAVA BLANÁRIKOVÁ
- PETER MATEJKA - MILENA VARADÍNOVÁ - ALEXANDER V. KOLESNIKOV

SÚHRN. Na dôkaz invertázy (β -D-fruktofuranozidáza, EC 3.2.1.26), ako aj na stanovenie jej enzýmovej aktivity, sa použila jednoduchá a rýchla metóda stanovenia glukózy. Ako zdroj extracelulárnej frakcie invertázy sa použilo kultivačné médium, v ktorom sa pestovali suspenzné kultúry mrkvy obyčajnej (*Daucus carota* L. cv. Kalisto). Zdrojom intracelulárnej frakcie boli homogenizované bunky suspenznej kultúry. Stanovilo sa množstvo uvoľňovanej glukózy zo substrátu - sacharózy. Distribúcia invertázovej aktivity bola: 421 nkat.g⁻¹ sušiny (88,6 %) v intracelulárnej frakcii a 52 nkat.g⁻¹ sušiny (11,4 %) v extracelulárnej frakcii. Špecifická aktivita intracelulárneho enzýmu bola 5,9-krát vyššia ako špecifická aktivita extracelulárneho enzýmu.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: intracelulárna invertáza; extracelulárna invertáza; suspenzné kultúry; mrkva

Zdroje mnohých prírodných látok sú limitované a preto sa v posledných dekádach hľadajú nové možnosti ich prípravy. Semisyntetická príprava týchto látok je pomerne náročná a nákladná. Pri riešení uvedeného problému nachádzajú vhodné uplatnenie početné biotechnológie. Biotechnologická príprava vzácnych čistých látok je známa iba v ostatnom čase. Poznatky

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

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

RNDr. Víťazoslava BLANÁRIKOVÁ, Katedra molekulárnej a subcelulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava.

PharmDr. Peter MATEJKA, Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava.

PharmDr. Milena VARADÍNOVÁ, Fakultná lekáreň, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava.

Ing. Alexander V. KOLESNIKOV, Farmbiomedservis, ul. Seľskochozajstvenaja 12a, 129 226 Moskva.

Korešpondujúci autor: RNDr. Ján STANO, CSc., e-mail: stano@fpharm.uniba.sk

o totipotencii a zvládnutí kultivačných techník sa úspešne aplikovali v poľnohospodárstve pri mikropropagácii rastlín. Dokázalo sa, že rastlinné bunky sa môžu použiť pri biosyntéze a biotransformácii rôznych látok prírodného a syntetického pôvodu [1,2].

Voľné alebo imobilizované enzýmy, prípadne živočíšne alebo rastlinné bunky, reprezentujú dôležitú cestu produkcie účinných enzýmových katalyzátorov aplikovateľných v mnohých procesoch priemyselného významu [1,2].

Invertáza (β -D-fruktofuranozidáza, EC 3.2.1.26), nazývaná aj sacharáza, katalyzuje hydrolýzu sacharózy na glukózu a fruktózu. Študovaný enzým sa používa aj pri výrobe invertných sacharidov (zo sacharózy) s následnou možnosťou prípravy fruktózových prípravkov.

Rozvoj mnohých metód dôkazu a stanovenia aktivity biokatalyzátorov je úzko spojený s progresom biotechnologických procesov [3,4]. Napriek tomu, že invertáza je prítomná aj v rastlinách, tento zdroj enzýmu sa doposiaľ nevyužíva.

Po dôkaze exkrécie α - a β -galaktozidázy bunkami suspenzných kultúr rastlinného pôvodu [5] sme zamerali svoju pozornosť aj na potenciálnu prítomnosť invertázy v suspenzných kultúrach.

Materiál a metódy

Rastlinný materiál

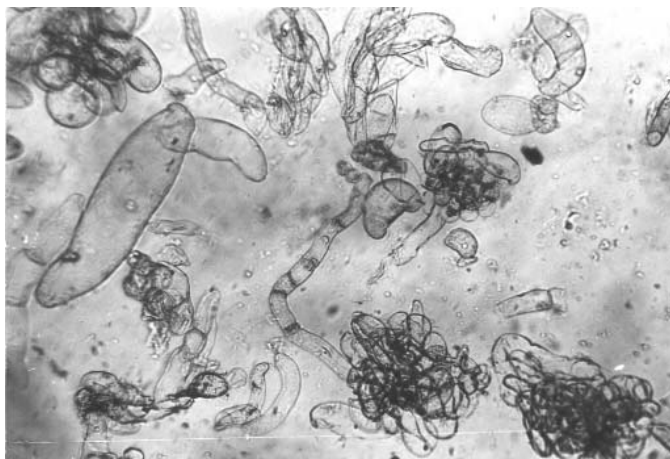
Kalusové a suspenzné kultúry mrkvy obyčajnej (*Daucus carota* L. cv. Kalisto) sa odvodili z klíčnych rastlín v sterilných podmienkach (obr. 1). Uvedené kultúry sa pestovali v kultivačnom médiu podľa Murashigeho a Skooga [6] na rotačnej trepačke pri štandardných podmienkach (23 ± 1 °C, 60 % relatívnej vlhkosti, pri difúznom osvetlení a 100 ot/min) počas 10 dní.

Stanovenie čerstvej hmotnosti a sušiny

Čerstvá hmotnosť a sušina suspenznej kultúry sa stanovili gravimetricky po ich vysušení do konštantnej hmotnosti pri 100 °C.

Dôkaz a stanovenie aktivity intra- a extracelulárnej invertázy

Pri štúdiu aktivity intra- a extracelulárnej invertázy sa použil prirodzený substrát - sacharóza. Ako zdroj intracelulárnej frakcie enzýmu sa použili bunky suspenznej kultúry, pričom kultivačné médium slúžilo ako zdroj extracelulárnej frakcie invertázy. Suspenzne kultivované bunky sa po odfiltrovaní na silónovej tkanine (10 g) premyli 2000 ml destilovanej vody. Takto premy-



OBR. 1. Bunky mrkvy v suspenznej kultúre (600x).
FIG. 1. Cells of carrot in suspension culture (600x).

té bunky sa homogenizovali vo vychladenej trecej miske s McIlvainovým tlmiacim roztokom pH 4,5 pri 4 °C v pomere 1:1 (g.ml⁻¹). Homogenizát sa prefiltraval a odcentrifugoval pri 150000 m.s⁻², 15 min pri 4 °C a supernatant sa použil na stanovenie aktivity intracelulárnej frakcie enzýmu.

Pri dôkaze a stanovení extracelulárnej frakcie enzýmu sa použilo kultivačné médium bez buniek, ktoré sa odstránili centrifugáciou (150000 m.s⁻², 15 min, 4 °C).

Stanovenie aktivity enzýmu

Enzymová aktivita sa sledovala modifikovanou metódou podľa Trindera [7] pomocou testovacích prúžkov na stanovenie glukózy (Intes Poprad s. r. o., Slovenská republika) a meracieho prístroja Accutrend firmy F. Hoffmann - La Roche Ltd. (Spolková republika Nemecko).

Reakčná zmes obsahovala vhodné množstvo supernatantu s obsahom enzýmu (0,1–0,3 ml), sacharózu (0,04 mM) v celkovom objeme 2 ml McIlvainovho roztoku, pH 4,5. Zmes sa inkubovala 60 min pri 30 °C. V kontrolnom pokuse sa použili tepelne inaktivované bunky a kultivačné médium (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 enzymovou hydrolýzou sacharózy. Enzymová aktivita je vyjadrená v kataloch. Uvádzané výsledky (aritmetický priemer

z troch paralelných stanovení) hodnotíme v rozsahu špecifickosti, citlivosti a reprodukovateľnosti uvedenej metódy kvantifikácie glukózy. Jej veľkou výhodou je jednoduchosť a rýchlosť stanovenia.

Stanovenie proteínov

Obsah proteínov bol určovaný v homogenizáte izolovaných buniek a v kultivačnom médiu metódou podľa Bradforda [8].

Výsledky a diskusia

Na histochemické i biochemické štúdium hydrolytických enzýmov sa výhodne využívajú rôzne chromogénne syntetické substráty. Takéto substráty na štúdium invertázy doposiaľ nie sú k dispozícii a preto sa pri ňom používa sacharóza. Keďže nitrofenyl- β -D-fruktofuranozid a naftyl- β -D-fruktofuranozid sa synteticky nepripravujú, pri štúdiu invertázy sa používa iba prírodný substrát - sacharóza.

Enzýmový preparát pripravený homogenizáciou suspenzie kultivovaných buniek mrkvy po 10 dňoch kultivácie sa použil pri štúdiu intracelulárnej frakcie. Kultivačné médium (bez buniek, obsah sacharidov v médiu je korigovaný vo výpočtoch) sa použilo pri dôkaze a stanovení extracelulárnej frakcie invertázy. Distribúcia intra- a extracelulárnej invertázy je prezentovaná v tab. 1.

TAB. 1. Aktivita invertázy v bunkách suspenznej kultúry mrkvy a v kultivačnom médiu.

TAB. 1. Invertase activity in cell suspension and in cultivation medium of carrot.

Frakcia ¹	Proteíny [mg.g ⁻¹ sušiny] ²	Aktivita [nkat.g ⁻¹ sušiny] ³	Špecifická aktivita [nkat.mg ⁻¹ proteínov] ⁴
Intracelulárna (homogenizát izolovaných buniek) ⁵	6,6 \pm 0,62	421 \pm 4,28	63,79
Extracelulárna (kultivačné médium bez buniek) ^{6*}	4,8 \pm 0,68	52 \pm 3,82	10,83

* - zodpovedajúca obsahu izolovaných buniek

* - corresponding to the amount of isolated cells.

1 - fraction, 2 - proteins [mg.g⁻¹ of dry weight], 3 - activity [nkat.g⁻¹ of dry weight], 4 - specific activity [nkat.mg⁻¹ of proteins], 5 - intracellular (homogenate of isolated cells), 6 - extracellular (cultivation medium without cells).

Prevažná časť invertázy - 88,6 % (intracelulárna frakcia) je lokalizovaná v bunkách suspenznej kultúry. Minoritná časť - 11,4% je vylučovaná do média (extracelulárna frakcia). Špecifická aktivita intracelulárnej frakcie je 5,9-krát vyššia ako špecifická aktivita extracelulárnej frakcie.

Pri porovnávaní distribúcie intra- a extracelulárnej aktivity galaktozidázy a invertázy možno konštatovať, že bunky suspenzných kultúr exkretujú do kultivačného média oveľa menej invertázy ako galaktozidázy [9].

Hamilton a kol. [10] zistili, že pletivové kultúry petúnie, mrkvy a bôbu využívajú sacharózu po jej transformácii na glukózu a fruktózu. Bunky využívajú najskôr glukózu a až potom fruktózu.

V prítomnosti glukózy a fruktózy dochádza k miernej inhibícii invertázy [11,12]. Isla a kol. [13] konštatujú, že fruktóza je kompetitívnym a glukóza nekompetitívnym inhibítorom študovaného enzýmu. Bližšie objasnenie tohto fenoménu si však vyžaduje ďalšie štúdium.

Na základe uvedených skutočností možno očakávať, že pri príprave invertných sacharidov (zo sacharózy) nájde uplatnenie aj invertáza rastlinného pôvodu. Invertáza a iné glykozidázy sa môžu perspektívne využiť aj pri biotransformácii farmaceuticky a potravinársky dôležitých látok [3, 4, 13, 14], pri testovaní potenciálnych chemoterapeutík [15-19], ako aj pri enzýmovej charakterizácii niektorých prírodných látok.

Problematika štúdia ostatných extracelulárnych rastlinných glykozidáz bude predmetom ďalšieho štúdia. Predpokladáme, že cenným prínosom by mohla byť aj vhodná aplikácia výsledkov génového inžinierstva v oblasti modifikovaných enzýmov.

S evidentným nárastom civilizačných ochorení s poruchami metabolizmu, napríklad diabetes mellitus, je potrebná popri terapii aj vhodná úprava diéty s nízkym obsahom glukózy a jej prekursorov. Na základe uvedených skutočností predpokladáme, že fruktózové prípravky nájdu vhodné uplatnenie v tvorbe a výrobe potravinárskych doplnkov.

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. WEISSOVÁ, K. - STANO, J. - NEUBERT, K. - KÁKONIOVÁ, D. - KOVÁCS, P. - MIČIETA, K. - LIŠKOVÁ, D.: Immobilized plant cells in the biotransformation of some precursors of alkaloids and glycosides. *Horticulture Science*, 28, 2001, s. 151-145.
3. MANSFELD, J. - SCHELLENBERGER, A. - RÖMBACH, J.: Application of polystyrene-bound invertase to continuous sucrose hydrolysis on pilot scale. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1992, s. 997-1003.

4. SCHLEE, D. - KLEBER, H. P.: Biotechnologie 2. Jena : Gustav Fischer Verlag, 1991. 1096 s.
5. STANO, J. - KOVÁCS, P. - MIČIETA, K. - NEUBERT, K. - TINTEMANN, H. - KOREŇOVÁ, M.: Localisation and measurement of extracellular plant galactosidases. Acta histochemica (in press).
6. MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco culture. Physiologia Plantarum, 15, 1962, s. 473-497.
7. TRINDER, P.: Determination of blood glucose using oxidase-peroxidase with a non-carcinogenic chromogen. Annals of Clinical Biochemistry, 6, 1969, s. 24-32.
8. BRADFORD, 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.
9. STANO, J. - MIČIETA, K. - NEUBERT, K. - LUCKNER, M. - ADAM, R.: A simple method for the identification and assay of extracellular plant α -galactosidase. Pharmazie, 57, 2002, s. 176-177.
10. HAMILTON, R. - PEDERSEN, H. - CHIN, C. K.: Immobilized plant cells for the production of biochemicals. Biotechnology and Bioengineering Symposium, 14, 1984, s. 383-396.
11. KOVÁČIKOVÁ, M.: Izolácia a charakterizácia niektorých vlastností sacharázy maku (*Papaver somniferum* L.). [Diplomová práca.] Bratislava : Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, 1981. 48 s.
12. MIKLOVÁ, A.: Niektoré aspekty tvorby ópiových alkaloidov imobilizovanými bunkami maku [Diplomová práca.] Bratislava : Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, 1995. 41 s.
13. ISLA, M. I. - SALERMO, G. - PONTIS, H. - VATTUONE, M. A. - SAMPIETRO, A. R.: Purification and properties of the soluble acid invertase from *Oryza sativa*. Phytochemistry, 38, 1995, s. 321-325.
14. BIELECKI, S. - SOMIARI, R. T.: Synthesis of oligosaccharides by β -fructofuranosidase in biphasic medium containing organic solvent as bulk phase. Biocatalysis and Biotransformation, 17, 1996, s. 217-231.
15. EL ASHRY, E. S. H. - RASHED, N. - SHOBIER, A. S. H.: Glycosidase inhibitors and their chemotherapeutic value, Part 1. Pharmazie, 55, 2000, s. 251-262.
16. EL ASHRY, E. S. H. - RASHED, N. - SHOBIER, A. S. H.: Glycosidase inhibitors and their chemotherapeutic value, Part 2. Pharmazie, 55, 2000, s. 331-348.
17. MUČAJI, P. - GRANČAI, D. - NAGY, M. - CZIGLEOVÁ, S. - UBIK, K.: Obsahové látky konárikov *Phylladelphus coronarius* L. Farmaceutický obzor, 70, 2001, s. 311-314.
18. WATSON, A. A. - FLEET, W. J. - ASANO, N. - MOLYNEUX, R. J. - NASH, R.: Polyhydroxylated alkaloids - natural occurrence and therapeutic applications. Phytochemistry, 56, 2001, s. 265-295.
19. BAO, X. F. - WANG, X. S. - DONG, Q. - FANG, J. N. - LI, X. Y.: Structural features of immunologically active polysaccharides from *Gonoderma lucidum*. Phytochemistry, 59, 2002, s. 175-179.

Do redakcie došlo 9.10.2002.

Identification and determination of extracellular invertase in suspension cultures of carrot

STANO, J. - MIČIETA, K. - BLANÁRIKOVÁ, V. - MATEJKA, P. - VARADÍNOVÁ, M.
- KOLESNIKOV, A. V.: Bull. potrav. Výsk., 41, 2002, p. 179-185.

SUMMARY. A simple and rapid method of the determination of glucose was used for the identification of invertase (β -D-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) as well as for the determination of its enzymatic activity. Culture medium, in which cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L. cv. Kalisto) were grown, were used as a source of the extracellular fraction of the enzyme. Homogenized cells of the suspension culture were used as a source of the intracellular fraction. The amount of glucose released from the sucrose substrate was determined. Distribution of the invertase activity was: 421 nkat.g⁻¹ dry matter (88.6 %) in the intracellular fraction and 52 nkat.g⁻¹ dry matter (11.4 %) in the extracellular fraction. The specific activity of the intracellular enzyme was 5.9-times higher than that of the extracellular one.

KEYWORDS: intracellular invertase; extracellular invertase; suspension cultures; carrot