

## Aktivita invertázy v imobilizovaných bunkách mrkvy

KAROL MIČIETA - JÁN STANO\* - VÍŤAZOSLAVA BLANÁRIKOVÁ  
- EMIL HAVRÁNEK - FILS ANDRIAMAINTY - NINA BIRJUKOVA  
- SVETLANA IGNATOVA - IVO ŠAFAŘÍK

**SÚHRN.** Suspenzné kultúry mrkvy (*Daucus carota* L. cv. Kalisto) sa permeabilizovali Tweenom 20, Tweenom 80, 30 % etanolom, 50 % etanolom, hexadecyltrimetylamóniumbromidom a imobilizovali glutaraldehydom. V suspenznej kultúre a imobilizovaných bunkách je pH optimum invertázy 4,5; teplotné optimum je pri 53 °C. Enzýmová hydrolyza má lineárny priebeh počas 4 h a konverzia dosahuje 66 %. Imobilizované bunky majú vysokú aktivitu invertázy a výhodné mechanické vlastnosti.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** permeabilizácia; imobilizácia; invertáza; mrkva

V súčasnosti existujú početné metódy fixácie biokatalyzátorov (enzýmov) nevyhnutných pre biotransformačné procesy [1]. Jednou z najčastejšie používaných imobilizačných techník je obaľovanie (enkapsulácia) buniek. Pri tejto metóde sa používajú gély tak prírodného, ako aj syntetického pôvodu: agar, agaróza, karagénan, celulóza alebo polyakrylamid, polyuretán [2,3]. Enzýmy a bunky sa imobilizujú tiež adhézne a kovalentne [4,5]. Pri kovalentnej imobilizácii enzýmov a buniek sa v ostatných rokoch úspešne aplikoval aj gluta-

---

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

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

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

Prof. RNDr. Emil HAVRÁNEK, CSc., Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava.

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

Ing. Nina BIRJUKOVA, DrSc., Ing. Svetlana IGNATOVA, DrSc., Vserossijskij naučno-issledovatel'skij institut svoščesvodstva, Novomytinskij prospekt 82, 141 018 Mytiši, Rossia.

Doc. Ing. Ivo ŠAFAŘÍK, CSc., Ústav ekológie krajiny, Laboratórium biochémie a biotechnológie, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika.

raldehyd [6-8]. Imobilizované mikroorganizmy sa používajú aj pri výrobe invertných sacharidov (zo sacharózy) s následnou možnosťou prípravy fruktózových prípravkov [9,10].

Rozvoj nových metód fixácie biokatalyzátorov úzko súvisí so súčasným pokrokom v biotechnológii. Keďže bunková stena spomaľuje transport mnohých látok do bunky i z nej, sledovali sa aj možnosti jej permeabilizácie. Predpokladáme, že imobilizované bunky rastlinných kultúr nájdu v biotechnologických procesoch podobné uplatnenie ako početné mikroorganizmy.

V predloženej práci sme zamerali svoju pozornosť na sledovanie vplyvu permeabilizácie na enzýmovú hydrolýzu sacharózy v imobilizovanej suspenznej kultúre buniek mrkvy.

## **Materiál a metódy**

### *Rastlinný materiál*

Kalusové a suspenzné kultúry mrkvy obyčajnej (*Daucus carota* L. cv. Kalisto) sa odvodili z klíčnych rastlín mrkvy za sterilných podmienok. Uvedené kultúry sa pestovali na živnom médiu podľa Murashigeho a Skooga [11] na rotačnej trepačke pri štandardných podmienkach ( $23 \pm 1$  °C, 60 % relatívnej vlhkosti, pri difúznom osvetlení a 100 ot.min<sup>-1</sup>) počas 10 dní. V pokusoch, kde bola sacharóza nahradená v živnom médiu inými sacharidmi, sa tieto sacharidy použili v ekvimolárnej koncentrácii.

### *Permeabilizácia buniek*

Suspenzne pestované bunky sa odfiltrovali na silónovej tkanine. Z nich sa 10 g suspendovalo v 50 ml 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl s prídavkom:

- a) 5 % Tween 20,
- b) 5 % Tween 80,
- c) 30 % etanolu,
- d) 50 % etanolu a 0,1 % hexadecyltrimetylamóniumbromidu.

Bunky sa imobilizovali za pomalého miešania (30 ot.min<sup>-1</sup>, 25 °C), 3 h. Po imobilizácii sa bunky odfiltrovali, premyli 2000 ml destilovanej vody a 3000 ml 0,15 mol.l<sup>-1</sup> NaCl.

### *Imobilizácia buniek*

Permeabilizované bunky sa následne suspendovali v 50 ml 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaCl a imobilizovali glutaraldehydom priečnym zosieťovaním podľa Póor

a kol. [8]. Takto 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>).

#### *Stanovenie čerstvej hmotnosti a sušiny*

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

#### *Vplyv teploty a niektorých sacharidov na aktivitu enzýmu*

Vplyv teploty na aktivitu enzýmu sa sledoval v tepelnom rozsahu 20 °C až 100 °C. Efekt celobiózy, glukózy, fruktózy, galaktózy a glukonolaktónu: 1.10<sup>-3</sup>; 5.10<sup>-3</sup>; 10.10<sup>-3</sup> a 20.10<sup>-3</sup> mol.l<sup>-1</sup> na aktivitu sacharázy sa sledoval v suspenznej kultúre a v imobilizovaných bunkách.

#### *pH optimum enzýmu*

Pri sledovaní vplyvu tlmivého roztoku na aktivitu invertázy sa použil McIlvainov tlmivý roztok s pH 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9 a 5,0.

#### *Stanovenie aktivity enzýmu a viability buniek*

Pri stanovení enzýmovej aktivity invertázy sa použil prirodzený substrát - sacharóza. Enzýmová aktivita sa stanovila modifikovanou metódou podľa Trindera [12]. Reakčná zmes obsahovala 0,1 g buniek (čerstvej hmotnosti), 40.10<sup>-3</sup> mol.l<sup>-1</sup> sacharózy v 2 ml McIlvainovho tlmivého roztoku pH 4,5. Zmes sa inkubovala 1 h až 5 h pri 30 °C. V kontrolnom pokuse sa použili tepelne inaktivované bunky (10 min pri 100 °C). Po skončení inkubácie sa bunky oddelili (centrifugácia), vysušili a enzýmová aktivita sa vyjadřila na 1 g sušiny. Enzýmová aktivita je vyjadřená v kataloch. Proteíny sa stanovili podľa Bradforda [13].

Viabilita buniek sa stanovila podľa Dixona [14] s 2,3,5-trifenyltetrazoliumchloridom (TTC), flouresceíndiacetátom, pomocou kyslíkovej elektródy.

#### *Utilizácia glukózy*

Utilizácia glukózy suspenznými a imobilizovanými bunkami sa sledovala 60 min. Bunky suspenzných kultúr a imobilizované bunky (0,1 g čerstvej hmotnosti) sa preniesli do kultivačného média [11] bez sacharózy s prídavkom 200 mg.l<sup>-1</sup> glukózy. Koncentrácia glukózy sa stanovila podľa Trindera [12].

## Výsledky a diskusia

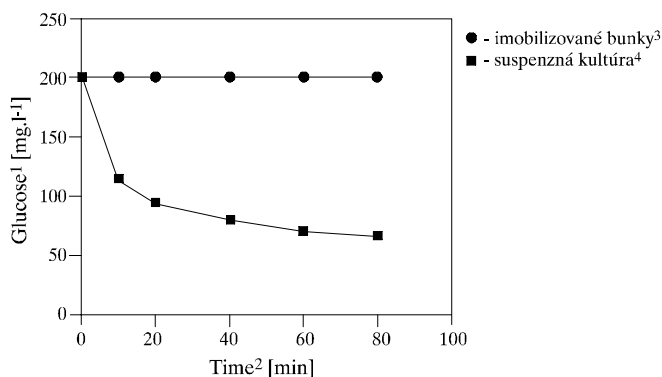
Imobilizácia izolovaných enzýmov, permeabilizácia a následná imobilizácia buniek má široké uplatnenie v technológii [2].

Po imobilizácii buniek glutaraldehydom dochádza k plazmolýze, a miernemu zhlukovaniu buniek. Takto imobilizované bunky pri skúšaní s 2,3,5-trifenyltetrazoliumchloridom, fluoresceíndiacetátom a pri meraní spotreby kyslíka nepreukázali viabilitu [8,15]. Glutaraldehydom imobilizované bunky neutilizujú glukózu (obr. 1).

Po permeabilizácii Tweenom, etanolom, alebo hexadecyltrimetylamóniumbromidom a následnej imobilizácii glutaraldehydom dochádza k výraznejšiemu poklesu proteínov a menej preukaznému zníženiu aktivity enzýmu (tab. 1).

Srinivasan-Nagajyothy a kol. [16] zistili, že permeabilizácia bunkovej steny kvasiniek vedie k preukaznému zvýšeniu aktivity fenylalanínamoniak-lyázy (PAL). Pri permeabilizácii bunkovej steny suspenzných kultúr (rastlinných buniek) sa takéto zvýšenie enzýmovej aktivity nepozorovalo. Prezentované výsledky naznačujú, že permeabilizácia bunkovej steny (suspenzných kultúr rastlinného pôvodu) si vyžaduje ďalšie štúdium.

Sacharóza je pravdepodobne najčastejšie používaným zdrojom uhlíka a energie pri kultivácii kalusových a suspenzných kultúr [11,17]. V uvedenom experimente sme paralelne nahradili sacharózu v ekvimolárnej koncentrácii glukózou, fruktózou, galaktózou, glukonolaktómom a trehalózou.



OBR. 1. Časový priebeh utilizácie glukózy v bunkách imobilizovaných glutaraldehydom a v bunkách suspenznej kultúry.

FIG. 1. Course of glucose utilization in cells immobilized with glutaraldehyde and in cell suspension culture.

1 - glucose, 2 - time, 3 - immobilized cells, 4 - cell suspension culture.

TABUĽKA 1. Aktivita invertázy v suspenznej kultúre a v imobilizovaných bunkách mrkvy.  
TABLE 1. Invertase activity in cell suspension culture and in immobilized cells of carrot.

Bunky <sup>1</sup>	Proteíny [mg/g sušiny] <sup>2</sup>	Aktivita [nkat/g sušiny] <sup>3</sup>	Špecifická aktivita [nkat/mg proteínov] <sup>4</sup>
Suspenzné <sup>5</sup>	6,9	432	62,6
Permeabilizované <sup>6</sup>			
0,1 % HTAB	4,8	615	128,1
5 % Tween 20	4,8	512	106,6
5 % Tween 80	4,8	520	108,3
30 % etanol	4,8	412	85,8
50 % etanol	4,8	408	85,0
Imobilizované po permeabilizácii <sup>7</sup>			
0,1 % HTAB	4,6	410	89,1
5 % Tween 20	4,7	342	72,7
5 % Tween 80	4,7	348	74,1
30 % etanol	4,7	280	59,5
50 % etanol	4,7	276	58,7

HTAB - hexadecyltrimetylamóniumbromid.

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

Výsledky tohto pokusu ukázali, že v prítomnosti galaktózy dochádza k značnému zvýšeniu aktivity invertázy, kým v prítomnosti glukózy a fruktózy dochádza k preukaznému poklesu aktivity skúmaného enzýmu (tab. 2). Kultivácia suspenznej kultúry v prítomnosti galaktózy vedie k indukcii aktivity sledovanej hydrolázy. Bližšie objasnenie uvedeného fenoménu si vyžaduje ďalšie štúdium.

Hamilton a kol. [17] zistili, že pletivové kultúry využívajú sacharózu po jej transformácii na glukózu a fruktózu. Bunky využívajú najskôr glukózu a až potom fruktózu.

pH optimum študovaného enzýmu v suspenznej kultúre a v imobilizovaných bunkách je 4,5. Podobné pH optimum 4,4–4,5 sa zistilo u invertázy v kľúčnych rastlinách, v suspenznej kultúre a v imobilizovaných bunkách maku [18,19]. Hydrolýza má lineárny priebeh 4 h, dosahuje 66 %-nú konverziu a následne retarduje. Tepelné optimum enzýmu v imobilizovaných bunkách je pri 53 °C. Podobné vlastnosti vykazovala aj  $\beta$ -galaktozidáza [8].

Hodnota zdanlivej Michaelis-Mentenovej konštanty (vypočítaná z Michaelisovej rovnice po jej úprave na rovnicu priamky [18,19]) v imobili-

TABUĽKA 2. Vplyv niektorých sacharidov na aktivitu invertázy  
v suspenznej kultúre a v imobilizovaných bunkách.  
TABLE 2. Influence of individual saccharides upon invertase activity  
of suspension culture and immobilized cells.

Sacharid <sup>1</sup>	% relatívnej aktivity <sup>2</sup>	
	suspenzná kultúra <sup>3</sup>	imobilizované bunky <sup>4</sup>
0	100	100
Glukóza <sup>5</sup>	76	75
Fruktóza <sup>6</sup>	65	66
Galaktóza <sup>7</sup>	155	156
Glukonolaktón <sup>8</sup>	94	95
Trehalóza <sup>9</sup>	96	97

1 - sacharide, 2 - relative activity, 3 - cell suspension culture, 4 - immobilized cells, 5 - glucose, 6 - fructose, 7 - galactose, 8 - gluconolactone, 9 - trehalose.

zovaných bunkách a v suspenznej kultúre je rovnaká  $K_m = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ . Podobné vlastnosti má aj invertáza izolovaná z ryže  $K_m = 6,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  [20], uhoriek  $K_m = 7 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  [21], kukurice  $K_m = 4,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  [22], maku  $K_m = 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  [18] a *Schizophyllum commune*  $K_m = 4,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  [22].

V prítomnosti glukózy a fruktózy dochádza k miernej inhibícii invertázy [18,19]. Podobný inhibičný vplyv majú tieto sacharidy aj na invertázu v imobilizovaných bunkách (tab. 3). Isla a kol. [20] konštatujú, že fruktóza je kompetitívnym a glukóza nekompetitívnym inhibítorom invertázy. Skúmané monosacharidy - glukóza, fruktóza a galaktóza sú stavebnými jednotkami zásobných a transportných sacharidov ako sacharózy, rafinózy a iných [18,20,23].

Mnohí autori [8,18-21] zistili, že inhibičný účinok kyseliny *p*-chlórmerkuribenzoovej ( $0,1 \cdot 10^{-3}$  až  $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ ) možno odstrániť pridaním 2-merkaptetanolu, cysteínu alebo ditiotreitolu ( $5 \cdot 10^{-3}$  až  $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ ). Táto skutočnosť poukazuje nato, že -SH skupiny sú pre enzýmovú aktivitu nevyhnutné.

Je všeobecne známe, že imobilizované bunky v porovnaní so suspenznými bunkami majú niektoré výhody. Imobilizované bunky sa menej agregujú, sú chránené pred prudkými nárazmi, produkty biotransformácie sa lepšie uvoľňujú, zvyšuje sa ich vzájomný kontakt a stabilita multienzymových systémov [24,25]. Aktivita tyrozín-dekarboxylázy, DOPA-dekarboxylázy,  $\alpha$ - a  $\beta$ -galaktozidázy po imobilizácii glutaraldehydom je pomerne vysoká [15,26,27]. Po imobilizácii glutaraldehydom sa pozoroval preukazný pokles

TABUĽKA 3. Vplyv glukózy, fruktózy a galaktózy na aktivitu invertázy v imobilizovaných bunkách in vitro.

TABLE 3. Influence of glucose, fructose and galactose on invertase activity of immobilized cells in vitro.

Koncentrácia efektora <sup>1</sup>	% pôvodnej aktivity <sup>2</sup>		
	glukóza <sup>3</sup>	fruktóza <sup>4</sup>	galaktóza <sup>5</sup>
0	100	100	100
$1 \cdot 10^{-3}$ mol.l <sup>-1</sup>	72	67	67
$5 \cdot 10^{-3}$ mol.l <sup>-1</sup>	69	56	59
$10 \cdot 10^{-3}$ mol.l <sup>-1</sup>	65	55	55
$20 \cdot 10^{-3}$ mol.l <sup>-1</sup>	61	53	52

1 - effector concentrations, 2 - % of original activity, 3 - glucose, 4 - fructose, 5 - galactose.

aktivity aminopeptidáz [nepublikované výsledky]. Táto skutočnosť poukazuje na to, že pre imobilizáciu aminopeptidáz je uvedená technika nevhodná.

Glutaraldehyd sa nedávno úspešne použil aj pri imobilizácii rôznych rastlinných buniek [8,15,26,27]. Výdavky spojené s imobilizáciou sú pomerne nízke, prístrojové vybavenie je nenáročné a zostatková aktivita enzýmu je relatívne vysoká. Takto imobilizované bunky sú porovnateľné s bunkami imobilizovanými pomocou nosičov [7].

Invertáza a iné glykozidázy sa môžu perspektívne využiť aj pri biotransformácii farmaceuticky a potravinársky dôležitých látok [10,23,28,29]. Dôležitým predpokladom pre použitie imobilizovaných buniek je selekcia týchto buniek s vysokou aktivitou požadovaných enzýmov, ktoré možno dosiahnuť hlavne metódami génových manipulácií. Predpokladáme, že takto pripravené vysokoprodukčné bunkové klony, ktoré si po imobilizácii zachovávajú vysokú enzýmovú aktivitu, nájdu široké uplatnenie pri príprave, resp. biotransformácii, mnohých biologicky aktívnych látok, ako napríklad hormónov, sacharidov, aminokyselín, ale aj makromolekulových štruktúr enzýmov [30].

Problematika stability sledovaného enzýmu v priebehu uchovávaní imobilizovaných buniek, ako aj výber vhodných konzervačných látok, bude predmetom ďalšieho štúdia. Predbežné výsledky naznačujú, že takto imobilizované rastlinné bunky spolu s kvasinkovými preparátmi nájdu vhodné uplatnenie pri biotransformácii sacharózy na glukózu a fruktózu.

#### Podakovanie

Za poskytnutú finančnú podporu ďakujeme agentúram DAAD v Bonne a VEGA.

## Literatúra

1. KLIBANOV, A. M.: Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science*, 219, 1983, s. 722-727.
2. 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.
3. TAMPION, J. - TAMPION, M. D.: Immobilized cells. Principles and applications. Cambridge : Cambridge University Press, 1987. 324 s.
4. PARASCANDOLA, P. - SCARDI, V. - TARTAGLIONE, O.: Immobilization of yeast cells by adhesion on tuff granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26, 1987, s. 507-510.
5. JANOUŠEK, D. - SPHON, U.: Poroses Glas als Enzymträger. *Bioforum International*, 1, 1998, s. 38-39.
6. MANSFELD, J. - FÖRSTER, M. - HOFFMANN, T. - SCHELLENBERGER, A.: Coimmobilization of *Yarrowia lipolytica* cells and invertase in polyelectrolyte complex. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 1995, s. 11-17.
7. HASAL, P. - VOJTÍŠEK, V. - ČEJKOVÁ, A. - KLECZEK, P. - KOFROŇOVÁ, O.: An immobilized whole yeast cell biocatalyst for enzymatic sucrose hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 1992, s. 221-229.
8. POÓR, J. - STANO, J. - TINTEMANN, H. - MIČIETA, K. - ANDRIAMAINTY, F. - KLIMECKÝ, A.: Activity of  $\beta$ -galactosidase in immobilized cells of tomato. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 37, 1998, s. 33-40.
9. 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.
10. SCHLEE, D. - KLEBER, H. P.: *Biotechnologie 2*. Jena : Gustav Fischer Verlag, 1991, s. 899-900.
11. MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 1962, s. 473-497.
12. 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.
13. 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.
14. DIXON, R. A.: Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: *Plant cell culture. Practical approach*. Ed. Dixon, R. A. Washington DC - Oxford : IRL Press, 1991, s. 1-20.
15. STANO, J. - BEZÁKOVÁ, L. - KOVÁCS, P. - KÁKONIOVÁ, D. - LIŠKOVÁ, D.:  $\alpha$ -Galactosidase in immobilized plant cells. *Pharmazie*, 51, 1996, s. 245-247.
16. 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. 729-734.
17. HAMILTON, R. - PEDERSEN, H. - CHIN, C. K.: Immobilized plant cells for the production of biochemicals. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 14, 1984, s. 383-396.
16. KOVÁČIKOVÁ, M.: Izolácia a charakterizácia niektorých vlastností sacharázy maku (*Papaver somniferum* L.). [Diplomová práca.] Bratislava, 1981. 48 s. - Univerzita Komenského, Farmaceutická fakulta.
19. MIKLOVÁ, A.: Niektoré aspekty tvorby ópiových alkaloidov imobilizovanými bunkami maku. [Diplomová práca.] Bratislava, 1995. 41 s. - Univerzita Komenského, Farmaceutická fakulta.

20. ISLA, M. I. - SALERMO, G. - PONTIS, H. - VATTUONE, M. A. - SAMPIETRO, A. R.: Purification and properties soluble acid invertase from *Oryza sativa*. *Phytochemistry*, 38, 1995, s. 321-325.
21. LIDAY, S.: Vzťah sacharázy k metabolizmu cukrov v kľúčnych rastlinách uhoriek. [Študentská vedecká práca.] Bratislava, 1981. 67 s. - Univerzita Komenského, Farmaceutická fakulta.
22. ROJO, H. P. - VATTUONE, M. A. - SAMPIETRO, A. R.: Invertase from *Schizophyllum communae*. *Phytochemistry*, 37, 1994, s. 119-123.
23. KINDL, H. - WÖBER, B.: Biochemie rostlin. Praha : Academia, 1981. 392 s.
24. ROSEVEAVER, A. J.: Immobilized biocatalysts. A critical review. *Journal of Chemistry and Biotechnology*, 34B, 1984, s. 127-135.
25. HULST, A. C. - TRAMPER, J.: Immobilized plant cells: A literature survey. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 1989, s. 546-558.
26. 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.
27. STANO, J. - NEMEC, P. - BEZÁKOVÁ, L. - KÁKONIOVÁ, D. - KOVÁCS, P. - NEUBERT, K. - LIŠKOVÁ, D. - ANDRIAMAINTY, F. - MIČIETA, K.:  $\beta$ -Galactosidase in immobilized cells of gherkin *Cucumis sativus* L. *Acta Biochimica Polonica*, 45, 1998, s. 621-626.
28. BIELECKY, S. - SOMIARI, R. T.: Synthesis of oligosaccharides by  $\beta$ -fructofuranosidase in biphasic medium containing organic solvent as bulk phase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 17, 1996, s. 217-231.
29. FUKASE, K. - YASUKOCHI, T. - SUDA, Y. - YOSIDA, 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  $\beta$ -D-galactosidase. *Tetrahedron Letters*, 37, 1996, s. 6763-6766.
30. BÁLEŠ, V. - GEMEINER, P. - KUNIAK, L. - REXOVÁ-BENKOVÁ, L. - VOJTÍŠEK, V. - ZEMEK, J.: Enzymové inžinierstvo. Bratislava : Alfa, 1987. 268 s.

Do redakcie došlo 18.5.1999.

#### Activity of invertase in immobilized cells of carrot

MIČIETA, K. - STANO, J. - BLANÁRIKOVÁ, V. - HAVRÁNEK, E. - ANDRIAMAINTY, F. - BIRJUKOVA, N. - IGNATOVA, S. - ŠAFAŘÍK, I.: *Bull. potrav. Výsk.*, 38, 1999, p. 153-161.

**SUMMARY.** Cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L. cv. Kalisto) were permeabilized with Tween 20, Tween 80, 30 % ethanol, 50 % ethanol, and hexadecyltrimethylammonium bromide and immobilized with glutaraldehyde. Invertase of cell suspension culture and of immobilized cells showed its activity optimum at pH 4.5 and temperature 53 °C. Enzyme hydrolysis was linear within 4 h, reaching 66 % conversion. The immobilized cells are characterised by a high invertase activity and showed convenient mechanical properties.

**KEYWORDS:** permeabilization; immobilization; invertase; carrot