

## ŠTÚDIUM VYBRANÝCH EXTRA-CELULÁRNÝCH A IMOBILIZOVANÝCH AMINOPEPTIDÁZ LASTOVIČNÍKA

JÁN STANO<sup>a</sup>, KAROL MIČIETA<sup>b</sup>, MARCELA KOREŇOVÁ<sup>a</sup> a VÍTAZOSLAVA BLANÁRIKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, <sup>b</sup> Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Révová 39, 811 02 Bratislava  
micieta@fns.uniba.sk

Došlo 30.5.05, prepracované 15.9.06, prijaté 4.10.06.

Kľúčové slová: distribúcia, imobilizácia, permeabilizácia, lastovičník, aminopeptidázy

Venované pamiatke prof. MUDr. Zdenka Lojdu DrSc., F.I.A.C., h.c. multiplex, JUDr. h.c., vynikajúcemu odborníkovi na poli histochemie a cytochemie, ktorý bol dlhoročným organizátorom európskych sympózií v oblasti pokroku základnej, aplikovanej a diagnostickej histochemie (\*7. 12. 1927 – † 24. 4. 2004).

### Úvod

Zdroje prírodných látok sú limitované. Mnohé biologicky aktívne látky možno pripraviť pomocou moderných biotechnologických procesov. V poľnohospodárstve a mikropropagácii nachádzajú uplatnenie aj početné techniky kultivácie rastlinných buniek a pletív. 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 zlúčenín hrá dôležitú úlohu v rôznych biotechnologických procesoch<sup>1–3</sup>. Ukázalo sa, že peptidy a peptidhydrolytické enzýmy majú dôležitú úlohu v rôznych oblastiach základného a aplikovaného výskumu<sup>2,4</sup>.

Imobilizácia buniek a enzýmov reprezentuje efektívny spôsob ochrany mnohých biokatalyzátorov, ktoré nachádzajú uplatnenie vo výrobných procesoch. Rastlinné bunky imobilizoval prvý raz Brodelius<sup>5</sup>. Obaľovanie (enkapsulácia) buniek a enzýmov hydrogélmi sa zaraďuje medzi frekventované imobilizačné techniky. Spontánnu adhéziu, ako aj kovalentnú väzbu buniek na povrch nosičov popisali Jirků a spol.<sup>6</sup>, Gill a Ballesteros<sup>7</sup>. Pri imobilizácii buniek sa nedávno použil polyvinylalkohol<sup>8</sup> a glutaraldehyd<sup>4</sup>.

Aminopeptidáza (aminoacylpeptidhydroláza EC 3.4.11)

katalyzuje hydrolýzu *N*-terminálnych aminokyselinových jednotiek peptidov resp. syntetických substrátov. V tejto práci je popísaná enzýmová hydrolýza *N*-terminálnych peptidových väzieb syntetických substrátov, *p*-nitroanilidov aminokyselín voľnými a glutaraldehydom alebo alginátom ako aj pektátom imobilizovanými bunkami lastovičníka. Pri imobilizácii sa využívajú rôzne techniky.

Dostupnosť jednoduchej a rýchlej skriningovej metódy detekcie aminokyselín má veľký význam pre vedecké a priemyselné účely. Pri tejto jednoduchej a rýchlej metóde dôkazu a stanovenia extracelulárnych aminopeptidáz sa používajú syntetické substráty β-naftylamidy aminokyselín.

### Experimentálna časť

#### Rastlinný materiál

Kalusové a suspenzné kultúry lastovičníka väčšieho (*Chelidonium majus* L.) sa odvodili zo sterilných kľúčnych rastlín. Takto odvodené kultúry sa pestovali v kultivačnom médiu podľa Murashigeho a Skooga<sup>9</sup> s prídavkom 1 mg l<sup>-1</sup> kyseliny dichlórfenoxyoctovej, 0,1 mg l<sup>-1</sup> kinetínu a 3 % sacharózy na rotačnej trepačke za štandardných podmienok (24 ± 1 °C, 60 % relatívnej vlhkosti, pri difúznom osvetlení a 120 rpm min<sup>-1</sup>) v priebehu 14 dní.

#### Permeabilizácia buniek Tweenom 80

Suspenzne pestované bunky sa po odfiltrovaní a premytí 1 l 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl permeabilizovali 5 % Tweenom 80 (15 g/50 ml) 3 hodiny za pomalého miešania (60 rpm) pri laboratórnej teplote. Permeabilizované bunky sa premyli 2 l destilovanej vody a 3 l 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl.

#### Imobilizácia buniek glutaraldehydom

Permeabilizované bunky sa vložili do 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl (15 g/50 ml), 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 uchovali v 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl pri 4 °C.

#### Imobilizácia buniek pektátom a alginátom

Suspenzne pestované bunky sa po odfiltrovaní imobilizovali jednotlivito pektátom a alginátom (Na-soľ). 5 g buniek sa resuspendovalo jednotlivito v 20 ml 5 % pektátu alebo alginátu a potom sa pomaly kvapkalo (pomocou kapiláry) do 100 ml 5·10<sup>-2</sup> mol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> (za stáleho miešania 50 rpm). Bunky imobilizované enkapsuláciou (obaľovaním) hydrogélom alginátu alebo pektátu sa nachádzajú v homogénnych guľičkách o priemere cca 4 mm. Gélové guľičky (100 guľičiek obsahuje 1 g buniek) s imobilizovanými bunkami sa potom odfiltrovali a premyli 500 ml 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl. Guľičky (3 g) sa potom preniesli do 20 ml kultivačného média a kultivovali v 100 ml Erlenmayerových bankách na rotačnej trepačke (80 rpm, cit.<sup>10,11</sup>).

### 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.

### Utilizácia glukózy

Utilizácia glukózy suspenznými a imobilizovanými bunkami sa sledovala 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>12</sup>.

### Viabilita buniek

Viabilita buniek sa sledovala podľa Dixona<sup>13</sup> za použitia trifenylnitrazólium chloridu (TTC), fluoresceín diacetátu a kyslíkovej elektródy.

### Dôkaz extracelulárnych aminopeptidáz

Pri dôkaze extracelulárnej L-arginínaminopeptidázy (L-Arg-AP), L-fenylalanínaminopeptidázy (L-Phe-AP) a L-tyrozinaminopeptidázy (L-Tyr-AP) sa použili β-naftylamidy (βNA) týchto aminokyselín L-Arg, L-Phe a L-Tyr: L-Arg-βNA, L-Phe-βNA a L-Tyr-βNA. Enzýmovo uvoľnený β-naftol kopuluje s Fast Garnet GBC soľou za tvorby odpovedajúceho azofarbiva. L-Arg-βNA, L-Phe-βNA alebo L-Tyr-βNA (2 mg) sa jednotlivo rozpustilo v 0,5 ml dimetylformamidu a 4,5 ml 0,1 mol l<sup>-1</sup> Na-fosfátového tlmivého roztoku pH 6,5 s prídavkom 10 mg Fast Garnet GBC soli. K tomuto roztoku sa pridalo 5 ml 2 % agaru v 0,1 mol l<sup>-1</sup> Na-fosfátovom tlmivom roztoku (pH 6,5), nalialo do Petriho misky a autoklávovalo.

Takto pripravené agarové platne sa inokulovali bunkami kalusových kultúr lastovičníka a sterilne vypestovanými kľúčnymi rastlinami lastovičníka (4–6 dní starých)<sup>13</sup> a inkubovali 30–90 minút.

### Stanovenie aktivity intra- a extracelulárnych aminopeptidáz

#### Príprava enzýmu

Pri stanovení intracelulárnej aktivity enzýmu sa použili bunky suspenzných kultúr. Bunky (10 g) sa premyli 2 l destilovanej vody, zhomogenizovalo v predchladenej trecej miske 1:1 (g ml<sup>-1</sup>) s 0,1 mol l<sup>-1</sup> Na-fosfátovým tlmivým roztokom pH 7,0 pri 4 °C. Homogenát sa prefiltraval cez silonovú tkaninu, centrifúgoval (10 min, 15 000 g pri 4 °C) a použil ako enzýmový preparát.

Pri stanovení extracelulárnej aktivity sa použilo kultivačné médium bez buniek (centrifugácia 10 min, 2000 g).

#### Stanovenie aktivity aminopeptidázy

Aktivity L-Arg-AP, L-Phe-AP a L-Tyr-AP sa stanovili metódou podľa Kovácsa a spol.<sup>14</sup> pomocou syntetických chromogénnych substrátov L-arginín-*p*-nitroanilid (L-Arg-pNA), L-prolín-*p*-nitroanilid (L-Pro-pNA) a L-tyrozin-*p*-nitroanilid (L-Tyr-pNA). Reakčná sústava pozostáva z 1,7 ml Theorell-Stenhagenovho tlmivého roztoku

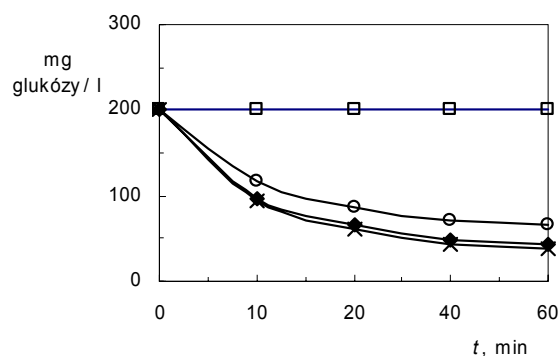
(0,1 mol l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH) pH 7,8, 6,8 a 7,2 jednotlivo, 0,3 ml substrátu: 2·10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup> L-Arg-pNA, 7,6·10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup> L-Phe-pNA a 1,9·10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup> L-Tyr-pNA. Imobilizované a natívne bunky (0,1–0,3 g) alebo enzýmový preparát (0,1–0,3 ml) sa predinkubovali 10 minút pri 30 °C v tlmivom roztoku a potom sa pridal príslušný substrát. V kontrolných vzorkách bol enzýmový preparát tepelne inaktívovaný (5 min pri 100 °C). Reakčné sústavy inkubovali 30 minút pri 30 °C a reakcia sa zastavila prídavkom 0,5 ml 30% kyseliny octovej. Koncentrácia enzýmovo uvoľneného *p*-nitroanilínu sa hodnotila spektrofotometricky pri 410 nm. Enzýmová aktivita je vyjadrená v kataloch. Obsah bielkovín sa stanovil podľa Doumasa a spol.<sup>15</sup> za použitia hovädzieho sérumalbumínu ako štandardnej bielkoviny.

## Výsledky a diskusia

Rozvoj imobilizačných techník má veľký vplyv na vývoj technológií. Imobilizácia buniek resp. biokatalyzátorov reprezentuje veľmi dôležitý spôsob uchovávanania (stabilizácie) vysoko účinných biokatalyzátorov (enzýmov), ktoré sú dôležité pre biotransformačné procesy<sup>7,16</sup>.

Enkapsulácia (obaľovanie) buniek resp. enzýmov hydrogélmi prírodného alebo syntetického pôvodu nachádza uplatnenie v základnom a aplikovanom výskume, ako aj v priemyselnom meradle. V tejto práci sme zamerali svoju pozornosť na štúdium imobilizačných techník pomocou alginátu, pektátu a glutaraldehydu.

Pri imobilizácii buniek lastovičníka glutaraldehydom sa v porovnaní s bunkami suspenzných kultúr pozorovali niektoré zmeny – mierna plazmolýza a zhlukovanie buniek. Pri glutaraldehydom imobilizovaných bunkách sa pri testovaní s 2,3,5-trifenylnitrazólium chloridom (TTC),



Obr. 1. Časový priebeh využitia glukózy v bunkách imobilizovaných glutaraldehydom, alginátom, pektátom a v bunkách suspenznej kultúry (10 g buniek, 20 ml tlmivého roztoku s glukózou l<sup>-1</sup>), □ glutaraldehyd, ○ suspenzná kultúra, ● pektát, ◼ alginát

Tabuľka I

Aktivita arginínaminopeptidázy (L-Arg-AP), fenylalanínaminopeptidázy (L-Phe-AP) a tyrozinaminopeptidázy (L-Tyr-AP) v 14-dňových bunkách suspenznej kultúry lastovičnika permeabilizovanej Tweenom 80 a imobilizovanej glutaraldehydom

Bunky	Proteíny [mg g <sup>-1</sup> sušiny]	Aktivita [nkat g <sup>-1</sup> sušiny]			Špecifická aktivita [nkat mg <sup>-1</sup> proteínu]		
		L-Arg-AP	L-Phe-AP	L-Tyr-AP	L-Arg-AP	L-Phe-AP	L-Tyr-AP
Suspenzia	12,8 ± 0,1	38,6 ± 0,1	31,4 ± 0,1	36,8 ± 0,1	3,16	2,45	2,88
Permeabilizované	5,6 ± 0,1	41,2 ± 0,1	36,4 ± 0,1	40,2 ± 0,1	7,36	6,50	7,18
Imobilizované	5,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1	0,47	0,42	0,44

fluoresceín diacetátom a meraní spotreby kyslíka nezaznamenala viabilita. Glutaraldehydom imobilizované bunky neutilizujú glukózu (obr. 1).

Po permeabilizácii Tweenom 80 a imobilizácii glutaraldehydom dochádza k výraznejšiemu poklesu obsahu bielkovín a k preukaznému poklesu aktivity aminopeptidáz (tabuľka I).

Srinivasan a spol.<sup>17</sup> zistili, že po permeabilizácii bunkovej steny kvasiniek dochádza k preukaznému zvýšeniu fenylalanínaminokarboxylázy (PAL). Pri permeabilizácii bunkovej steny suspenzných kultúr (rastlinných) buniek sa také významné zvýšenie enzymovej aktivity nepozorovalo.

Imobilizáciu buniek pomocou glutaraldehydu na rozdiel od aminopeptidáz možno vhodne aplikovať pri  $\alpha$ - a  $\beta$ -galaktozidáze, invertáze, L-tyrozindekarboxyláze a L-DOPA-dekarboxyláze<sup>3,4</sup>. Pri imobilizácii buniek a bielkovín pomocou glutaraldehydu dochádza k ich vnútornému zosieťovaniu<sup>16</sup>. Táto skutočnosť poukazuje na možnosť reakcie imobilizačného agens glutaraldehydu s aktívnym centrom aminopeptidáz<sup>18</sup>. Predložené výsledky poukazujú na to, že ako permeabilizácia bunkovej steny suspenzných kultúr rastlinného pôvodu, tak aj imobilizácia bifunkčným agens glutaraldehydom si vyžaduje ďalšie štúdium.

Imobilizácia testovaných buniek hydrogélmi alginátu a pektátu (tabuľka II) naznačuje, že pre početné biokatalyzátory a bunky je táto metóda oveľa vhodnejšia než imobilizácia glutaraldehydom<sup>10,19,20</sup>.

Imobilizované bunky majú v porovnaní s bunkami suspenzných kultúr tieto výhody: zabezpečenie nepretržitého prístupu, zlepšenie separácie biokatalyzátora, predĺže-

nie polčasu biokatalyzátora, fyzikálnu ochranu voči strižným silám, ochranu pred zhlukovaním, stimuláciu produkcie sekundárnych metabolitov, konzerváciu multifunkčného enzymového systému<sup>7,10,21,22</sup>.

Biotransformácia pomocou imobilizovaných alebo voľných biokatalyzátorov neposkytuje iba alternatívne a účinné riešenie syntézy početných látok, ale tiež ponúka environmentálne nezávadné technológie, ktoré využívajú veľmi prijateľné reakčné podmienky<sup>20</sup>.

Výsledky predloženého štúdia naznačujú, že imobilizácia glutaraldehydom vedie k vnútornému zosieťovaniu testovaného materiálu, čo spôsobuje významný pokles aktivity aminopeptidáz. Z tohto dôvodu je aplikácia hydrogélom oveľa vhodnejšia. Proteolytické enzýmy ako endo- a exopeptidázy sa zúčastňujú mnohých biologických procesov ako je regulácia peptidových hormónov, mobilizácia a užitie zásobných bielkovín, imunologická aktivácia špecializovaných buniek, recyklácia proteínov, ktoré obsahujú prolín a pod.<sup>23,24,25</sup>

Proteázy, ktoré sa podieľajú na transformácii peptidov na voľné aminokyseliny, sú dôležité aj pre sekundárny metabolizmus<sup>26,27</sup>. Dostupnosť jednoduchšej a rýchlejšej metódy detekcie aminopeptidáz má veľký význam pre vedecké aj komerčné účely. Syntetické substráty ako 4-(fenylazo) fenylamidy (PAP amidy),  $\beta$ -naftylamidy a *p*-nitroanilidy aminokyselín spolu s ďalšími chromogénnymi substrátmi sú vhodné pre tento účel<sup>27,28</sup>.

Pri dôkaze a stanovení intra- a extracelulárnej aktivity L-Arg-AP, L-Phe-AP a L-Tyr-AP sa použili  $\beta$ -naftylamidy a *p*-nitroanilidy L-Arg, L-Pro a L-Tyr. Na kultivačné médiá (agarové platne) s prídavkom substrátov L-Arg- $\beta$ NA, L-Phe- $\beta$ NA a L-Tyr- $\beta$ NA jednotlivo a s Fast Garnet GBC

Tabuľka II

Aktivita arginínaminopeptidázy (L-Arg-AP), fenylalanínaminopeptidázy (L-Phe-AP) a tyrozinaminopeptidázy (L-Tyr-AP) v 14-dňových bunkách suspenznej kultúry lastovičnika imobilizovanej obalovaním alginátom a pektátom

Bunky	Proteíny [mg g <sup>-1</sup> sušiny]	Aktivita [nkat g <sup>-1</sup> sušiny]			Špecifická aktivita [nkat mg <sup>-1</sup> proteínu]		
		L-Arg-AP	L-Phe-AP	L-Tyr-AP	L-Arg-AP	L-Phe-AP	L-Tyr-AP
Suspenzia	12,8 ± 0,1	38,6 ± 0,1	31,4 ± 0,1	36,8 ± 0,1	3,16	2,45	2,88
Imobilizované alginátom	12,8 ± 0,1	13,1 ± 0,1	9,2 ± 0,1	10,8 ± 0,1	1,02	0,72	0,84
Imobilizované pektátom	12,8 ± 0,1	14,2 ± 0,1	9,6 ± 0,1	11,4 ± 0,1	1,11	0,75	0,89

Tabuľka III

Aktivita arginínaminopeptidázy v bunkách a médiu 14-dňovej suspenznej kultúry lastovičníka

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g <sup>-1</sup> čerstvej hmoty]	Aktivita [nkat g <sup>-1</sup> čerstvej hmoty]	Špecifická aktivita [nkat mg <sup>-1</sup> proteínu]
Intracelulárna aktivita (homogenát z izolovaných buniek)	0,2	0,67 ± 0,07	2,90 ± 0,08	3,05
Extracelulárna aktivita (kultivačné médium bez buniek) <sup>a</sup>	1,0	0,27 ± 0,05	0,79 ± 0,07	2,92

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

Tabuľka IV

Aktivita fenylalanínaminopeptidázy v bunkách a médiu 14-dňovej suspenznej kultúry lastovičníka

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g <sup>-1</sup> čerstvej hmoty]	Aktivita [nkat g <sup>-1</sup> čerstvej hmoty]	Špecifická aktivita [nkat mg <sup>-1</sup> proteínu]
Intracelulárna aktivita (homogenát z izolovaných buniek)	0,2	0,67 ± 0,07	1,57 ± 0,08	2,35
Extracelulárna aktivita (kultivačné médium bez buniek) <sup>a</sup>	1,0	0,27 ± 0,05	0,55 ± 0,07	2,05

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

soľou (v prípade kontroly substrát chýbal)<sup>29,30</sup> sa inokulovali bunky rastúcich kalusov. Inokulá sa ponechali na kultivačných médiách 30–60 minút. Extracelulárne aminopeptidázy sa detekovali pomocou hnedočerveného zafarbenia, ktoré vzniká simultánnou azokopoláciou Fast Garnet GBC soli a zo substrátu enzýmovo uvoľneného β-naftolu pod a okolo inokula na agarovej platni. Po inokulácii kultivačného média bez substrátu resp. s tepelne inaktivovaným kalusom (10 min pri 100 °C) sa žiadne farebné zmeny nepozorovali.

Po vysadení sterilných kľúčnych rastlín lastovičníka na agarové platne so substrátom a Fast Garnet GBC soľou sa pozorovali farebné zmeny (hnedočervené zafarbenie) na korigenku, koreňových vláskoch, ako aj na platni v mieste ich kontaktu s ňou.

Porovnanie distribúcie intra- a extracelulárnej aktivity študovaného enzýmu poukazuje na minoritné zastúpenie

extracelulárnych a majoritné zastúpenie intracelulárnych aminopeptidáz (tabuľka III, IV, V). Distribúcia intra- a extracelulárnych aminopeptidáz a invertázy je podobná<sup>31</sup>. Zaujímavé je, že aktivita extracelulárnej α- a β-galaktosidázy je oveľa vyššia (3–4krát) než invertázy a aminopeptidáz<sup>3,31</sup>.

Výsledky predloženej práce naznačujú, že metódu na dôkaz sekrécie aminopeptidáz bude možno využiť pri výbere buniek vhodných pre biotechnologické účely. Imobilizované bunky, ako aj biokatalyzátory typu aminopeptidáz resp. iných hydroláz majú biotechnologické uplatnenie v potravinárskom a farmaceutickom priemysle a výskume<sup>3,31,32</sup>. Predpokladáme, že aminopeptidázy ako aj iné proteázy sa využijú pri príprave aminokyselín resp. oligopeptidov potrebných pre výskumné a priemyselné účely. Napriek tomu, že tieto enzýmy sú prítomné aj v rastlinách, doposiaľ sa tento zdroj pre biotechnologické účely nevyužíva.

Tabuľka V

Aktivita tyrozínaminopeptidázy v bunkách a médiu 14-dňovej suspenznej kultúry lastovičníka

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g <sup>-1</sup> čerstvej hmoty]	Aktivita [nkat g <sup>-1</sup> čerstvej hmoty]	Špecifická aktivita [nkat mg <sup>-1</sup> proteínu]
Intracelulárna aktivita (homogenát z izolovaných buniek)	0,2	0,60 ± 0,07	1,77 ± 0,07	2,95
Extracelulárna aktivita (kultivačné médium bez buniek) <sup>a</sup>	1,0	0,27 ± 0,05	0,64 ± 0,07	2,35

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

## Záver

V práci sa testovala vhodnosť aplikácie rôznych techník pri imobilizácii aminopeptidáz v suspenzných kultúrach lastovičnika. Výsledky experimentov poukazujú na to, že pri imobilizácii aminopeptidáz sú hydrogély alginátu a pektátu oveľa výhodnejšie než aplikácia glutaraldehydu (zosieťovanie glutaraldehydom).

Majoritná časť aktivity študovaných aminopeptidáz sa nachádza v intracelulárnej frakcii a iba minoritná časť v extracelulárnej frakcii.

Pomocou syntetických substrátov ( $\beta$ -naftylamidov aminokyselín) a Fast Garnet GBC soli sa vypracovala jednoduchá, rýchla a spoľahlivá metóda dôkazu extracelulárnych aminopeptidáz.

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

## LITERATÚRA

- Szczodrac J.: Acta Biotechnol. 19, 235 (1999).
- Siekel P., Mičieta K.: Biológia (Bratislava) 53, 791 (1998).
- Tilemann E., Tokhtaeva Z., Sedlárová E., Barth A., Valent A., Siekel P., Ďuríček M.: Chem. Nat. Prod. 39, 394 (2003).
- Stano J., Nemeč P., Weissová K., Kovács P., Kákoniová D., Lišková D.: Phytochemistry 38, 859 (1995).
- 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).
- Wu K. Y. A., Wisecarver K. D.: Biotechnol. Bioeng. 39, 221 (1992).
- Murashige T., Skoog F.: Physiol. Plant. 15, 473 (1962).
- Furuya T., Yoshikawa T., Taira M.: Phytochemistry 23, 999 (1984).
- Schoichet M. S., Li R. H., White M. L., Winn S. R.: Biotechnol. Bioeng. 50, 374 (1996).
- Trinder P.: J. Clin. Pathol. 22, 158 (1969).
- Dixon R. A.: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, Washington 1991.
- Kovács P., Dufková-Barančeková J., Pšenák M.: Biológia (Bratislava) 40, 345 (1985).
- Doumas T. B., Bayse D. D., Carter R. J., Peters T., Schaffer R.: Clin. Chem. 27, 1642 (1981).
- Báleš V., Gemeiner P., Kuniak Ľ., Rexová-Benková L., Vojtišek V., Zemek J.: *Enzymové inžinierstvo*. Alfa, Bratislava 1987.
- Srinivansan, Nagajyothi A. R., Gowda L. R., Bhat S. G.: Biotech. Tech. 8, 729 (1994).
- Elcin Y. M., Sacak M.: Appl. Biochem. Biotechnol. 60, 19 (1996).
- Berlin J., Martin B., Nowak J., White L., Wray V., Strack D.: Z. Naturforsch. 44, 249. (1989).
- Trelles J. A., Bentancor L., Schoijet A., Porro S., Lewkowicz E. S., Sinisterra J., Iribarren A. M.: Chem. Biodiv. 1, 280 (2004).
- Hulst A. A.: Enzyme Microbiol. Technol. 11, 546 (1989).
- Hasal P., Vojtišek V., Čejková A., Kleczek P., Kotroňová O.: Enzyme Microbiol. Technol. 14, 211 (1992).
- Bilka F., Kľúčovská J., Bilková A., Benešová M.: Biológia (Bratislava) 57, 761 (2002).
- Mertová A., Almásiová M., Perečko D., Bilka F., Bezáková L., Pšenák M., Kutejová E.: Biológia (Bratislava) 57, 739 (2002).
- Balážová A., Pšenák M.: Chem. Listy 92, 1006 (1998).
- Benešová M., Bilka F., Pšenák M., Kovács P.: Acta Fac. Pharm. Univ. Comenianae 49, 37 (2002).
- Mrestani-Klaus C., Lorey S., Faust J., Brühling F., Neubert K., v knihe: *Endopeptidases* (Langer J., Ansonge S., ed.), kap. 1. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York 2002.
- Kákoniová D., Stano J., Neubert K., Grančai D., Andriamainty F. H., Kresánek J., Tu N.: Bull. Food Res. 38, 55 (1999).
- Stoward P. J., Pearse A. G. E.: *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Vol. 3. Churchill Livingstone, Edinburgh 1991.
- Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T. H.: *Enzyme Histochemistry. A Laboratory Manual*. Springer, Berlin 1979.
- Stano J., Mičieta K., Tintemann H., Kovács P.: Pharmazie 59, 323 (2004).
- Mučaji P., Grančai D., Nagy M., Buděšinsky M., Ubík K.: Pharmazie 54, 714 (1999).

**J. Stano<sup>a</sup>, K. Mičieta<sup>b</sup>, M. Koreňová<sup>a</sup>, and V. Blanáriková<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>Faculty of Pharmacy, <sup>b</sup>Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava): **Study of Selected Extracellular and Immobilized Aminopeptidases in Greater Celandine**

Celandine cells, after permeabilization in Tween 80, were immobilized by crosslinking with glutaraldehyde without any carrier. The cells showed significantly lower aminopeptidase activities than untreated cells. Pectate and alginate hydrogels were successfully used for immobilization of greater celandine cells while retaining the activity of some aminopeptidases. A simple and rapid procedure for determination of extracellular aminopeptidases was developed using synthetic substrates. 4-Nitroanilides of amino acids were used as substrates for the determination of extracellular and intracellular enzymatic activities. The former were determined in culture media (without cells) whereas the latter in a cell suspension culture.