

Využitie chromogénnych substrátov pri štúdiu proteolytických enzýmov

DANIELA KÁKONIOVÁ – JÁN STANO – KLAUS NEUBERT – DANIEL GRANČAI
– FILS ANDRIAMAINTY – JAROSLAV KRESÁNEK – NGUYEN TU

SÚHRN. Použitím chromogénnych substrátov sa vypracovala jednoduchá, citlivá a reprodukovateľná metóda dôkazu proteolytických enzýmov. Extracelulárne proteolytické enzýmy produkované kalusovou alebo suspenznou kultúrou hydrolyzujú nerozpustný chromogénny substrát (tepelne modifikovaný azokazeín, modrá želatína).

Zafarbenie okolo kalusovej kultúry a pod ňou je znakom činnosti extracelulárnych proteolytických enzýmov produkovaných kalusovou kultúrou. Intenzita zafarbenia kultivačného média je mierou aktivity extracelulárnych proteolytických enzýmov suspenznej kultúry. Chromogénne substráty možno využiť aj pri stanovení aktivity intracelulárnych proteolytických enzýmov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: proteolytické enzýmy, nerozpustný chromogénny substrát, kalusová kultúra, suspenzná kultúra, *Papaver somniferum*

Pri štúdiu proteolytickej aktivity možno použiť množstvo rôznych substrátov. Významné miesto medzi nimi majú chromogénne substráty. Tieto sa pripravujú hlavne kovalentnou väzbou vhodného farbiva na nerozpustné proteíny ako kolagén [1], keratín [2], elastín [3] alebo fibrín [4]. Vhodnou modifikáciou niektorých rozpustných proteínov možno pripraviť rovnaký typ

RNDr. Daniela KÁKONIOVÁ, CSc., Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava.

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

Prof. Dr. habil. Klaus NEUBERT, Institut für Biochemie, Martin-Luther-Universität, Kurt Mothes Str. 3, 061 20 Halle, Nemecko.

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

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

MUDr. Jaroslav KRESÁNEK, Klinika pracovného lekárstva a toxikológie, Ďumbierska 3, 831 03 Bratislava.

RNDr. Nguyen Tu, CSc., Biologický ústav, Dang Thai Than 2/14, 470 00 Hue, Vietnam.

substrátov. Takéto proteíny sa najskôr zosieťujú vhodným bifunkčným činidlom a potom sa modifikujú substitučnou reakciou vhodným farbivom [5].

Tepelnou modifikáciou azokazeínu možno pripraviť pomerne lacný, citlivý, nerozpustný chromogénny substrát, vhodný pre štúdium proteolytických enzýmov [6,7].

Pri dôkaze extracelulárnych proteolytických enzýmov a pri stanovení extra- a intracelulárnej proteolytickej aktivity [8,9] sa použil chromogénny substrát pripravený tepelnou modifikáciou [6,7].

V tradičných i moderných biotechnológiach nachádzajú uplatnenie hlavne enzýmové preparáty mikrobiálneho pôvodu [10,11]. V predloženej práci sme na modelovom systéme sledovali extra- a intracelulárnu proteolytickú aktivitu v kalusových a suspenzných kultúrach maku siateho ako alternatívneho a potenciálne alternatívneho zdroja proteolytických enzýmov.

Materiál a metódy

Rastlinný materiál

Kalusové a suspenzné kultúry maku sa odvodili zo sterilných kľúčnych rastlín maku *Papaver somniferum* L. na Katedre fyziológie rastlín Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave (Doc. RNDr. K. Erdelský, CSc.). Tieto kultúry sa pestovali obvyklým spôsobom [12] na kultivačnom médiu podľa Murashigeho a Skooga [13].

Príprava chromogénneho substrátu

Nerozpustné chromogénne substráty - tepelne modifikovaný azokazeín a modrá želatína sa pripravili metódou opísanou v literatúre [7,14].

Príprava kultivačného média so substrátom

Tepelne modifikovaný azokazeín a modrá želatína (nerozpustné chromogénne substráty) sa pridali jednotlivo do kultivačného média (s agarom alebo bez agaru) v koncentrácii 0,5 % (w/v) a potom sa v Erlenmayerových bankách sterilizovali obvyklým spôsobom [12,13].

Homogenita distribúcie nerozpustného substrátu v médiu s agarom sa po jeho vychladení na 50 °C zabezpečila pomalým krúživým pohybom (30 rpm) v Erlenmayerových bankách (100 ml banka, 15 ml média) až do vychladnutia.

Homogenita distribúcie nerozpustného substrátu v médiu bez agaru sa zabezpečila krúživým pohybom v Erlenmayerových bankách (25 ml banka, 5 ml média) na rotačnej trepačke (120 rpm) počas kultivácie.

Stanovenie aktivity enzýmu

Pri stanovení proteolytickej aktivity sa použili nerozpustné chromogénne substráty - tepelne modifikovaný azokazeín a modrá želatína. Enzymová aktivita sa stanovila podľa [6,14]. 20 mg substrátu (tepelne modifikovaného azokazeínu alebo modrej želatíny) sa suspendovalo v 2 ml 0,05 mol.l⁻¹ Tris-HCl tlmivého roztoku pH 8,5. Po napučaní substrátu (20 minút pri 37 °C) sa pridalo vhodné množstvo enzýmového preparátu (0,3 - 0,6 ml supernatantu po dezintegrácii buniek), resp. buniek suspenznej kultúry (0,3 - 1,0 g), a inkubačná zmes sa ponechala 20 - 40 minút pri 37 °C. Reakcia sa ukončila odfiltrovaním buniek, resp. enzýmu cez papierový filter (Whatman No 3). Intenzita zafarbenia filtrátu sa hodnotila spektrofotometricky pri 400 nm (tepelne modifikovaný azokazeín), resp. pri 595 nm (modrá želatína).

Extracelulárna proteolytická aktivita sa vyhodnotila z intenzity zafarbenia filtrátu v prítomnosti buniek suspenznej kultúry. Intenzita zafarbenia filtrátu v prítomnosti dezintegrovaných buniek predstavuje súčet extra- a intracelulárnej proteolytickej aktivity.

Príprava enzýmového preparátu

Bunky suspenzných kultúr sa po odfiltrovaní kultivačného média rozrušili pomocou ultrazvukového dezintegrátora (Soniprep 150 MSE; 1 g buniek na 2 ml 0,05 mol.l⁻¹ Na⁺ fosfátového tlmivého roztoku pH 7,2; 3 x 3 minúty pri 10000 Hz).

Homogenát sa prefiltroval cez silon a odcentrifugoval (15 minút; 100000 m.s⁻²).

Supernatant sa použil ako enzýmový preparát na stanovenie extra- a intracelulárnej proteolytickej aktivity.

Výsledky a diskusia

Podobne ako trypsín, papaín a pepsín [5,6] izolovaný z mikroorganizmov a plesní, aj rastlinné proteolytické enzýmy hydrolyzujú nerozpustné chromogénne substráty [14].

Na kultivačné médiá (s agarom a bez agaru, ako aj so substrátom, resp. bez neho) sa aplikovali vhodné inokulá a kultivovali sa 1 - 8 dní. Na kultivačnom médiu s agarom sa extracelulárne proteolytické enzýmy detegovali pomocou farebných zón v okolí kalusu, resp. zafarbením kultúry v mieste styku s platňou agaru (enzýmovovo uvoľnené farbivo preniká do kalusu a kultivačného média).

Intenzita zafarbenia kvapalného kultivačného média, resp. intenzita a veľkosť farebnej zóny v okolí rastúceho kalusu, je mierou proteolytickej aktivity skúmaných suspenzných, resp. kalusových kultúr, ktorá sa môže využiť pri semikvantitatívnych porovnávacích štúdiách.

Po inokulácii kultivačného média tepelne inaktivovaným inokulom (100 °C, 5 minút) nedochádza k zmene jeho zafarbenia. Na platniach (s agarom a substrátom) bez kalusových, resp. suspenzných kultúr, sa nepozorovali žiadne farebné zmeny.

Pri naklíčovaní sterilných semien uhoriek, maku, pšenice, papriky a lucer-ny [12] sa na platniach agaru žiadne zmeny nepozorovali. Tieto výsledky poukazujú na to, že korene klíčnych rastlín, na rozdiel od kalusových kultúr, extracelulárne proteolytické enzýmy neprodukujú.

Porovnávanie extra- a intracelulárnej proteolytickej aktivity ukázalo, že extracelulárna aktivita predstavuje 18 % celkovej aktivity.

Vzhľadom na jednoduchosť a reprodukovateľnosť môže táto metóda nájsť uplatnenie pri štúdiu iných rastlinných proteínáz. Pretože rôzne proteínázy hydrolyzujú skúmané substráty, predpokladáme, že tieto substráty nájdu uplatnenie pri kontrole ich účinnosti.

Podakovanie

Za poskytnuté chromogénne substráty ďakujú autori Doc. Ing. I. Šafaříkovi, CSc. z Ústavu biológie krajiny, ČAV v Českých Budějoviciach, za kalusové kultúry Doc. RNDr. K. Er-
delskému CSc. z Katedry fyziológie rastlín Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a p. K. Prítýiovej z firmy Lestra, Nesvady, za poskytnuté semená.

Literatúra

1. RINDERKNECHT, H. - GEOKAS, M. L. - SILVERMAN, P. - LILARD, V. - HAVERBACK, B. J.: New method for the determination of elastase. *Clinica Chimica Acta*, 19, 1968, s. 327-329.
2. WHALEY, D. N. - DOWEL, V. R., JR. - WANDERLINDER, L. M. - LOMNARD, G. L.: Gelatin agar medium for detecting gelatinase production by anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 16, 1982, s. 224-229.
3. HALL, D. A.: The identification and estimation of elastase in serum and plasma. *Biochemical Journal*, 101, 1966, s. 29-36.
4. NELSON, W. L. - CIACCIO, E. I. - HESS, G. P.: A rapid method for the quantitative assay of proteolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*, 2, 1961, s. 39-44.
5. ŠAFAŘÍK, I.: Nerozpuštný chromolytický substrát pro stanovení proteolytické aktivity. *Chemické listy*, 82, 1988, s. 986-989.
6. ŠAFAŘÍK, I.: Thermally modified azocasein. A new insoluble substrate for the determination of the proteolytic activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9, 1987, s. 323-325.

7. CHARTNEY, J. - TOMARELLI, R. M.: A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*, 171, 1947, s. 501-505.
8. FUKAL, L. - KÁŠ, J.: Přehled technik stanovení proteolytických enzymů. *Chemické listy*, 78, 1984, s. 1176-1196.
9. FUKAL, L. - KÁŠ, J. - VODRÁŽKA, Z.: Přehled metod používaných ke stanovení aktivity proteolytických enzymů. *Biochemia Clinica Bohemoslovaca*, 14, 1985, s. 109-120.
10. TOMASCHOVÁ, J. - BUCHINGER, W. - ZEMANOVIČ, J. - HAMPEL, W.: Purifikácia a separácia extracelulárných proteínáz *Brevibacterium linens* ATCC 9172. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 36, 1997, s. 21-26.
11. KANEKO, R. - KUSAKABE, I. - SAKAI, Y. - MURAKAMI, K.: Substrate specificity of α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Agriculture and Biological Chemistry*, 54, 1990, s. 237-238.
12. STANO, J. - NEMEC, P. - KÁKONIOVÁ, D. - KOVÁCS, P. - NEUBERT, K. - LIŠKOVÁ, D.: Decarboxylation of L-tyrosine and L-DOPA by immobilized cells of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 38, 1995, s. 859-860.
13. MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 1962, s. 473-497.
14. STANO, J. - KOVÁCS, P. - ŠAFAŘÍK, I. - KÁKONIOVÁ, D. - ŠAFAŘÍKOVÁ, M.: A simple procedure for the detection of plant extracellular proteolytic enzymes. *Biologia Plantarum*, 40, 1997/98, s. 475-477.

Do redakcie došlo 25.9.1998.

Using of chromogenic substrates for study of proteolytic enzymes

KÁKONIOVÁ, D. - STANO, J. - NEUBERT, K. - GRANČAI, D. - ANDRIAMAINTY, F.
- KRESÁNEK, J. - TU, N.: *Bull. potrav. Výsk.*, 38, 1999, p. 55-59.

SUMMARY. Use of chromogenic substrates enabled to elaborate a simple, sensitive and reproducible method for determination of proteolytic enzymes. Extracellular proteolytic enzymes produced by callus or cell suspension culture hydrolyse the insoluble chromogenic substrate (thermally modified azocasein, blue gelatine).

The colour around the callus culture and under the culture is a mark of activity by callus culture produced extracellular proteolytic enzymes. The colour intensity of the cultivation media is an activity measure of the extracellular proteolytic enzymes of the cell suspension culture. Chromogenic substrates may be used also for activity determination of intracellular proteolytic enzymes.

KEYWORDS: proteolytic enzymes, insoluble chromogenic substrates, callus culture, cell suspension culture, *Papaver somniferum*