

TARTU ÜLIKOOL
Füüsika-keemiateaduskond
Füüsikalise keemia instituut

ANDERO VAARIK

**Amiini oksüdaasi puhastamine amiinide biosensori
konstrueerimiseks**

Magistritöö kolloid- ja keskkonnakeemia erialal

Juhendaja: teadur, Ph.D TOONIKA RINKEN

Tartu 2004

SISSUKORD

1. SISSEJUHATUS	3
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	4
2.1. Amiinide levik.....	4
2.2. Biogeensed amiinid.....	4
2.3. Amiinide määramise meetodid	5
2.4. Erinevate amiini oksüdaaside omadused.....	6
2.5. Biosensorid amiinide määramiseks.....	8
2.6. Amiini oksüdaasi puhastamine	9
3. EKSPERIMENTAALNE OSA	11
3.1. Kasutatud ained.....	11
3.2. Kasutatud aparatuur.....	11
3.3. Kineetilised mõõtmised	13
3.4. Amiini oksüdaasi puhastamine herne idudest (<i>Pisum sativum</i>).....	14
3.5. Valgu kontsentratsiooni ja molekulmassi määramine	15
3.6. Hapnikuanduril põhineva biosensori matemaatilise mudeli lühikirjeldus	15
3.7. Andmete registreerimine ja töötlemine	17
4. TULEMUSED JA ARUTELU	18
4.1. Amiini oksüdaasi aktiivsuse määramine erinevate amiinide suhtes.....	18
4.2. Amiini oksüdaasi eraldamine ja puhastamine ning puhastusprotsessi efektiivsuse hindamine	22
4.3. Biosensori konstrueerimise võimalused puhastatud PSAO-ga.....	27
KOKKUVÕTE.....	28
SUMMARY	29
KASUTATUD KIRJANDUS.....	30

1. SISSEJUHATUS

Amiinid on üheks olulisemaks metabolismis osalevaks ainete rühmaks, mis tekivad organismide ainevahetusprotsesside tulemusena ning orgaaniliste ühendite mikrobioloogilisel lagunemisel. Amiinide sisalduse määramine võimaldab kontrollida toiduainete, näiteks kalade ja kalatoodete värskust ja jälgida bakterite tegevust ning sellega tagada toiduainete vastavus standardi- ja kvaliteedinõuetele. Amiinide analüüs on oluline ka näiteks signaalmolekulide-biogeensete amiinide kontsentratsiooni määramiseks veres, sest need molekulid annavad märku organismis kulgevatest ebanormaalselt ägedatest reaktsioonidest mingile välisele või organismis olevale ainele, ning põhjustavad allergilisi reaktsioone.

Amiinide määramine on kromatograafilisi meetodeid kasutades töömahukas ja aeganõudev ülesanne, millele otsitakse uusi efektiivseid alternatiive. Üheks võimaluseks on kasutada biosensoreid, kus amiinide analüüsiks kasutatakse amiini oksüdaasiga kombineeritud elektrokeemilist andurit.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida amiini oksüdaasi puhastamise võimalusi herne idudest (*Pisum sativum*) selle ensüümi kasutamiseks biosensori bioselektiivse elemendina.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1. Amiinide levik

Amiinid on süsivesinike funktsionaalderivaadid, mis sisaldavad aminorühma $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$ või $-\text{NR}_1\text{R}_2$. Neid võib vaadelda ka ammoniaagi derivaatidena, milles üks või mitu vesinikuaatomit on asendatud süsivesinikradikaalidega. Sõltuvalt lämmastikuga seotud radikaalide arvust saadakse primaarseid, sekundaarseid või tertsiaarseid amiine [1].

Amiinide kasutusala on väga lai. Alates mitmesugustest värvidest tekstiilitööstuses, kuni pestitsiidide ja lõhkeaineteni [2]. Amiinseid ühendeid kasutatakse ka toiduainete tööstuses [3]. Ümbritsevasse keskkonda võivad amiinid sattuda samuti põlemisprotsesside tagajärjel [2]. Amiine tekib loom- ja taimorganismide ainevahetusprotsessides ning orgaaniliste ainete mikrobioloogilisel lagundamisel [4].

Mõningad amiinid omavad kantserogeenset ning genotoksilist toimet. Need amiinid kujutavad potentsiaalset ohtu ümbritsevale keskkonnale. Selliste amiinide hulka kuuluvad, näiteks bensidiin ja teised aromaatsed amiinid ning heterotsükliised amiinid, mis võivad tekkida valkude termilisel lagunemisel [3, 5]. Kuna sellised ühendid kujutavad tõsist ohtu inimeste tervisele on Euroopa Liidu Komisjon kehtestanud nende ühendite kasutamisel ranged piirnormid (näiteks ümbertöödeldud tekstiilis 70 ppm) [6].

2.2. Biogeensed amiinid

Dopamiini, türamiini ja mõnede teiste monoamiinide funktsiooniks organismis on närvisüsteemi signaalide ülekandmine. Need ühendid on tugeva psühhotroopse toimega ning neil arvatakse olevat seos inimeste psühhika ja närvisüsteemi haigustega nagu skisofreenia, depressioon ja Parkinsoni tõbi jt. [7]. Need monoamiinsed struktuurid sisaldavad β -fenüületüülamiinset struktuuri.

Monoamiinid satuvad organismi kas aminohapete dekarboksüülimisel organismis eneses, väljastpoolt ravimite või toiduga [8-10].

Aminohapete dekarboksüleerimisel on produktideks vastavad amiinid. Nii tekib histidiinist histamiin, lüsiinist kadaveriin ning glutamiinist, arginiinist ja

ornitiinist putrestsiin, trüptofaanist trüptamiin, 5-hüdroksütrüptofaanist serotoniin ning 3,4-dihüdroksüfenüülalaniinist dopamiin [11]. Kõiki neid aminohapetest pärit amiine nimetakse biogeenseteks amiinideks. Tegemist on tugevate bioaktiivsete toimeainetega, mis on olemuselt signaalmolekulid ja vahendavad organismis toimuvaid protsesse. Signaalmolekulide kontsentratsiooni kasv organismis annab märku ebanormaalselt ägedast reaktsioonist mingile välisele või organismis olevale ainele ning kutsub üldjuhul esile allergilise reaktsiooni [11]. Signaalmolekulide kontsentratsioon võib kasvada ka neid sisaldavate toiduainete söömisel. Nii leidub rohkesti histamiini kalades ja kalatoodetes [12], türamiini mitmesugustes juustudes [9] ning fenüületüülamiini šokolaadis [8]. Reageerimise tugevus biogeensetele amiinidele sõltub individuaalselt igast inimesest. Tüüpilisemad allergiat tekitavad biogeensed amiinid on histamiin, fenüületüülamiin, türamiin ja trüptamiin, mis sisaldavad etüülamiinset struktuuri ($-(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$). Eelpool nimetatud biogeensetele amiinidele vastavate aminohapete sisaldus valgus on tavaliselt alla 4 % [13].

2.3. Amiinide määramise meetodid

Amiine leidub kõikjal meid ümbritsevas keskkonnas ning nende määramiseks otsitakse intensiivselt selektiivseid ja täpseid analüütilisi meetodeid.

Tüüpiliselt kasutatakse amiinide üldhulga määramiseks potentsimeetrilist tiitrimist, happelist tiitrimist ja Kjeldahli meetodit, aga samuti *Ames/Salmonella* testi genotoksilistele amiinidele [3, 14]. Amiinide määramiseks kasutatakse ka hea spetsiifilisusega ensüüm-immuunsorbtsioonmeetodit (*ELISA*), mille puhul kasutatakse ensüümiga märgistatud antikehasid, kus ensüüm muudab lisatava substraadi valgust neelavaks produktiks ning positiivset reaktsiooni mõõdetakse fotomeetriliselt [15]. Eraldi on välja töötatud meetod eelkõige histamiini ametlikuks spektrofotomeetriliseks määramiseks mereandides, õlledes ja veinides (*Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Communities method 957.07*) [16].

Amiinide kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks kasutatakse analüütilistest meetoditest gaasikromatograafiat, kõrgrõhuedelikkromatograafiat ja kapillaarelektroforeesi. Amiinide määramine kromatograafiliste meetoditega on problemaatiline, sest amiinid on suure polaarsusega [17]. Gaasikromatograafia

kromatogrammides olevad amiinide piigid on üldiselt leek-ionisatsioon detektori korral asümmeetrilised ja kujutavad endast nn. “sabatatud” piike (ing. *tailing peaks*) [18]. Kõrgrõhuedelikkromatograafia kromatogrammides on UV detektori korral amiinide piikide pindalad väiksemad võrreldes tegeliku kontsentratsiooniga [19].

Primaarsete ja sekundaarsete amiinide määramiseks gaasikromatograafiaga kasutatakse üldlevinumatest derivatiseerimismeetoditest alküülimist ning detektoritest lämmastik-fosfori termoionisatsioon detektorit (NPD), leek-ionisatsioon detektorit (FID), elektronhaarde detektorit (ECD) või leek fotomeetrilist detektorit (FPD) [20]. Alifaatsete, aromaatssete ja heterotsükliiliste amiinide määramiseks kõrgrõhuedelikkromatograafiaga kasutatakse derivatiseerimiseks 2,5-dihüdrosübensaldehüüdi, o-ftaalaldehüüdi või dimetüülaminoasobenseensulfonüülkloriidi ning detektoritest elektrokeemilist detektorit (ED), UV, kulonomeetrilist detektorit või flourestsents detektorit [21, 22].

Gaasi- ja kõrgrõhuedelikkromatograafiliste meetode kõrval kasutatakse ka kapillaarelektroforeesi, millel on hea lahutusefektiivsus ja väike analüüdi kulu [3]. Kapillaarelektroforeesi kasutatakse heterotsükliiliste ja aromaatssete amiinide määramiseks [2]. Detektorina kasutatakse UV, ED ja mass-spektromeetriat [3].

Amiinide analüüs gaasi- ja kõrgrõhuedelikkromatograafia ning kapillaarelektroforeesi meetoditega on aeganõudev, töömahukas ja kallid.

2.4. Erinevate amiini oksüdaaside omadused

Amiinide oksüdaase jagatakse kahte klassi: primaarseid mono- ja diamiine katalüüsiv vaske sisaldav amiini oksüdaas (EC 1.4.3.6) [23] ja primaarseid, sekundaarseid ja tertsiarseid amiine katalüüsiv flaviini sisaldav amiini oksüdaas (EC 1.4.3.4) [24]. Vaske sisaldaval amiini oksüdaasil (EC 1.4.3.6) on mitmeid triviaalnimesid, näiteks diamino oksüdaas, Cu-amiini oksüdaas, amiini oksüdaas, monoamiini oksüdaas [23] ja flaviini sisaldaval amiini oksüdaasil, näiteks türamiini oksüdaas, amiini oksüdaas, polüamiini oksüdaas [24].

Vaske sisaldava amiini oksüdaasi on leitud nii taimsetest kui ka loomsetest allikatest. Taimedest on amiini oksüdaasi leitud herne (*Pisum sativum*), läätses (*Lens esculenta*) ja kollase lupiini (*Lupinus luteus*) idudest [25]. Bakteritest *Escherichia coli*, *Arthobacter globiformis* [26], *Pseudomonas*´est [27]. Pärmisestest *Pichia*

angusta [27], *Zygosaccharomyces rouxii* [28]. Seentest *Acremonium* ja *Fusarium* liikidest [29]. Imetajatest on amiini oksüdaasi veise vereplasmas ja sea neerudes ning vereplasmas [23].

Amiini oksüdaas katalüüsib amiine vastavaks aldehüüdiks, ammoniaagiks ja vesinikperoksiidiks [30]:



Reaktsioon toimub kahes erinevas etapis ning toimub ping-pong mehhanismi alusel [31]:



Kõigepealt seostub ensüümiga amiin, tekib aldehüüd ja ensüümi redutseeritud vorm (E_{red}), mis on võimeline siduma hapniku. Selle tagajärjel toimub reaktsioon, mille käigus toimub hapniku muutumine vesinikperoksiidiks, vabaneb ammoniaak ja ensüümi oksüdeeritud vorm (E_{oks}) [31]. Ülevaade erinevatest allikatest pärit amiini oksüdaasi katalüütilistest omadustest on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Erinevatest allikatest eraldatud amiini oksüdaasi katalüütilised omadused

Substraat	Organism	K_m mM	Tingimused	Kirjanduse viide
Kadaveriin	<i>Trifolium subterraneum</i>	0,038	pH = 7,0; $t^\circ = 25^\circ \text{C}$	[32]
	<i>Porcine kidney</i>	0,15	pH = 7,4; $t^\circ = 22^\circ \text{C}$	[33]
	<i>Euphorbia characias</i>	0,47	pH = 7,1	[23]
	<i>Lens esculenta</i>	0,7	pH = 7,1	[23]
Histamiin	<i>Sus scrofa</i>	0,06	pH = 7,4	[23]
	<i>Pisum sativum</i>	0,22	pH = 8,5; $t^\circ = 30^\circ \text{C}$	[30]
	<i>Lathyrus sativus</i>	0,35	pH = 7,0; $t^\circ = 25^\circ \text{C}$	[34]
Dopamiin	<i>Escherichia coli</i>	0,029	pH = 7,2	[35]
	<i>Pisum sativum</i>	0,25		[23]
	<i>Aspergillus niger</i>	0,6	pH = 7,2 toatemperatuur	[36]
Metüülamiin	<i>Human</i> (meninges)	0,056	pH = 7,2 toatemperatuur	[37]
	<i>Hansenula polymorpha</i>	0,68		[23]
Dietüülamiin	<i>Sus scrofa</i>	66	pH = 7,4	[23]

Erinevatest allikatest eraldatud amiini oksüdaasi molekulmassiks on erinevatel andmetel saadud 113 kuni 180 kDa [25, 38]. Röntgenstruktuurianalüüsid näitavad, et amiini oksüdaasi dimeerne molekul sisaldab kahte aktiivtsentrit [39].

Amiini oksüdaasi aktiivsus sõltub paljudest faktoritest, millest olulisem on aktiivtsentri kättesaadavus. 1,4-diaminobutaan, 1,5-diaminopentaaan ja 2-fenüületüülamiin on amiini oksüdaasi põhisubstraadid [23]. On leitud, et vaseiooni asendamine ensüümi aktiivtsentris Co^{2+} , Zn^{2+} ja Ni^{2+} ionidega ei mõjuta oluliselt ensüümi aktiivsust [23, 40], kuid inhibeerivat toimet avaldavad Ca^{2+} , Mg^{2+} ja Hg^{2+} ioonid [23].

Amiini oksüdaasi aktiivsus sõltub keskkonna pH-st. Optimaalne pH, mille juures amiini oksüdaasi aktiivsus on maksimaalne histamiini, putrestsiini, kadaveriini korral vahemikus 6,4 kuni 7,5 ja dopamiini, fenüületüülamiini ja bensüülamiini korral ligikaudne 8,5 [23].

Temperatuuril üle 80°C on ensüüm ebastabiilne. 4°C juures ensüümi aktiivsus väheneb ligikaudu 2 korda 15 päeva jooksul. Amiini oksüdaasi aktiivsus säilib pikema aja vältel külmutatud olekus (-20°C , 12 kuud) [23].

2.5. Biosensorid amiinide määramiseks

Biosensorid on analüütilised seadmed, kus keemilise reaktsiooni signaal muudetakse elektriliseks või mõneks muuks mõõdetavaks signaaliks, mille alusel leitakse määratava aine kontsentratsioon. Biosensorid koosnevad kahest omavahel integreeritud põhikomponendist: bioloogilisest elemendist (ensüümid, antikehad, nukleiinhapped, mikroorganismid), mis annab sensorile spetsiifilisuse ja selektiivsuse ning transduktorist, mille abil muudetakse keemilise reaktsiooni signaal detekteeritavaks signaaliks.

Amiinide määramiseks kasutatavad biosensorid põhinevad amiini oksüdaasi, histamiini oksüdaasi, ksantiini oksüdaasi jt. bioaktiivsete ainete kasutamisel [41].

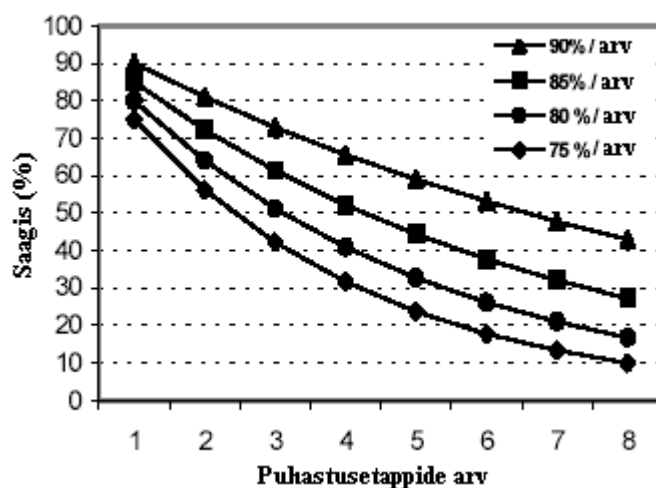
Amiini oksüdaasil põhinevad amperomeetrilised biosensorid baseeruvad Clarki hapnikuanduritel [30, 35] ning mõõdavad hapniku kontsentratsiooni muutumist amiinide oksüdeerimisreaktsioonis. Mõõdetava reaktsiooni kineetika sõltub ka lahustunud hapniku kontsentratsioonist, mis piirab taoliste sensorite kasutamist ilma hapnikuta keskkonnas, näit. *in vivo* mõõtmistel [42].

Amiini kontsentratsiooni määramiseks kasutatakse ka plaatina või süsinikelektroodi, mille puhul määratakse reaktsiooni käigus tekkinud vesinikperoksiidi hulka [43, 44]. Kaasnevate redoksprotsesside vältimiseks kasutatakse mediaatoraineid, mis vajavad madalaid tööpingeid. Mediaatorid transpordivad elektrone elektrodile otse ensüümi aktiivtsentrist. Tüüpilised mediaatorid on ferrotseen karboksüülhape [30] ja dimetüül ferrotseen [45]. Vesinikperoksiidi võib määrata ka optilise transduktori abil [46]. Ioonselektiivsete elektrodidega saab määrata amiinide oksüdeerimisreaktsioonide käigus tekkivat ammooniumiooni [47].

Biosensorite selektiivsuse tõstmiseks ning tööpiirkonna laiendamiseks on vajalik võimalikult tihe kontakt biosensori bioselektiivse elemendi ja signaali muunduri vahel. Ensüümide puhul on parimaks sidumismeetodiks nende keemiline immobiliseerimine muunduri pinnale.

2.6. Amiini oksüdaasi puhastamine

Valgu puhastamiseks koostatakse plaan, milles on märgitud valgu puhastamise allikas, valgu edasine rakendusvaldkond ning puhastamise eesmärk, kas kvalitatiivne või kvantitatiivne puhastamine. Tegevuskavas täpsustatakse puhastusetappide meetod ja nende arv, sest iga puhastusetapiga kaasnevad kaod. Valgu saagise sõltuvus puhastusetappide arvust on toodud joonisel 1.



Joonis 1. Valgusaagise sõltuvus puhastusetappide arvust [48]

Olenevalt ensüümi puhastamise eesmärkidest valitakse sobiv ensüümi allikas. Enne puhastamist on vajalik algmaterjali eeltöötlus, et saada võimalikult homogeenne materjal, mille edaspidiseks töötamiseks kasutatakse filtreerimist või tsentrifugimist. Sellele järgnevad mitmesugused puhastamise meetodid. Tavaliselt kasutatakse valgu kontsentreerimiseks ionivahetuskromatograafiat, kus eraldatakse valke vastavalt laengule [49]; hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafiat, kus eraldatakse valke vastavalt nende hüdrofoobsusele [30] ja/või afiinsuskromatograafiat, kus valgud eraldatakse vastavalt nende bioloogilisele funktsioonile või individuaalsele keemilisele struktuurile [50].

Amiini oksüdaasi korral kasutatakse algallikana mitmesuguseid erinevaid organisme. Herne ja põldlambaläätse idudest ning sea neerudes leiduva amiini oksüdaasi puhastamiseks kasutatakse sadestusmeetodit ja kromatograafilistest meetoditest ionivahetus-, afiinsus- ja geelkromatograafiat [49-51]. Herne idudest eraldatud amiini oksüdaasi puhastussaagiseks on saadud 42% ja ensüümi eriaktiivsuseks 1630 nkat/mg [50], põldlambaläätse idude korral on puhastussaagiseks saadud 42% ja eriaktiivsuseks 916 nkat/mg [49] ning seaneerudest on puhastussaagiseks saadud 40% ja eriaktiivsuseks 706 nkat/mg [51].

Parimaid tulemusi valkude isoleerimisel ja kontsentreerimisel on saadud ionivahetus- kui afiinsuskromatograafiaga, mille järel kasutatakse täiendavalt veel ionivahetuskromatograafiat või geelfiltratsiooni.

3. EKSPERIMENTAALNE OSA

3.1. Kasutatud ained

Kaaliumdivesinikfosfaat (Реахим, х.ч.)
Kaaliumhüdroksiid (Chemapol, ч.)
Kaaliumkloriid (Реахим, х.ч.)
Аммоoniumsulfaat (Реахим, х.ч.)
Naatriumkarbonaat (Реахим, х.ч.)
Kaaliumnaatriumtartraat (Реактив, х.ч.)
Vasksulfaatpentahüdraat (Merck)
Folin-Ciocalteus reaktiiv (Merck)
Dekstriinsinine (M = 2000 kDa, Rearal, Ungari)
Alkoholi oksüdaas (M = 600 kDa, EC 1.1.3.13, Sigma)
Katalaas (M = 232 kDa, EC 1.11.1.6, Sigma)
Glükoosi oksüdaas (M = 158 kDa, EC 1.1.3.4, Sigma)
Bovine serum albumine (M=66 kDa, BSA, Boehringer Mannheim GmbH)
Tsütokroom C (M = 12,6 kDa, Sigma)
Kaaliumdikromaat (Реахим, х.ч.)
Kadaveriin (Ferak Berlin)
Histamiin (Fluka AG)
Dopamiin (Sigma)
1,7-diaminoheptaan (Fluka AG, Buchs SG)
Dietüülamiin (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
N,N-dietüülaniilin (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
Aniliin (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
Metüülamiin (25 %-line lahus, Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
Trietüülaminoetüülselluloos (TEAE-tselluloos, Реахим)
Sephadex G-200 (Pharmacia)

3.2. Kasutatud aparatuur

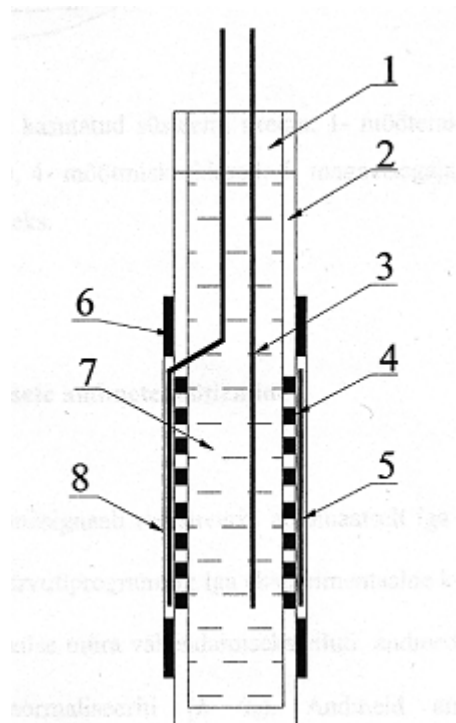
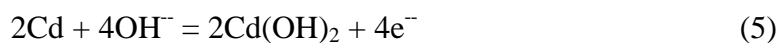
Amiini oksüdaasi aktiivsuse määramiseks kasutati baasandurina silindrilist Clark'i tüüpi hapnikuandurit (Elke Sensor LLC), mille konstruktsioonist annab

ülevaate joonis 2. Anduri membraani pinna suurus oli 5,78 cm² ja polüetüleenkile paksus 60 µm.

Sensor töötab galvaanilise elemendina, mille katoodil toimub elektrokeemiline hapniku redutseerumine:



Hapnikuanduri katoodiks on kroomnikkeltraat, mis on keritud anduri perforeeritud korpusele. Perforatsioon tagab andurit täitva elektrolüüdi (kaaliumhüdroksiidi vesilahus) vaba pääsu elektroodi pinnale. Katoodi välispind on kaetud polüetüleenkilega, mis on takistusteks suurtele molekulidele ja ioonidele, kusjuures hapnik difundeerub piisava kiirusega, et tagada registreeritav vool. Anduri korpuse sees asub pressitud kaadmiumilaastudest anood, millel toimub kaadmiumi oksüdatsioon [52]:

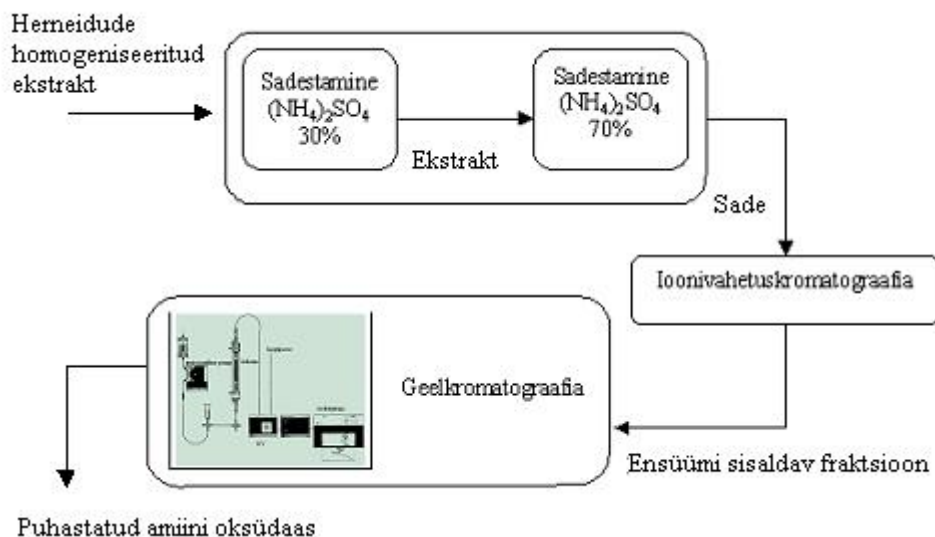


Joonis 2. Hapnikuanduri läbilõige. 1 - tihend, 2 - korpus, 3 - anood, 4 - korpuse perforatsioon, 5 - katood, 6 - kapronniit, 7 - elektrolüüdilahus koos pressitud Cd laastudega, 8 - polüetüleenkile

3.4. Amiini oksüdaasi puhastamine herne idudest (*Pisum sativum*)

Herne seemned idandati, kasvatati pimedas 25⁰ C juures ja seitsme päeva pärast eemaldati herneidud teradest. Idud homogeniseeriti ja saadud homogenisaat filtreeriti suuremate osakeste eraldamiseks läbi nailonriidest sõela. Ekstrakti tsentrifugeeriti 5000 G juures 60 minutit ja tekkinud sade eemaldati. Seejärel lisati saadud ekstraktile ammooniumsulfaati kuni kontsentratsioon oli 30% ja inkubeeriti 30 minutit segades ning tsentrifugeeriti 5000 G juures 60 minutit. Sade eemaldati ja ekstraktile lisati ammooniumsulfaati kuni selle kontsentratsioon lahuses tõusis 70%-ni. Saadud lahust segati 30 minutit ja tsentrifugeeriti 5000 G juures 60 minutit. Saadud sade lahustati 20 ml 0,1M kaaliumfosfaatpuhvrts (pH = 7,0). Väikeste molekulide eemaldamiseks dialüüsisiti proovi 12 tundi 800ml 0,1M kaaliumfosfaatpuhvrts ja 12 tundi 800ml 0,02M kaaliumfosfaatpuhvrts (pH = 7,0) [49].

Dialüüsitud lahus segati eelnevalt aktiveeritud 197 ml TEAE-tselluloosiga, mis seejärel kanti kolonni (Ø 2.5 cm, h = 40 cm) ning pesti 600 ml 0,02 M kaaliumfosfaatpuhvrtsiga (pH = 7,0). Seejärel elueeriti kolonni 0,1 M KCl 0,02 M fosfaatpuhvrts lahusega (pH = 7,0) voolukiirusega 0,153 ml/min ja eluaat koguti 11,5 ml suurustesse fraktsioonidesse. Ensüümi sisaldavat proovi dialüüsisiti 24 tundi 800 ml 0,02 M kaaliumfosfaatpuhvrts (pH = 7,0). Lõpuks puhastati ensüümilahust geelkromatograafiliselt. Selleks kasutati Sephadex G-200-ga täidetud kolonni (Ø 1.5 cm, h=90 cm). Proovi elueeriti 0,02 M kaaliumfosfaatpuhvrtsiga voolukiirusega 0,153 ml/min ja koguti 2 ml kaupa fraktsioonidesse. Ülevaatliskum skeem valgust puhastamisest on toodud joonisel 4. Kogu amiini oksüdaasi puhastamise protsess viidi läbi 4⁰ C juures.



Joonis 4. Amiini oksüdaasi puhastamise skeem

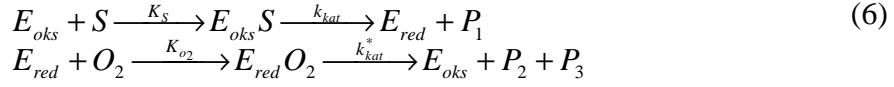
3.5. Valgu kontsentratsiooni ja molekulmassi määramine

Valgu kontsentratsiooni määrati UV-detektoriga (UV-1, Pharmacia, Rootsi) neeldumise järgi lainepikkusel $\lambda = 280$ nm. Valgu kontsentratsiooni eri fraktsioonides määrati spektrofotomeetriliselt Lowry-Hartree meetodil [53] Unicam UV 300-ga (Thermo Spectronic).

Amiini oksüdaasi molekulmass määrati geelkromatograafiliselt Sephadex G-200-ga täidetud kolonni abil (\varnothing 1.5 cm, h=90 cm). Markerainetena kasutati dekstriinsinist (2 000 kDa), alkoholi oksüdaasi (600 kDa), glükoosi oksüdaasi (158 kDa), katalaasi (232 kDa), BSA (66 kDa), tsütokroom C (12,6 kDa) ja kaaliumdikromaati (0,294 kDa).

3.6. Hapnikuanduril põhineva biosensori matemaatilise mudeli lühikirjeldus

Amiini oksüdaas katalüüsib amiini oksüdeerumist lahustunud hapniku toimel. See reaktsioon toimub ping-pong mehhanismi kohaselt [31]:



kus S on substraat, E_{oks} ensüümi oksüdeeritud vorm, $E_{oks}S$ ensüüm-substraat kompleks, E_{red} ensüümi redutseeritud vorm, $E_{red}O_2$ ensüüm-hapnik kompleks, P_1 , P_2 ja P_3 reaktsiooni produktid ning k_{kat}^* on protsessi näiv katalüütiline konstant ja k_{kat} on substraadi oksüdatsiooni katalüütiline konstant.

Biosensori normaliseeritud väljundvoolu $I(t)/I_0$ iseloomustamiseks ja reaktsiooniparameetrite leidmiseks kasutati amperomeetrilise biosensori mudelit, mis kirjeldab väljundvoolu muutumist ajas 3-parameetrilise funktsioonina [54]:

$$\frac{I(t)}{I_0} = A \exp(-Bt) + (1-A) - 2A \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{t_s}{n^2/B - t_s} \left[\exp(-Bt) - \exp\left(-n^2 \frac{t}{t_s}\right) \right] \tag{7},$$

kus $I(t)$ on biosensori väljundvool ajamomendil t ; I_0 on väljundvool reaktsiooni algmomendil $t = 0$. Parameetrid A and B on kompleksparameetrid ja sõltuvad substraadi kontsentratsioonist hüperboolselt.

$$A = \frac{k_{kat}^* [E]_{\text{iild}} \cdot c_S^{\text{lahus}}}{k_{dif}^{O_2} K_{O_2} K_S + (k_{kat}^* [E]_{\text{iild}} + k_{dif}^{O_2} K_{O_2}) c_S^{\text{lahus}}} \tag{8}$$

$$B = \frac{\frac{k_{kat}^* [E]_{\text{iild}}}{K_{O_2}} c_S^{\text{lahus}}}{K_S + c_S^{\text{lahus}}} + k_{dif}^{O_2} \tag{9}$$

kus $[E]_{\text{iild}}$ vastab ensüümi kontsentratsioonile lahuses, K_S on ensüümi-substraat kompleksi dissotsiatsiooni koefitsient ja K_{O_2} on ensüüm-hapnik kompleksi dissotsiatsiooni koefitsient, kus $k_{dif}^{O_2}$ on hapniku näivad difusiooni koefitsient ning c_S^{lahus} substraadi kontsentratsioon lahuses.

Parameeter A vastab biosensori kogumuutusele ajal $t \in \mathbb{R}^+$ (statsionaarne olek) ja parameeter B on kineetiline parameeter, mis iseloomustab tasakaaluolekueelset

hapniku kontsentratsiooni vähenemise kiirust; τ_s on ajakonstant, mis iseloomustab sensori inertsi [54]. Parameetrid A , B and τ_s on üksteisest sõltumatud

3.7. Andmete registreerimine ja töötlemine

Hapnikuanduri väljundvoolu muutust ajas registreeriti automaatselt arvuti abil, mõõtmiste intervall oli 1 sekund. Keskkonna mõjude vähendamiseks siluti eksperimentaalseid andmeid üle 10 punkti. Seejärel eksperimentaalsed andmed normaliseeriti $I(t)/I(o)$. Eksperimentaalsetest andmetest arutati mõõdetavat reaktsiooni iseloomustavad parameetrid eespoolkirjeldatud mudeli alusel (valem 7) mittelineaarsel vähimruutude meetodil. Selleks kasutati programme SigmaPlot[®] 5.0 (SPSS Software, USA) ja GraphPad Prism[®] 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

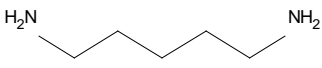
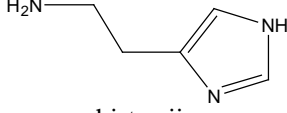
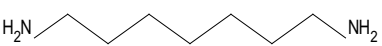
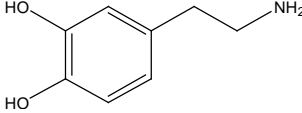
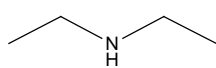
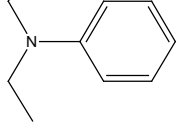
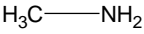
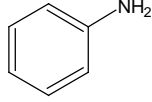
4. TULEMUSED JA ARUTELU

4.1. Amiini oksüdaasi aktiivsuse määramine erinevate amiinide suhtes

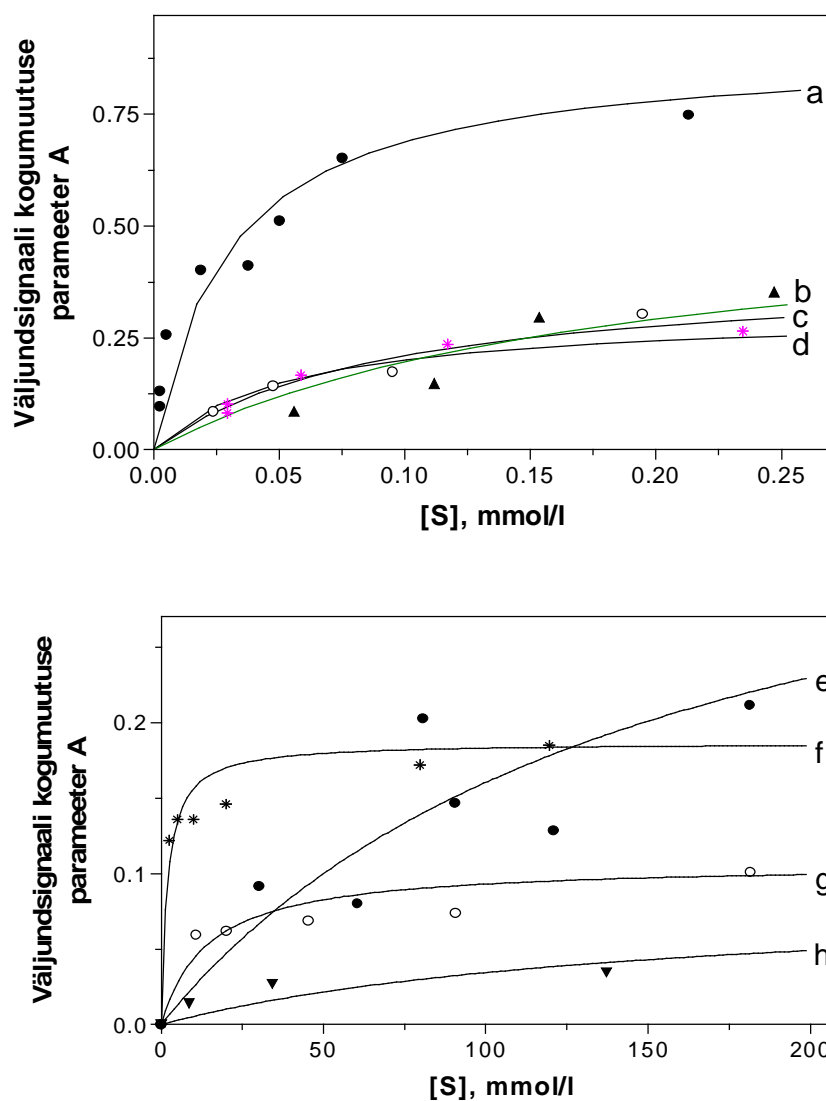
Amiini oksüdaasi puhastati ja määrati tema selektiivne aktiivsus erinevate amiinsete substraatide suhtes eesmärgiga kasutada puhastatud ensüümi biosensori selektiivse elemendina. Üheks paremaks allikaks amiini oksüdaasi eraldamiseks on *Pisum sativum*, sest see on odav ja laialt kättesaadav. Samuti on kirjanduse andmetel *Pisum sativum*-ist puhastatud amiini oksüdaasi puhul saadud eriaktiivsuse kõrgem väärtus kui teistest allikatest eraldatud amiini oksüdaasil.

Homogeniseeritud herneidude ekstraktis oleva amiini oksüdaasi aktiivsust määrati kaheksa erineva amiini suhtes eesmärgiga uurida herneidudest eraldatud amiini oksüdaasi selektiivset aktiivsust ja leida sobiv substraat amiini oksüdaasi aktiivsuse määramiseks ja selle puhastamise erinevate etappide efektiivsuse hindamiseks. Amiini oksüdaasi poolt katalüüsivat reaktsiooni Clark'i tüüpi hapnikuanduril põhineva biosensori süsteemi abil. Primaarsetest amiinidest uuriti kadaveriini, histamiini, 1,7 – diaminoheptaani, dopamiini, metüülamiini ja aniliini, sekundaarsetest amiinidest dietüülamiini ja tertsiaarsetest amiinidest N,N-dietüülaniliini (tabel 2). Nende hulgas oli tugeva biogeense toimega amiine nagu kadaveriin, histamiin ja dopamiin, mis tekivad organismis ja võivad esile kutsuda allergilisi reaktsioone [11].

Tabel 2. Amiinid, mille suhtes määrati amiini oksüdaasi aktiivsus

	
kadaveriin	histamiin
	
1,7 - diaminoheptaan	dopamiin
	
dietüülamiin	N, N – dietüülaniliin
	
metüülamiin	aniliin

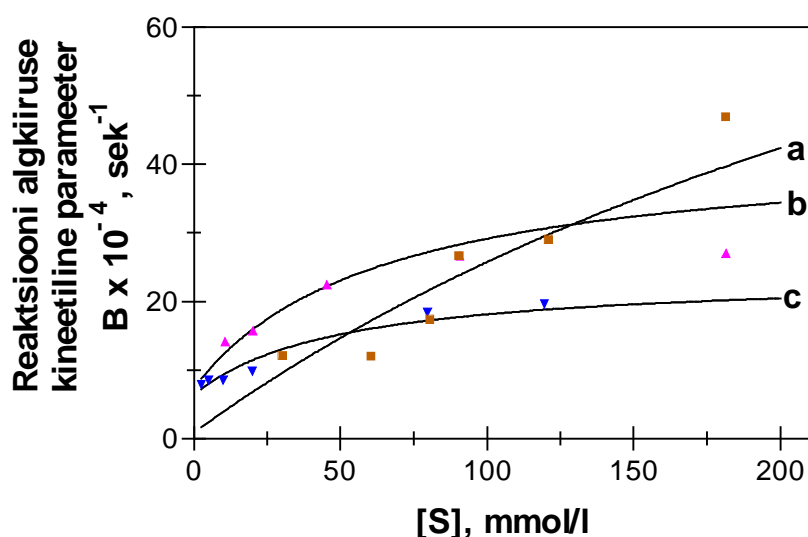
Amiini oksüdaasi poolt katalüüsitavat reaktsiooni iseloomustati biosensori normaliseeritud väljundsignaali alusel arvutatud parameetrite (võrrandid 8 ja 9) abil. Tasakaaluese signaali andmetest arvutati väljundvoolu kogumuutuse parameeter A ning kineetiline parameeter B ning koostati graafikud nende parameetrite sõltuvuse kohta erinevate amiinide kontsentratsioonist, kusjuures ensüümi kontsentratsioon jäi samaks. Väljundvoolu kogumuutuse (parameeter A) sõltuvus erinevate substraatide kontsentratsioonidest on toodud joonisel 5.



Joonis 5. Väljundsignaali kogumuutuse sõltuvus substraadi kontsentratsioonist: a – kadaveriin, b – 1,7-diaminoheptaan, c – histamiin, d – dopamiin, e – dietüülamiin, f – N, N – dietüülaniliin, g – metüülamiin, h – aniliin. Mõõtmised viidi läbi 0,1 M fosfaatpuhvrts (pH = 7,0), temperatuuril 25⁰ C ja [E_{amiini oksüdaas}] = 59,6 nkat/ml

Uuritud amiinid jagunevad kahte gruppi lähtuvalt efektiivsest kontsentratsioonide vahemikust, mille puhul on detekteeritav muutus väljundsignaali kogumuutuse parameetri väärtuses. Primaarsed amiinid (kadaveriin, 1,7-diaminoheptaan, histamiin ja dopamiin) moodustavad omaette rühma, mis põhjustab parameetri A detekteeritava muutuse umbes 1000 korda väiksematel kontsentratsioonidel kui sekundaarsed ja tertsiaarsed amiinid (joonis 5).

Väljundsignaali kogumuutuse kõrval arvutati ka kineetiline parameeter B. Primaarsete amiinide puhul selle parameetri jaoks eeldatavat hüperboolset sõltuvust amiinide kontsentratsioonist ei saadud, mis võis olla tingitud kasutatava hapnikuanduri vähesest tundlikkusest ja suurest inertsist. Parameetri B sõltuvused dietüülamiini, dietüülaniliini ja metüülamiini korral (joonis 6).



Joonis 6. Reaktsiooni algkiiruse sõltuvus substraadi kontsentratsioonist: a – dietüülamiin, b – N, N – dietüülaniliin, c – metüülamiin. Mõõtmised viidi läbi 0,1 M fosfaatpuhvrts (pH = 7,0), temperatuuril 25⁰ C ja [E_{amiini oksüdaas}] = 59,6 nkat/ml

Reaktsiooni iseloomulike parameetrite alusel leiti K_s väärtused erinevatele substraatidele, mis on toodud tabelis 3.

Tabel 3. *Pisum sativum* amiini oksüdaasi katalüütilised omadused ja nende võrdlemine teistest allikatest eraldatud amiini oksüdaasidega.

Eksperimentaalsed andmed			Kirjandusest saadud andmed			
Substraat	Parameeter A_{max}	K_S mM	Organism	K_m mM	Tingimused	Kirjanduse viide
kadaveriin	0,90	0,29±0,10	<i>Trifolium subterraneum</i>	0,03	pH = 7,0 $t^\circ = 25^\circ\text{C}$	[32]
			<i>Porcine kidney</i>	0,15	pH = 7,4 $t^\circ = 22^\circ\text{C}$	[33]
			<i>Euphorbia characias</i>	0,47	pH = 7,1	[23]
			<i>Lens esculenta</i>	0,7	pH = 7,1	[23]
histamiin	0,43	0,15±0,02	<i>Sus scrofa</i>	0,06	pH = 7,4	[23]
			<i>Pisum sativum</i>	0,22	pH = 8,5 $t^\circ = 30^\circ\text{C}$	[30]
			<i>Escherichia coli</i>	0,33	pH = 7,2	[34]
			<i>Lathyrus sativus</i>	0,35	pH = 7,0 25°C	[34]
dopamiin	0,27	0,043±0,012	<i>Escherichia coli</i>	0,02	pH = 7,2	[35]
			<i>Pisum sativum</i>	0,25		[23]
			<i>Aspergillus niger</i>	0,6	pH = 7,2 toatemperatuur	[36]
metüülamiin	0,12	2,1±2,3	<i>Human (meninges)</i>	0,05	pH = 7,2 toatemperatuur	[37]
			<i>Hansenula polymorpha</i>	0,68		[23]
dietüülamiin	0,35	329±183	<i>Sus scrofa</i>	66	pH = 7,4	[23]
1, 7 - dietüülheptaan	0,71	0,43±0,11				
N, N - dietüülaniliin	0,19	5,0 ± 2,8				
aniliin	0,37	1660 ± 2350				

Dietüülamiini ja aniliini puhul ei olnud uuritud väljundvoolu kogumuutuse sõltuvus kontsentratsiooni vahemikus (0 kuni 400 mM) üheselt kirjeldatav ning seetõttu ei olnud nende substraatide jaoks võimalik arvutada usaldusväärseid K_s väärtusi.

Uuritud ühenditest oli suurim signaali kogumuutus kadaveriini puhul - 90%, mis oli vähemalt 2 korda suurem väljundvoolu kogumuutusest teiste primaarsete amiinide korral. Selle alusel leiti, et herne idudes sisalduva amiini oksüdaasi (PSAO)

aktiivsuse määramiseks erinevates puhastusetappides ja puhastuse efektiivsuse hindamiseks on sobivaim substraat kadaveriin.

Kadaveriini korral saadi K_s väärtuseks $0,29 \pm 0,10$ mM. Selle konstandi väärtus sõltub kasutatud meetoditest ja varieerub oluliselt erinevate autorite töödes olles vahemikus 0,038 mM (*Trifolium subterraneum*) [32] kuni 0,7 (*Lens esculenta*) [23].

Arvutatud väljundvoolu kogumuutuse sõltuvusest kadaveriini kontsentratsioonist (joonis 5) leiti kadaveriini optimaalseks kontsentratsiooniks PSAO aktiivsuse määramisel 0,12 mM.

4.2. Amiini oksüdaasi eraldamine ja puhastamine ning puhastusprotsessi efektiivsuse hindamine

Amiini oksüdaasi saamiseks herne idudest (*Pisum sativum*) lähtuti kolmeetapilise puhastuse eeskirjast [49]. Puhastusprotsessi lõpptulemusena saadi puhastamise saagiseks 52%, kusjuures PSAO eriaktiivsus oli 1561,1 nkat/mg valgu kohta. Kogu protsessi käigus saavutati PSAO eriaktiivsuse tõus 35 korda. PSAO eriaktiivsus puhastamise erinevate protseduuride ja etappide järel on toodud tabelis 4. Samuti on tabelis 4 toodud puhastamise efektiivsus ning puhastamise saagis erinevatel etappidel.

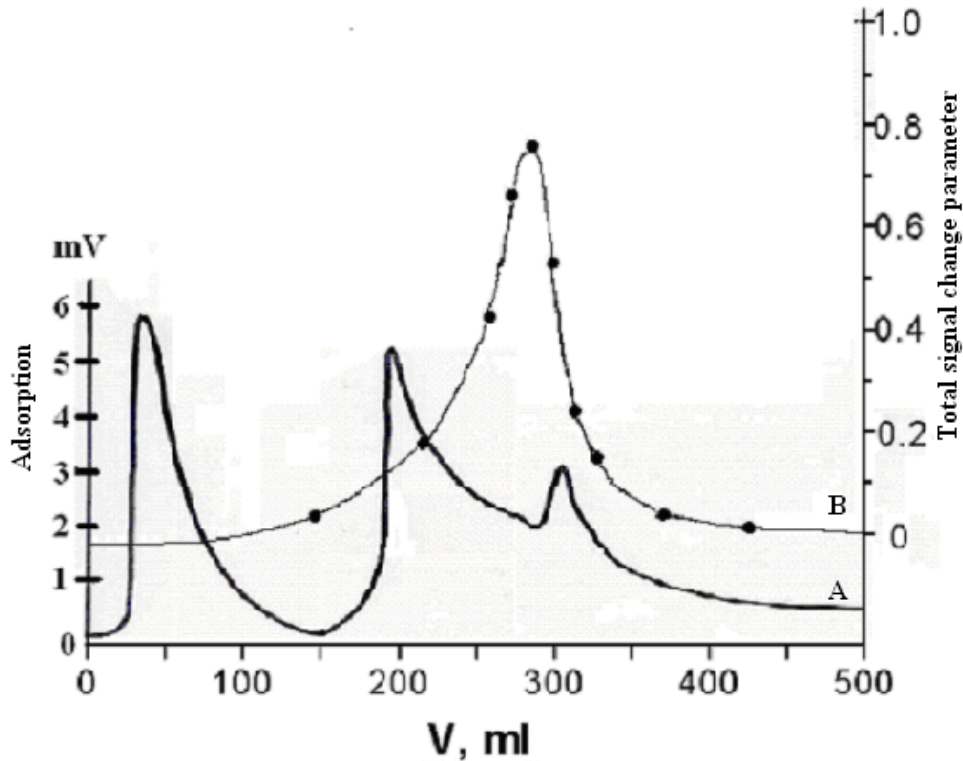
Kirjanduse andmetel on herne idudest eraldatud amiini oksüdaasi puhastussaagiseks saadud kõige rohkem 42%, eriaktiivsuseks 1630 nkat/mg [50], erinevatest allikatest eraldatud ensüümide (nt. seaneerudest) korral olid puhastussaagiste ja eriaktiivsuste väärtused olulised madalamad [51].

Esialgsest herneidude ekstraktist eraldati tsentrifuugimise teel sade, mis sisaldas rakumembraanide tükke. Saadud ekstraktis oli PSAO eriaktiivsus 49,8 nkat/mg valgu kohta ja lahuses oli 86% esialgsest valgust. Saadud PSAO-d sisaldavast ekstraktist eraldati $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ga sadestades liitvalgud ja järelejäänud rasvad. Seejärel sadestati PSAO-d sisaldav fraktsioon, milleks viidi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kontsentratsioon proovis 70%-ni. Sadestamise käigus oli PSAO kadu suhteliselt suur - selle etapi lõpus oli ensüümi võrreldes algsega järel 65,2%. Samal ajal oli valgu sadestamine 70%-lise $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ga väga efektiivne, andes 4-kordse PSAO eriaktiivsuse tõusu (67,6 kuni 230,8 nkat/mg valgu kohta, tabel 4)

Tabel 4. PSAO puhastamine

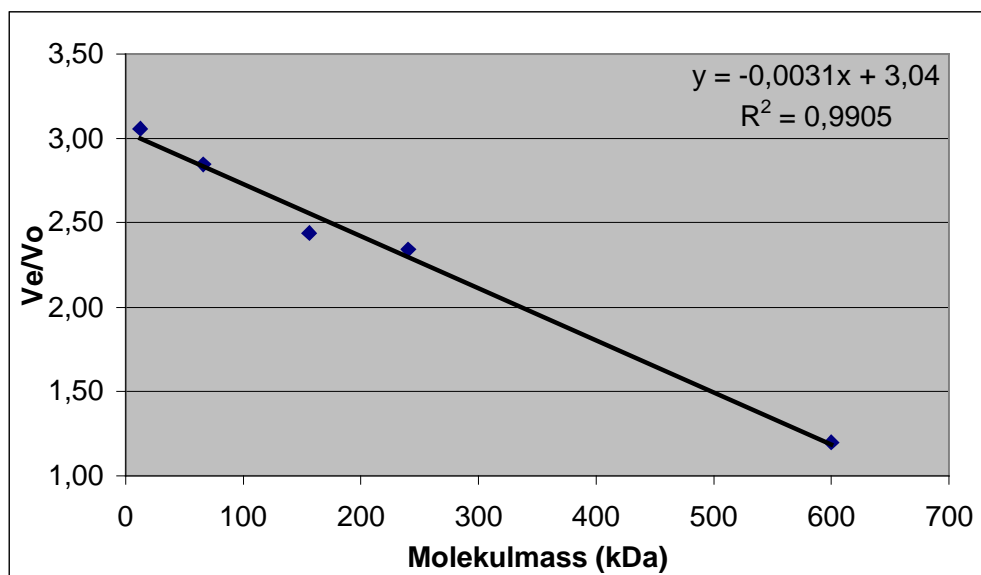
Nr.		Valgu mass (mg)	PSAO eriaktiivsus (nkat/mg valgu kohta)	Puhastamise efektiivsus	Puhastamise saagis (%)
1.	Esialgne ekstrakt	1198	44,9	1	100
2.	Tsentrifugeeritud ekstrakt	926	49,8	1,1	85,7
3.	Sadestamine 30% -lise (NH ₄) ₂ SO ₄ -ga ekstrakt	534	67,6	1,5	67,1
4.	Sadestamine 70% -lise (NH ₄) ₂ SO ₄ -ga sade	152	230,8	5,1	65,2
5.	Ioonivahetus-kromatograafia	53	557,7	12,4	55,0
6.	Geelkromatograafia (Sephadex G-200)	18	1561,1	34,8	52,2

Madalmolekulaarsed soolad eraldati PSAO sisaldavast lahusest dialüüsimise teel. Ensüümi edasiseks isoleerimiseks ja kontsentreerimiseks puhastati dialüüsitud lahust kromatograafiliste meetoditega. Esmalt kasutati ioonivahetuskromatograafiat, kusjuures kolonni täitmiseks kasutati TEAE–tselluloosi. Seostumata valgu eraldamiseks pesti kolonni 600 ml 0,02 M fosfaatpuhvriga. Seejärel elueeriti kolonni 0,1M KCl lahusega 0,02M fosfaatpuhvris (pH = 7,0). Tulemuseks saadi erinevate afiinsustega valkude kromatogramm (joonis 7 A). Märkimisväärne kogus nõrgalt seostunud valku väljus kolonnist KCl voolutamise alguses. Eluaadi erinevates fraktsioonides määrati PSAO aktiivsus elektrokeemiliselt hapnikuanduri abil (joonis 7 B). PSAO-d sisaldav fraktsioon väljus kolonnist ühtse piigina, kusjuures PSAO aktiivsus hakkas eluaadis kasvama siis, kui KCl kontsentratsioon kolonnis oli saavutanud maksimumväärtuse. Kolonniga nõrgalt seostunud valgu fraktsioonis PSAO aktiivsus puudus (joonis 7 B). Huvitav on märkida ka seda, et valgu kontsentratsiooni maksimumid ja PSAO aktiivsuse maksimumid ei langenud kokku. PSAO edasiseks puhastamiseks kasutati fraktsioone, mis olid kogutud vahemikus 246-316 ml. Ioonivahetuskromatograafiat kasutades saadi 2,5-kordne PSAO eriaktiivsuse tõus ning selle etapi lõpus oli saagis 55% (tabel 4).



Joonis 7. Ionivahetuskromatograafia *TEAE*-tselluloosil. Kolonni elueeriti 0,1M KCl lahusega 0,02 M fosfaatpuhvis (pH = 7,0). Valgu kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriselt neeldumise järgi $\lambda = 280$ nm (A); amiini oksüdaasi aktiivsus elektrokeemiliselt 0,12 mM kadaveriini suhtes (B)

Saadud PSAO-d sisaldava ekstrakti edasiseks puhastamiseks kasutati geelkromatograafiat. Kasutati Sephadex G-200-ga täidetud kolonni, mille abil saab eraldada valke 5 kuni 600 kDa-ni. Kolonni kalibreerimiseks kasutati kuut erinevat markerainet. Nende elueerimisruumalade alusel koostati kalibreerimisgraafik V_e/V_0 joonis 8, mille alusel määrati ka PSAO molekulmass. Kasutatud kolonni iseloomustavad suurused erinevate markerainete jaoks on toodud tabelis 7. Mobiilse faasi ruumala määrati dekstriinsinise abil ($M = 2000$ kDa) ja selle ruumalaks saadi $V_0 = 147$ ml. Statsionaarse faasi ruumala määramiseks kasutati kaaliumdikromaati ($M = 0,294$ kDa). PSAO puhastamiseks kasutatud kolonni puhul saadi V_t suuruseks 510 ml. Statsionaarse faasi ruumalaks saadi $V_i = V_t - V_0 = 363$ ml.



Joonis 8. Sephadex G-200 (\varnothing 1.5 cm, h = 90 cm) kolonni V_e/V_o sõltuvus valgu molekulmassist. Markervalgu sisaldus määrati spektrofotomeetriliselt neeldumise järgi lainepikkuse $\lambda = 280$ nm juures

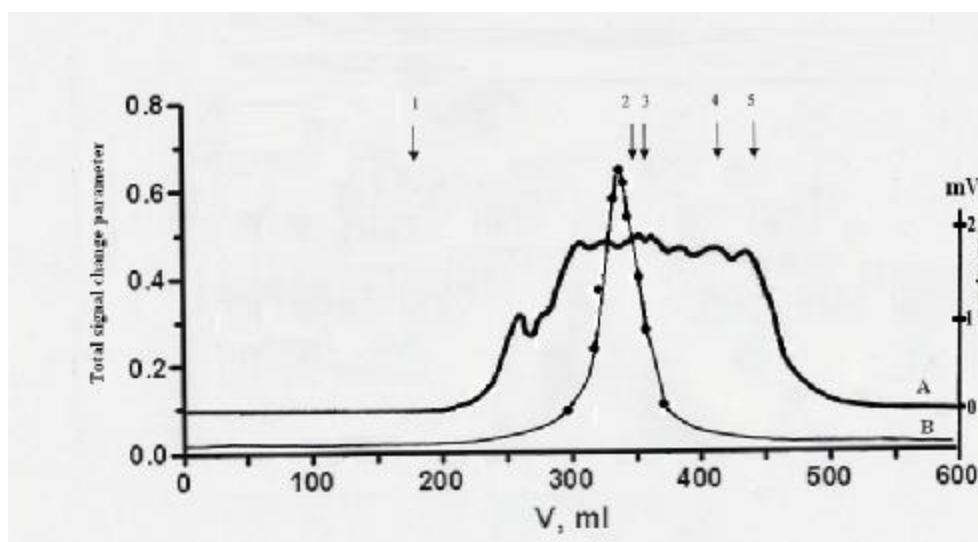
Geelkromatograafia käigus õnnestus eraldada PSAO-d sisaldav fraktsioon, milles PSAO eriaktiivsus oli 1561,1 nkat/mg valgu kohta. Selle puhastusetapi käigus suurenes eriaktiivsus 2,8 korda, kusjuures PSAO kadu oli ainult 5%.

Amiini oksüdaasi molekulmassiks saadi 220 ± 25 kDa, mis jääb samasse suurusjärku kirjanduses toodud andmetega [25, 38].

Tabel 5. Sephadex G-200 (\varnothing 1.5 cm, h = 90 cm) täidetud kolonni iseloomustavad parameetrid erinevate markerainete korral.

Nr	Markeraine (kDa)	Molekulmass (kDa)	V (ml)	V_e/V_o	Jaotuskoefitsient (K_d)	Mahtuvusfaktor (k')	Teoreetilised taldrikud (N)	Lahutuvus (R)
1.	Dekstriin sinine	2000	147	1	0	0	252	-
2.	Alkoholi oksüdaas	600	176	1,2	0,08	0,2	860	0,88
3.	Katalaas	232	344	2,3	0,54	1,3	1383	5,33
4.	Glükoosi oksüdaas	158	358	2,4	0,58	1,4	1774	0,39
5.	BSA	66	418	2,8	0,75	1,8	1936	1,67
6.	Tsütokroom C	12,6	449	3,1	0,83	2,1	959	0,67
7.	$K_2Cr_2O_7$	0,294	510	3,5	1,00	2,5	581	0,89

Kogu PSAO puhastamise protsessi käigus oli ensüümi kadu kõige suurem sadestamisel, ligikaudu 24%. Kromatograafilistel puhastusetappidel oli kadu kokku ligikaudu 20%. Peale proovi esialgset ettevalmistust oli kõikide puhastusetappide jooksul ensüümi saagis kokku 78%. Saadud tulemust võib võrrelda varasemate amiini oksüdaasi puhastamise tulemustega pidada väga heaks, sest nii saagis kui PSAO eriaktiivsus on kõrgemad kui varem saadud puhastustel.



Joonis 9. Geelkromatograafia Sephadex G-200 kolonnil. Valgu sisaldus oli määratud neeldumise järgi lainepikkusel $\lambda = 280$ nm (A). Amiini oksüdaasi aktiivsus määrati elektrokeemiliselt 0,12 mM kadaveriini suhtes (B). Nooltega on tähistatud markervalkude elueerimisruumalad: 1) alkoholi oksüdaas (600 kDa), 2) katalaas (232 kDa), 3) glükoosi oksüdaas (158 kDa), 4) BSA (66 kDa) ja 5) tsütokroom C (12,6 kDa).

Saadud amiini oksüdaasi säilitati külmutatud temperatuuril -18° C. Nendes tingimustes vähenes ensüümi aktiivsus 50% kahe kuu möödudes.

4.3. Biosensori konstrueerimise võimalused puhastatud PSAO-ga

PSAO puhastamiseks kasutati ensüümi algallikana herne idusid, mis on hästi kättesaadav ja odav tooraine võrreldes loomsete organismide- ja mitmesuguste bakteritega. Ensüümi puhastamiseks kasutati 1 kg kuivatatud herneid. Sellest toorainest saadud PSAO hulga alusel oleks võimalik konstrueerida umbes 25 biosensorit, mille väljundsignaali muutus on kasutatud hapnikuanduriga detekteeritav (väljundsignaali kogumuutus vähemalt 20%)

Puhastatud PSAO-d võib koos hapnikuanduriga kasutada nii solubiliseeritud kui ka immobiliseeritud kujul, kusjuures viimasel juhul on biosensori selektiivset elementi võimalik kasutada korduvalt. Immobiliseerimisel peaks suurenema ka PSAO stabiilsus. Puhastatud PSAO immobiliseerimine kandjale ja immobiliseerimise mõju uurimine PSAO katalüütilistele omadustele ja stabiilsusele ongi uurimistöö lähem eesmärk

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida *Pisum sativum* amiini oksüdaasi (PSAO, E.C 1.4.3.6) puhastamise võimalusi ja selle ensüümi kasutamiseks hapnikuanduril baseeruva biosensori bioselektiivse elemendina amiinide määramiseks.

Hapnikuanduri abil mõõdeti PSAO selektiivset aktiivsust erinevate amiinide suhtes, suurim signaali kogumuutus saadi kadaveriini korral, mida kasutati seejärel PSAO puhastamise efektiivsuse hindamiseks. Ensüümi puhastamise erinevate etappide efektiivsust iseloomustati hapnikuanduri signaali alusel arvatatud PSAO poolt katalüüsitud reaktsioonide parameetrite abil. Kolme-etapilisel *Pisum sativum* amiini oksüdaasi puhastamisel saadi saagiseks 78% ja PSAO eriaktiivsuseks 1561,1 nkat/mg valgu kohta. Saadud PSAO puhastamise suur efektiivsus loob eelduse saadud ensüümpreparaadi kasutamiseks biosensorite äratundva elemendina.

SUMMARY

The aim of the present study was to examine the possibilities of purification of amine oxidase from *Pisum sativum* (PSAO, EC 1.4.3.6) for the application of the purified enzyme in oxygen sensor based biosensor as a bioselective element for the determination of amines.

The PSAO activity was determined with oxygen sensor towards different amines. The biggest response, in terms of total change in biosensor output was to cadaverine, so the effectiveness of enzyme purification on various stages was analyzed with the help of oxygen sensor. Reactions catalyzed by PSAO were characterized with 2 parameters calculated from the sensor's steady-state output. The three-stage purification of amine oxidase from *Pisum sativum* gave the yield of PSAO 78% and specific activity of the purified PSAO was 1561.1 ncat/mg protein, which allows to apply the enzyme preparation in biosensors.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Talvik, A.-T. *Orgaaniline keemia*, OÜ Greif, 1996, 314-325.
2. Pinheiro, H. M., Touraud, E. & Thomas, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments*, 2004, **61**, 121-139.
3. Toribio, F., Galceran, M. T. & Puignou, L. Separation of heteroaromatic amines in food products. *J. Chromatogra. B: Biomed. Sci. Appl.*, 2000, **747**, 171-202.
4. Tuulmets, A. *Orgaaniline keemia, õpik gümnaasiumile*. Tallinn, Avita, 2002, 93-94.
5. Weisburger, J. H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health*1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2002, **506-507**, 9-20.
6. Directive 2002/61/EC of the European Parliament and Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (azocolourants).
7. Branchek, T. A. & Blackburn, T. P. Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact. *Current Opinion in Pharmacology*, 2003, **3**, 90-97.
8. Baker, G. B., Wong, J. T. F., Coutts, R. T. & Pasutto, F. M. Simultaneous extraction and quantitation of several bioactive amines in cheese and chocolate. *J. Chromatogra. A*, 1987, **392**, 317-331.
9. Vale, S. & Gloria, M. B. Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chemistry*, 1998, **63**, 343-348.
10. Fernandes, J. O. & Ferreira, M. A. Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *J. Chromatogra. A*, 2000, **886**, 183-195.
11. Zilmer, M., Karelson, E. & Vihalemm, T. *Meditsiiniline biokeemia II*. Tartu, 1999, 190-238.
12. Hwang, B. S., Wang, J. T. & Choong, Y. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products. *Food Chemistry*, 2003, **82**, 329-334.
13. Peter, K., Vollhardt, C. & Schore, N. E. *Organic Chemistry*. New York, W. H. Freeman and Company, 1994, 823-860.

14. Knize, M. G., Felton, J. S. & Gross, G. A. Chromatographic methods for the analysis of heterocyclic amine food mutagens/carcinogens. *J. Chromatogra. A*, 1992, **624**, 253-265.
15. *Immunoassay guidelines for planning environmental projects*. New England, 1996.
16. *Histamine in seafood: Chemical method. Sec. 35.5.31, Method 957.07*. Official Methods of Analysis of AOAC International, 1995.
17. Sacher, F., Lenz, S. & Brauch, H. J. Analysis of primary and secondary aliphatic amines in waste water and surface water by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonyl chloride. *J. Chromatogra. A*, 1997, **764**, 85-93.
18. Dalene, M., Mathiasson, L. & Jonsson, J. A. Trace analysis of free amines by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogra. A*, 1981, **207**, 37-46.
19. Schmidt, T. C., Less, M., Haas, R., von Low, E., Steinbach, K. & Stork, G. Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine: I. Derivatization. *J. Chromatogra. A*, 1998, **810**, 161-172.
20. Kataoka, H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. *J. Chromatogra. A*, 1996, **733**, 19-34.
21. Molnar-Perl, I. Quantitation of amino acids and amines in the same matrix by high-performance liquid chromatography, either simultaneously or separately. *J. Chromatogra. A*, 2003, **987**, 291-309.
22. Santagati, N. A., Bousquet, E., Spadaro, A. & Ronsisvalle, G. Analysis of aliphatic amines in air samples by HPLC with electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **29**, 1105-1111.
23. http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result_flat.php3?ecno=1.4.3.6. *Brenda*, 2004.
24. http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result_flat.php4?ecno=1.4.3.4. *Brenda*, 2004.
25. Medda, R., Padiglia, A., and Floris, G. Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*, 1995, **39**, 1-9.
26. Juda, G. A., Bollinger, J. A. & Dooley, D. M. Construction, Overexpression, and Purification of *Arthrobacter globiformis* Amine Oxidase-Strep-Tag II Fusion Protein. *Protein Expression and Purification*, 2001, **22**, 455-461.
27. Blandin, G., Llorente, B., Malpertuy, A., Wincker, P., Artiguenave, F. & Dujon, B. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 13. *Pichia angusta*. *FEBS Letters*, 2000, **487**, 76-81.

28. de Montigny, J., Straub, M. L., Potier, S., Tekaiia, F., Dujon, B., Wincker, P., Artiguenave, F. & Souciet, J. L. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 8. *Zygosaccharomyces rouxii*1. *FEBS Letters*, 2000, **487**, 52-55.
29. Schilling, B. & Lerch, K. Amine oxidases from *Aspergillus niger* : identification of a novel flavin-dependent enzyme. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects*, 1995, **1243**, 529-537.
30. Wimmerova, M. & Macholan, L. Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedlings amine oxidase: a novel approach for enzyme immobilisation. *Biosens Bioelectron.*, 1999, **14**, 695-702.
31. Dawkes, H. C. & Phillips, S. E. V. Copper amine oxidase: cunning cofactor and controversial copper. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, **11**, 666-673.
32. Delhaize, E. & Webb, J. Purification and characterization of diamine oxidase from clover leaves. *Phytochemistry*, 1987, **26**, 641-643.
33. Luhova, L., Slavik, L., Frebort, I., Halata, M., and Pec, P. Amino oxidase from *trigonella foenum-graecum* seedlings. *Phytochemistry*, 1995, **38**, 23-25.
34. Frebort, I., Skoupa, L., and Pec, P. Amine oxidase-based flow biosensor for the assessment of fish freshness. *Food Control*, 2000, **11**, 13-18.
35. Hacisalihoglu, A., Jongejan, A., Jongejan, J. A. & Duine, J. A. Enantioselective oxidation of amphetamine by copper-containing quinoprotein amine oxidases from *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, 2000, **11**, 81-88.
36. Schilling, B. and Lerch, K. Amine oxidases from *Aspergillus niger* : identification of a novel flavin-dependent enzyme. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects*, 1995, **1243**, 529-537.
37. Castillo, V., Lizcano, J. M., Visa, J. & Unzeta, M. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) from human and bovine cerebrovascular tissues: biochemical and immunohistological characterization. *Neurochem. Internat.*, 1998, **33**, 415-423.
38. Yanagisawa, H., Hirasawa, E., and Suzuki, Y. Purification and properties of diamine oxidase from pea epicotyls. *Phytochemistry*, 1981, **20**, 2105-2108.
39. Wilmot, C. M., Hajdu, J., McPherson, M. J., Knowles, P. F. & Phillips, S. E. Visualization of Dioxygen Bound to Copper During Enzyme Catalysis. *Science*, 1999, **286**, 1724-1728.
40. Padiglia, A., Medda, R., Pedersen, J. Z., Agro', A. F., Lorrain, A., Murgia, B. & Floris, G. Effect of metal substitution in copper amine oxidase from lentil seedlings. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1999, **4**, 608-613.

41. Mello, L. D. & Kubota, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 2002, **77**, 237-256.
42. Pearson, J. E., Gill, A. & Vadgama, P. Analytical aspects of biosensors. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2000, **37**, Part 2, 19-145.
43. Mondovi, B., Rotilio, G., Agro, A. F., Vallogini, M. P., Malmstrom, B. G. & Antonini, E. Copper reduction by substrate in diamine oxidase. *FEBS Letters*, 1969, **2**, 182-184.
44. Draisci, R., Volpe, G., Lucentini, L., Cecilia, A., Federico, R. & Palleschi, G. Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. *Food Chemistry*, 1998, **62**, 225-232.
45. Pandey, P. C., Upadhyay, S. & Upadhyay, B. Peroxide Biosensors and Mediated Electrochemical Regeneration of Redox Enzymes. *Anal. Biochem.*, 1997, **252**, 136-142
46. Alam, M. K., Sasaki, M., Watanabe, T. & Maeyama, K. Simultaneous Determinations of Histamine and N[tau]-Methylhistamine by High-Performance Liquid Chromatography-Chemiluminescence Coupled with Immobilized Diamine Oxidase. *Anal. Biochem.*, 1995, **229**, 26-34.
47. Budantsev, A. Y. Biosensor for catecholamines with immobilized monoamine oxidase in tissue sections. *Anal. Chim. Acta*, 1991, 249, 71-76.
48. <http://www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/>. University of Tromsø, 2004.
49. Sebel, M., Luhova, L., Frebort, I., Hirota, S., Faulhammer, H. G., Stůžka, V. & Pec, P. Confirmation of the presence of a Cu(II)topa quinone active site in the amine oxidase from frenugreek seedlings. *J. Exp. Bot.*, 1997, **48**, 1897-1907.
50. Vianello, F., Malek-Mirzayans, A., Di Paolo, M. L., Stevanato, R. & Rigo, A. Purification and Characterization of Amine Oxidase from Pea Seedlings*1. *Protein Expression and Purification*, 1999, **15**, 196-201.
51. Bouvrette, P., Male, K. B., Luong, J. H. T. & Gibbs, B. F. Amperometric biosensor for diamine using diamine oxidase purified from porcine kidney. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, **20**, 32-38.
52. Torop, K. *Hapnikuanduri anoodi polariseevuse uurimine*. Diplomitöö, Tartu Tartu Ülikool, 1987.
53. Hartree, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 1972, **48**, 422-427.
54. Rincken, T. *The modelling of amperometric biosensors based on oxidoreductases*. D.Sc.thesis, Tartu, Tartu Ülikool, 2000.