

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia instituut

Gunnar Printsman

**BENSÜÜLPENITSILLIINI MÕJU UURIMINE
β-GALAKTOSIDAASI AKTIIVSUSELE**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: Toonika Rinken, PhD

Tartu 2015

SISUKORD

SISSEJUHATUS	3
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1. β -galaktosidaasi iseloomustamine	5
1.2. Meetodid β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks	8
1.3. β -laktaam antibiootikumid	13
1.3.1. Struktuur, liigid ja kasutamine	13
1.3.2. Penitsilliinid	15
1.3.3. Toimemehhanism ja resistentsus	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	19
2.1. Kasutatud reaktiivid	19
2.2. Kasutatud aparatuur	19
2.3. Lahuste valmistamine	20
2.4. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramine hapnikuanduriga	20
2.5. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramine spektrofotomeetriliselt	21
2.6. Bensüülpenitsilliini mõju mõõtmine β -galaktosidaasi aktiivsusele	21
3. TULEMUSED JA ARUTELU	22
3.1. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks kasutatud meetodite võrdlus	22
3.2. Lahustunud β -galaktosidaasi stabiilsus	28
3.3. Bensüülpenitsilliini mõju β -galaktosidaasi aktiivsusele	30
KOKKUVÕTE	33
KASUTATUD KIRJANDUS	34
Summary	38

SISSEJUHATUS

Käesolev töö on üks osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on välja töötada biosensorivi veterinaarias enamkasutatavate antibiootikumijääkide kiireks määramiseks toorpiimas. Tarbides piima, mis sisaldab antibiootikumide jääke, võib see organismis tekitada allergilisi reaktsioone ja nõrgendada immuunsüsteemi. Samuti on oht, et meie soolestikus leiduvad bakterid võivad muutuda antud antibiootikumide vastu resistentseks. Antibiootikumide jääke sisaldavast piimast ei ole võimalik valmistada juustu jt fermenteeritud piimatooteid, sest sellised jäägid mõjutavad negatiivselt ka kääritamisprotsessides osalevaid bakterkultuure.

Kõige enam kasutatavad antibiootikumide klassid lehmade ravis on β -laktaamid ja tetratsükliinid. Praegusel ajal määratakse nende antibiootikumide jääke piimas kvantitatiivselt ainult kromatograafiliste meetoditega, mis on aga kulukad ja aeganõudvad. Kehtestatud norme ületavate antibiootikumide kontsentratsioonide määramiseks kasutatakse ka mitmeid spetsiaalseid teste, kuid nendega saab korraga määrata vaid ühte klassi kuuluvate antibiootikumide jääke ning need ei võimalda läbi viia toorpiima *on-line* analüüse. Üheks võimaluseks kiirete kohapealsete analüüside tegemiseks ja saastunud piima operatiivseks eraldamiseks on kasutada biosensoritel põhinevat tehnoloogiat.

Tartu Ülikoolis on välja töötatud biosensorivi, milles olevate sensorite bioselektiivseks elemendiks on ensüümid glükoosi oksüdaas ja galaktosidaasi oksüdaas [1]. Need ensüümid katalüüsivad piimasuhkru ehk laktoosi hüdrolyüsiproductide glükoosi ja galaktoosi oksüdeerumist. Kuna glükoosi ja galaktoosi kontsentratsioon toorpiimas (0,1 mM) on võrreldes laktoosiga (140 mM) väga väike, siis nende suhkrute kontsentratsioon sõltub suuresti laktoosi hüdrolyüsist, mida katalüüsib ensüüm β -galaktosidaas. Glükoosi ja galaktoosi sisaldust mõõtvast biosensorivi abil penitsilliinijääkide määramisel piimaproovides leiti, et galaktoosi kontsentratsioon suureneb seismisel kiiremini puhtas piimas kui piimas, millele oli lisatud

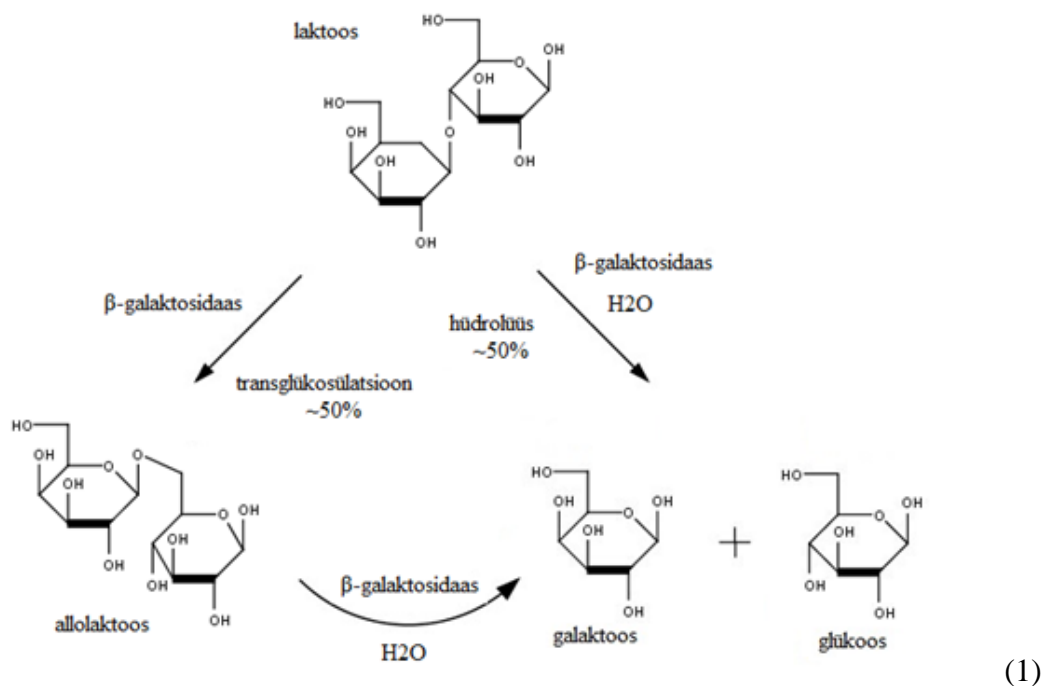
bensüülpenitsilliini; samas sellist galaktoosi kontsentratsiooni muutumist ei täheldatud penitsilliiniga ravitavatelt lehadelt kogutud piimaproovide korral.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli võrrelda erinevaid meetodikaid β -galaktosidaasi aktiivsuse mõõtmiseks ning uurida β -laktaamide hulka kuuluva bensüülpenitsilliini mõju β -galaktosidaasi aktiivsusele, mis mõjutab oksüdaasidel põhinevate biosensorite signaali piimas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. β -galaktosidaasi iseloomustamine

β -galaktosidaas (EC 3.2.1.23) on hüdrolaaside klassi kuuluv ensüüm, mis katalüüsib glükosiidsideme hüdrolüütilist lagunemisreaktsiooni. β -galaktosidaasi üheks olulisemaks substraadiks on glükoproteiinide kõrval ka laktoos ehk piimasuhkur. Laktoosi hüdrolüüsil tekivad glükoos ja galaktoos. Reaktsioon võib toimuda ka üle transglükosülatsiooni, kus esmaseks produktiks on allolaktoos. Transglükosülatsiooni käigus β -1-4 glükosiidside lõhustatakse ning glükoosi kuuenda süsiniku hüdroksüülrühm reageerib galaktoosi esimese süsinikuga, moodustades allolaktoosi, milles monosahhariide ühendab β -1-6 glükosiidside. Edasise reaktsiooni käigus toimub allolaktoosi lõhustumine glükoosiks ja galaktoosiks. Transglükosülatsioon ja hüdrolüüs võivad toimuda võrdse tõenäosusega (võrrand 1). [2]

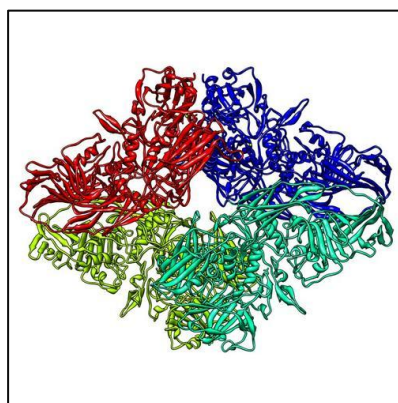


β -galaktosidaasi leidub mitmetes bioloogilistes süsteemides, näiteks mikroorganismides ning taimsetes ja loomsetes kudedes. β -galaktosidaasi esineb näiteks soolekepikestes (*Escherichia coli*), laktobatsillides (*Lactobacillus*) ja kerahallikutes

(*Aspergillus*). Elusorganismides on β -galaktosidaasil kaks peamist funktsiooni. Lisaks laktoosi lõhustamise katalüüsimisele glükoosiks ja galaktoosiks, tekitab β -galaktosidaas ka positiivse tagasisideahela ensüümi enda tootmiseks rakus [3]. β -galaktosidaas on rakusisene valk, mille tootmist kontrollib struktuurgeen *lacZ*, mis paikneb bakteri DNA-s. Ensüümi tootmine toimub ainult siis, kui rakukeskkonda satub laktoosimolekul, mis eemaldab *lacZ* geeniekspressiooni takistava repressormolekuli. [2]

Mitmeid β -galaktosidaasi sisaldavaid baktereid leidub toorpiimas. Sellisteks mikroorganismideks on mitmed laktobatsillid (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei*), streptokokid (*Streptococcus sP.*, *Streptococcus thermophilus*) ja soolekepikesed. [4] Mikrofloora mitmekesisus ja hulk toorpiimas sõltub looma genoomist, elukeskkonnast, aastaajast ja paljudest muudest faktoritest. [5]

β -galaktosidaas on neljast identsest polüpeptiidahelast koosnev tetrameer, kus iga polüpeptiidahel on moodustatud 1023-st aminohappest. Iga polüpeptiidahela monomeer koosneb viiest domeenist, kus Domeen 3 moodustab enamuse aktiivtsentrist (aminohapped 327-645). [6] Üks β -galaktosidaasi tetrameerne molekul katalüüsib optimaalsetes tingimustes 38500 ± 900 glükosiidsideme hüdrolüüsi minutis [1].



Joonis 1. β -galaktosidaas koosneb neljast identsest monomeerist [2].

Ensüümi selektiivsus erinevate substraatide suhtes, molekulmass, aktiivsustsentrini paiknemiskoht, pH- ja temperatuuri stabiilsus sõltuvad sellest, millisest allikast ensüüm on eraldatud. *Aspergillus oryzae*-st eraldatud β -galaktosidaasi aktiivsus on suurim pH vahemikus 3,0-6,5. pH väärtustel alla 3 kaotab ensüüm oma maksimaalsest aktiivsusest ligi 40% ning pH väärtusel üle 6 kuni 45% [7]; optimaalseks temperatuuriks on 37 °C [8]. Kõrgematel temperatuuridel ensüümi tertsiaarne struktuur laguneb, mis toob kaasa ensüümimolekuli denaturatsiooni ja katalüütilise aktiivsuse languse. β -galaktosidaasi molekulmass varieerub vahemikus 190 kuni 7500 kDA [5]. *Escherichia coli*-st eraldatud β -galaktosidaasi katalüütilisi omadusi iseloomustavad konstandid erinevate substraatide suhtes on toodud tabelis 1. Ensüümi katalüütilist efektiivsust iseloomustab spetsiifilisuse konstant k_{cat}/K_m . Ensüüm on seda selektiivsem substraadi suhtes, mida suurem on spetsiifilisuse konstant.

Tabel 1. *Escherichia coli*-st eraldatud β -galaktosidaasi katalüütilisi omadusi iseloomustavate konstandide väärtused erinevate substraatide korral.

Substraat	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	Selektiivsus (k_{cat}/K_m)	Viide
Laktoos	2,7	315	116	[9]
orto-nitrofenüül- β -galaktosiid (ONPG)	0,16	285	1781	[10]
2-nitrofenüül- β -galaktopüranosiid	0,122	180	664	[11]

β -galaktosidaasi aktiivust mõjutavad ka mitmesugused inhibiitorid. Enamasti on nendeks metalliioonid, näiteks Ag^+ , Cu^{2+} ja Hg^{2+} . Samuti inhibeerivad β -galaktosidaasi $CaCl_2$ ning karbamiid. Viimase puhul kaotab ensüüm kahe tunni jooksul peaaegu kogu oma aktiivsuse. [8] Ca^{2+} on kontsentratsioonide vahemikus $1,25 \cdot 10^{-3}$ - $2,5 \cdot 10^{-3}$ M ensüümi aktivaatoriks, kontsentratsioonil üle $5 \cdot 10^{-3}$ M aga domineerivad inhibeerivad omadused. Mitmete metalliioonide (Na^+ , Mg^{2+} , K^+) olemasolu on vajalik β -galaktosidaasi täieliku katalüütilise efektiivsuse saavutamiseks. [12] Ensüümi aktiveerivaks ühendiks on veel 2-merkaptotetanool, ditiotreitool ja etüleendiamiintetraäädikhape (EDTA) [13]. Mitmed soolad, näiteks magneesiumkloriid

ja naatriumkloriid, muudavad lahuste viskoossust, mis omakorda võib tingida ensüüm-substraat reaktsiooni kiiruskonstantide vähenemise [14].

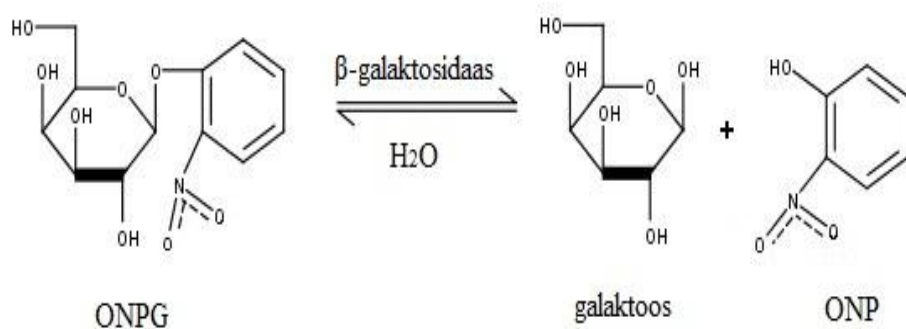
β -galaktosidaasi kasutatakse laialdaselt piimatööstuses piimas leiduva laktoosi hüdrolyüsiks ja laktoosivabade piimatoodete valmistamiseks. Laktoosi hüdrolyüsi produktid galaktoos ja glükoos on ligi 50% magusamad kui laktoos ise ning tänu sellele ei pea lisama täiendavaid magusaineid jogurtitele ja kohupiimadele. [3]

Analüütilistel eesmärkidel kasutatakse β -galaktosidaasi laktoosi kaskaadses biosensorsüsteemis, mis põhineb kahel üksteisele järgneval ensüümkatalüütilisel reaktsioonil. Esmalt toimub laktoosi hüdrolyüs β -galaktosidaasi toimele, kus ekvimolaarses koguses tekivad galaktoos ja glükoos; seejärel määratakse tekkinud glükoosi või galaktoosi kontsentratsioon, kasutades vastavalt kas glükoosi oksüdaasi (GOD, EC 1.1.3.4) või galaktoosi oksüdaasi (GOA, EC 1.1.3.9) poolt katalüüsitavaid oksüdeerimisreaktsiooni. Selle reaktsiooni jälgimiseks kasutatakse hapnikuandurit, kuna hapniku sisaldus lahuses sõltub tekkinud glükoosi või galaktoosi kontsentratsioonist, mis omakorda on otseselt seotud laktoosi kontsentratsiooniga. [15]

1.2. Meetodid β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks

Kõige levinum meetod β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks on spektrofotomeetiline. Kasutatakse laktoosi imiteerivaid spetsiifilisi substraate, mille glükosiidsideme hüdrolyüsil tekib spektrofotomeetriselt detekteeritav produkt. Selliseid substraate on mitmeid:

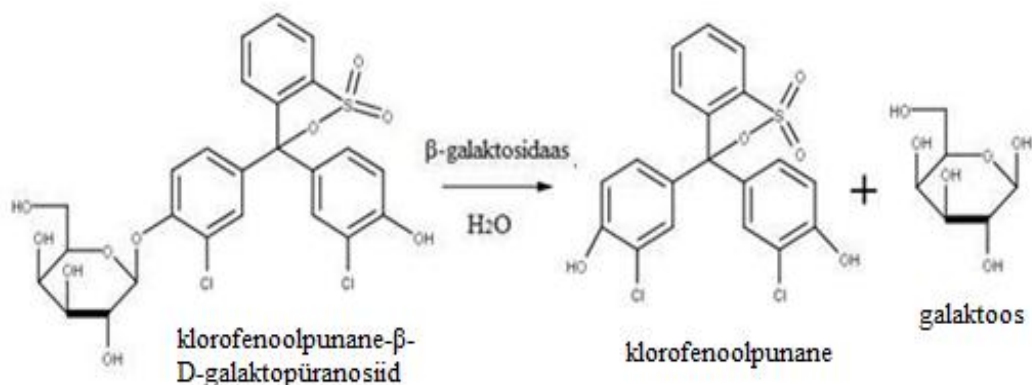
1) Orto-nitrofenüül- β -galaktosiid (ONPG) on laktoosi analoog, mis on spetsiaalselt β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks sünteesitud ühend. ONPG lahus on värvitu, β -galaktosidaasi poolt katalüüsitava hüdrolyüsi tulemusena tekib orto-nitrofenool ehk ONP, mis on värvuselt kollane (võrrand 2).



(2)

β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks inkubeeritakse ensüümi ja substraadi segu kindla ajaperioodi jooksul ning seejärel peatatakse reaktsioon stopp-lahuse abil. Stopp-lahus peab muutma keskkonna piisavalt aluseliseks, et ensüüm denatureeruks. Sellisteks lahusteks on näiteks 1 M Na_2CO_3 ja 1 M NaOH . ONP teket mõõdetakse lahuse neelduvuse alusel lainepikkusel 420 nm. Ensüümi avastamiskiir sõltub β -galaktosidaasi ja ONPG vahelise reaktsiooni kestvusest, näiteks 2 tunni inkubeerimise korral on ensüümi avastamiskiiriks 0,0001 IU/ml. [16]

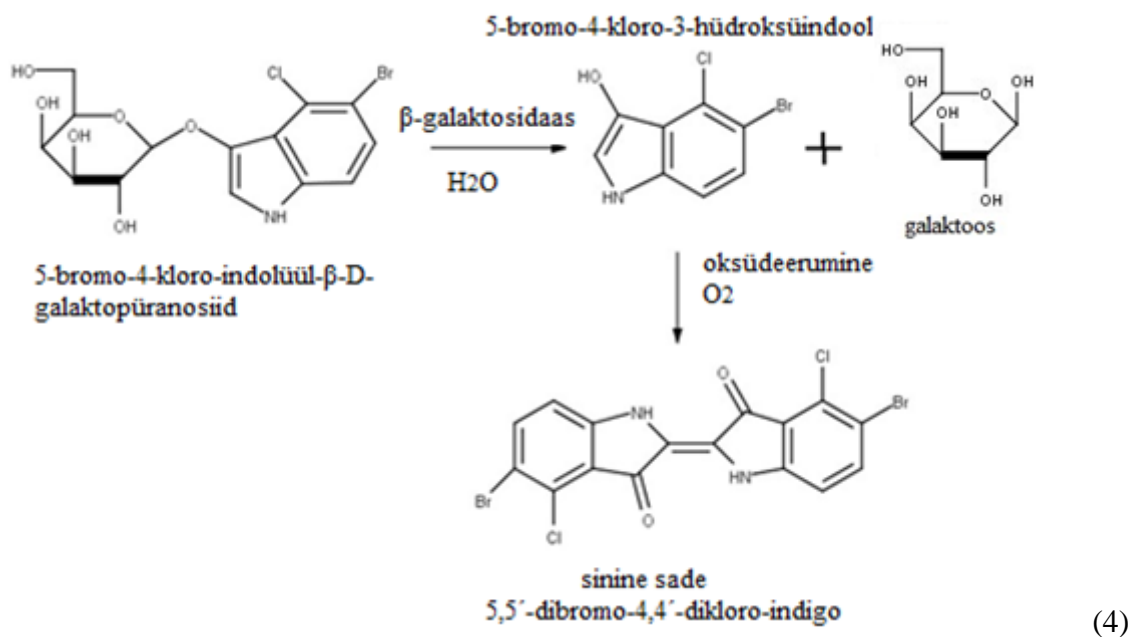
2) Klorofenoolpunane- β -D-galaktopüranosiid (CPRG). Tegemist on laktoosi analoogiga, mis β -galaktosidaasi toimel hüdrolyüsub ja annab produktiks tumepunase-lillaka klorofenoolpunase lahuse (võrrand 3). [17]



(3)

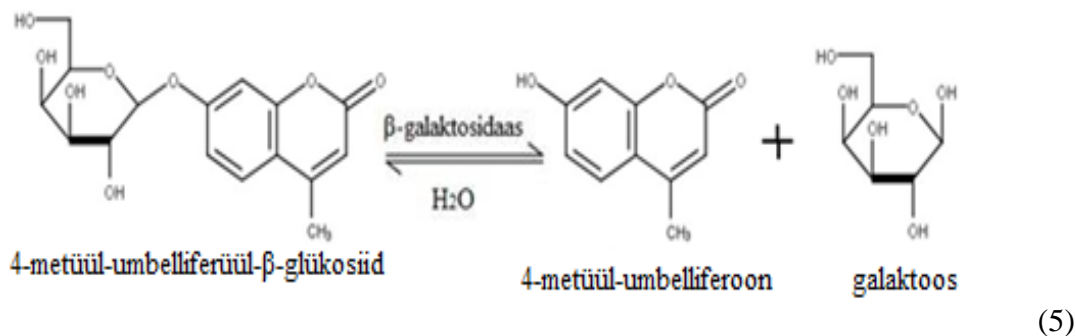
Kasutades substraadina CPRG-i, on ensüümi avastamiskiir ligikaudu 10 korda madalam kui ONPG-i kasutamisel [18]. Analoogselt ONPG meetodile inkubeeritakse substraati koos ensüümiga kindla ajaperioodi vältel ning seejärel peatatakse reaktsioon stopplahuse abil. CPRG-i kasutamise korral mõõdetakse neeldumist lainepikkusel 570-595 nm.

3) 5-bromo-4-kloro-3-indolüül- β -D-galaktopüranosiid (X-gal) on laktoosi analoog, mida kasutatakse β -galaktosidaasi kvalitatiivseks analüüsiks. β -galaktosidaas katalüüsib X-gal-i hüdrolüüsi, mille produktiks on galaktoos ja 5-bromo-4-kloro-3-hüdroksüindool. Viimane dimeriseerub ja oksüdeerub õhuhapniku käes 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigoks, lahustumatuks siniseks produktiks (võrrand 4). [19] Selle reaktsiooni tulemusena saab kvalitatiivselt hinnata, kas lahus sisaldas endas β -galaktosidaasi [20].



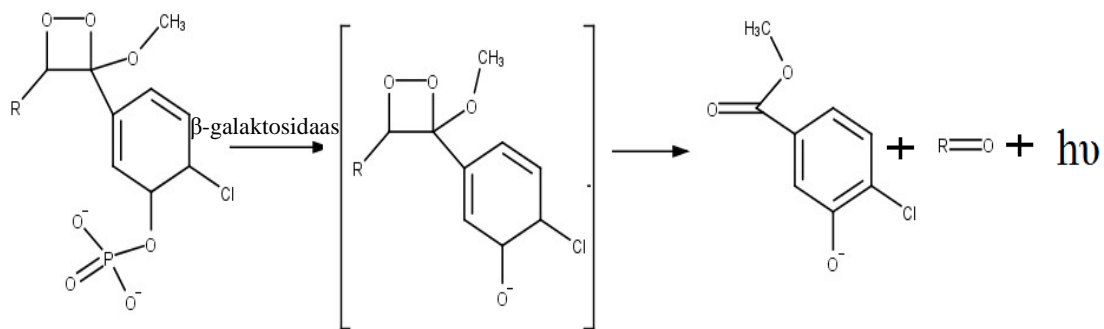
Spektrofotomeetriliste meetodite puhul sõltub mõõdetav lahuse neelduvus β -galaktosidaasi aktiivsusest lineaarselt. Spektrofotomeetiline meetod on madala määramispiiriga ja täpne meetod, mille läbiviimine on tehniliselt suhteliselt lihtne. Miinuseks on meetodi kasutuskõlbmatus sogaste ja suure tihedusega lahuste korral. [17]

β -galaktosidaasi aktiivsust saab määrata ka spektrofluoromeetriselt. Selleks kasutatakse fluoromeetrisel substraati, näiteks 4-metüül-umbelliferüül- β -glükosiidi (MUG). β -galaktosidaasi toimel tekib 4-metüül-umbelliferoon, mille hulka on võrdeline lahuses oleva ensüümi aktiivsusega (võrrand 5). [21]



Reaktsioon peatamiseks kuumutatakse lahust 75 °C-ni, mille tulemusena ensüüm denatureerub ja kaotab oma aktiivsuse [22]. Ergastades 4-metüül-umbelliferooni 365 nm juures ja registreerides emissiooni lainepikkusel 465 nm, on võimalik määrata eraldunud umbelliferooni hulka [21]. Lisaks MUG-le kasutatakse fluoromeetrisel β -galaktosidaasi aktiivsuse määramisel substraadina 1,3-dikloro-9,9-dimetüülakridiin-2-oon- β -D-galaktopüranosiidi (DDAOG), mis ensüümi toimel hüdrolyüsatakse 7-hüdrosü-1,3-dikloro-9,9-dimetüülakridiin-2-oon-iks (DDAO). DDAO-i ergastuse lainepikkuseks on 646 nm ja emissiooni maksimum on lainepikkusel 659 nm [23]. Spektrofluoromeetrisel meetodi miinuseks on vajadus lahuse aluseliseks muutmiseks, et maksimiseerida lõpp-produkti fluorestsentssignaali. Meetodi plussiks on väga madal määramispiir ning lõpp-produkti püsivus ajas (kuni 18h). [24]

Kemoluminesentsil põhinev β -galaktosidaasi aktiivsuse määramise meetodit kasutatakse laialdaselt biomeditsiinis. Selle meetodi korral on β -galaktosidaasi substraadiks enamasti 1,2-dioksetaan. β -galaktosidaasi toimel tekib ergastatud olekus ebastabiilne anioon vaheühend, mis seejärel fragmenteerub, eraldades valguskvandi lainepikkusel 475 nm (võrrand 6). [25]



Mitmesuguste polümeersete ainetega on võimalik luminesentskiirgust 100-1000 korda võimendada. Põhilisteks polümeerseteks võimendajateks on Sapphire-II™ (polü(bensüültributüül)ammooniumkloriid) ja Emerald-II™ (polü(bensüüldimetüülvinüülbensüül)ammooniumkloriid). Tänu sellisele võimendusele on võimalik detekteerida väga väikeseid ensüümi koguseid (alates 16 femtogrammi 1 ml-s lahuses). Meetodi miinuseks on valgussignaali intensiivsuse kiire langus (poolestusaeg 10 minutit). [25]

β -galaktosidaasi aktiivsuse määramise põhimõtted hüdrolüüsiproduktide oksüdeerimisreaktsiooni hapnikutarbe alusel on samad mis laktoosi kaskaadsel biosensoril, mida on seletatud eespool (lehekülj 8).

Kokkuvõtte eespoolkirjeldatud β -galaktosidaasi aktiivsuse määramis meetoditest on toodud tabelis 2.

Tabel 2. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramise meetodid.

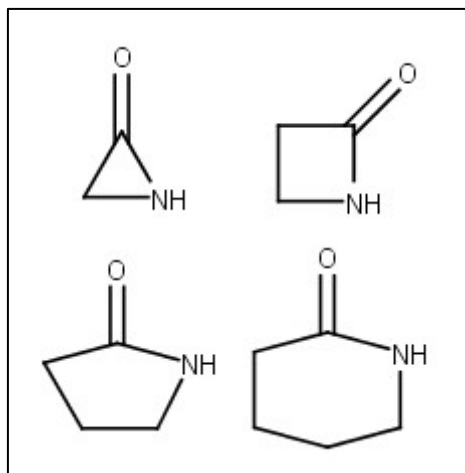
	Substraat	β -galaktosidaasi aktiivsuse määramispiir	Detekteerimise meetod	Mõõtmise lainepikkus (nm)	Viide
1.	ONPG	Sõltub inkubeerimise kestvusest; 2 h inkubeerimise korral $1 \cdot 10^{-4}$ IU/ml	Spektrofotomeetiline	420	[10]
2.	CPRG	Sõltub inkubeerimise	Spektrofotomeetiline	570-595	[12]

		kestvusest; 2 h inkubeerimise korral $1 \cdot 10^{-5}$ IU/ml			
3.	X-gal	Võimalik ainult kvalitatiivne analüüs	Visuaalne sinise värvi intentsiivsuse hindamine	-	[19]
4.	MUG	Sõltub inkubeerimise kestvusest; 2 h inkubeerimise korral $9,78 \cdot 10^{-6}$ IU/ml	Spektrofluorimeetiline	Ergastamine 365 nm; emissiooni mõõtmine 465 nm	[15,21]
5.	1,2-dioksetaan	$\sim 4 \cdot 10^{-8}$ IU/ml	Kemoluminestsents	475	[16]
6.	O ₂	$\sim 9,4 \cdot 10^{-5}$ IU/ml	Kaskaadne reaktsioon, mõõdetakse hüdrolüüsiproduktide oksüdeerumisreaktsioonil lahustunud hapniku kontsentratsiooni vähenemist	-	[26]

1.3. β -laktaam antibiootikumid

1.3.1. Struktuur, liigid ja kasutamine

Laktaamid on tsüklilised amiidid, mis jaotatakse alarühmadesse olenevalt süsinike arvust tsükliks: kahe süsinikuga α -laktaamid, kolme süsinikuga β -laktaamid ja nii edasi. Seega β -laktaami tsükel koosneb neljast aatomist – kolm süsiniku aatomit ja üks lämmastiku aatom. [27,28]

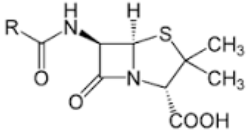
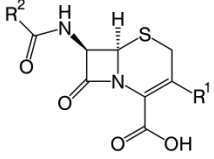
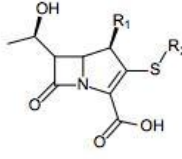
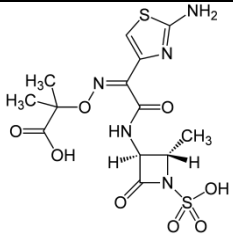


Joonis 2. Tsüklilised amiidid. Üleval vasakul α -laktaam; üleval paremal β -laktaam; all vasakul γ -laktaam ja all paremal δ -laktaam.

Tänu tsüklis olevate aatomitevaheliste sidemete suurtele steerilistele pingetele hüdrolüüsuvad β -laktaamid võrreldes lineaarsete amiidide või suurtemate laktaamidega kergemini [29].

β -laktaami tsükel kuulub paljude antibiootikumide põhistruktuuri. Kõik β -laktaamsed antibiootikumid on bakteritsiidsed ning pärsivad paljunevates rakkudes peptidoglükaanide sünteesi. Levinumad β -laktaamide perekonda kuuluvad antibiootikumid on penitsilliinid, tsefalosporiinid, karbapeneemid ja monobaktaamid ning neid kasutatakse laialdaselt nii meditsiinis kui veterinaarias. [30] Seetõttu on kehtestatud piirnormid nende jääkidele toiduks kasutatavates põllumajandussaadustes (tabel 3) [25].

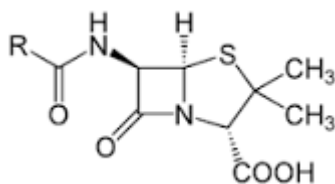
Tabel 3. β -laktaam antibiootikumide struktuurid, kasutamine ja lubatud piirmäär piimas.

	β -laktaam	Struktuur	Kasutamine veterinaarias	Lubatud sisaldus piimas [31]
1.	Penitsilliinid		Piimalehmade udarapõletiku ja hingamisteede ravi	4 $\mu\text{g/kg}$ (bensüülpenitsilliin, amoksisilliin, ampitsilliin) 30 $\mu\text{g/kg}$ (oksatsilliin, kloksatsilliin)
2.	Tsefalosporiinid		Piimalehmade udarapõletiku ja hingamisteede ravi	125 $\mu\text{g/kg}$ (tsefatsetriil) 100 $\mu\text{g/kg}$ (tseftiofur, tsefaleksiin) 60 $\mu\text{g/kg}$ (tsefapiiriin) 200 $\mu\text{g/kg}$ (tsefkvinoom)
3.	Karbapeneemid		Keelatud kasutada veterinaarias	Puudub
4.	Monobaktaamid		Keelatud kasutada veterinaarias	Puudub

1.3.2. Penitsilliinid

Penitsilliinid on antibiootikumide klass, mis avastati 1929. aastal Alexander Flemingu poolt ja mida saadakse *Penicillium* seentest. Penitsilliini avastamist loetakse

modernse antibiootikumiravi algusajaks. [32] Lisaks amiidi tsüklile, sisaldavad penitsilliinid veel viie aatomilist väävlit sisaldavat heterotsükliit. Penitsilliinide üldstruktuur on järgmine:



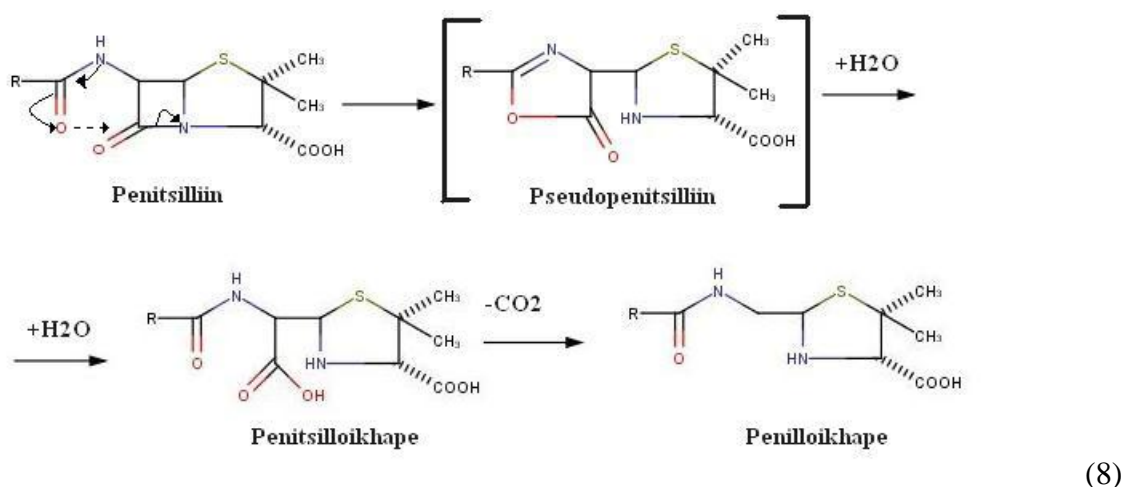
(7)

Penitsilliinid on antibiootikumid, mida iseloomustab kõrge polaarsus ja madal lenduvus. [33] Sõltuvalt R asendusrühmast, liigitatakse penitsilliinid kahte peamisse alarühma:

1) Kui R asendusrühmaks on bensüülrühm, siis on tegemist penitsilliin G ehk bensüülpenitsilliiniga. See oli esimene β -laktaam, mis võeti kasutusele mitmesuguste bakteriaalsete infektsioonide raviks ja ennetamiseks (meningiit, süüfilis, gangreen). [34] Penitsilliin G on amorfne valge pulber, mis toimib grampositiivsetele bakteritele. Manustamine vereringesse käib süstimise teel, sest penitsilliin on ebastabiilne happelises keskkonnas ning seega laguneks maos. Penitsilliin G on maailmas üks enim kasutatavamaid antibiootikume, millega ravitakse nii loomi kui ka inimesi. Üheks levinumaks valdkonnaks on piimalehmade udarapõletiku ja hingamisteede ravi. Bensüülpenitsilliin väljutatakse organismist suhteliselt kiiresti – selle kontsentratsioon langeb organismis 30-60 minutiga 50% võrra. Peale viit poolväärtusaega, st 3-5 tunni pärast on ~95% penitsilliinist neerude kaudu organismist väljutatud. Seetõttu on vajalik ravimi korduv manustamine, et penitsilliini kontsentratsioon infektsioonipiirkonnas oleks kõrgem minimaalsest inhibeerimise kontsentratsioonist bakteritele. [29]

2) Penitsilliin G asendusrühma atsüleerimisel saadakse fenoksümetüülpenitsilliin ehk penitsilliin V. Penitsilliin V on happelises keskkonnas stabiilne ja seega on võimalik selle suukaudne manustamine. [35]

Nagu juba eespool öeldud, sisaldavad penitsilliinid ebastabiilset, äärmiselt pinges ja reaktiivset β -laktaamset amiidsidet. See laguneb kergesti ensüüm β -laktamaasi juuresolekul, nõrga nukleofiili (vesi, metalliioonid) olemasolul ja happelistes ning aluselistes keskkondades. Amiidsideme lagunemine β -laktaam tsükli viib tsükli avanemisele (tekib penitsilliinhappe derivaat) ning see põhjustab penitsilliinide aktiivsuse täieliku kadumise. Penitsilliini ebastabiilsust ja tsükli avanemist põhjustavad ka selle enda karboksüülrühm ja atsüülkõrvalahel (võrrand 8). Siit järeldub, et penitsilliinil on sisseehitatud enesehävituslik mehhanism. [36]



Penitsilliinid on kõige enimkasutatavad antibiootikumid veterinaarias põllumajandusloomade (veised, sead, kodulinnud, lambad, kitsed) ravis. 2012. aastal müüdi Eestis sellel eesmärgil 4,67 tonni erinevaid penitsilliine, mis moodustas 64% kõikide müüdüd antibiootikumide koguhulgast. [37]

1.3.3. Toimemehhanism ja resistentsus

Mõiste antibiootikum viitab ainele, mis takistab või inhibeerib mikroorganismide kasvu, samas aga ei kahjusta makroorganismi. Penitsilliine kasutatakse põhiliselt grampositiivsete bakteri poolt põhjustatud infektsioonide raviks. Grampositiivsete bakterite rakuseina moodustab polümeerne peptiidoglükaani kiht, mis koosneb N-atsetüülglükoosamiini (NAG) ja N-atsüülmuraamhappe (NAM) molekulidest, mis on omavahel ristseotud peptiidi kõrvalahelate abil. [38] Ristsidemete teket katalüüsib

ensüüm PBP (*penicillin-binding protein*), mis paikneb bakteri tsütoplasma membraanil. Peaaegu kõik β -laktaamsed antibiootikumid inhibeerivad bakteri rakuseina biosünteesi, seondudes PBP ensüümi külge ja takistades sellega ristsidemete sünteesi. Ristsidemete vähene hulk tingib nõrga rakumembraaniga bakteri tekke ja viib viimase purunemiseni. [39]

Penitsilliin enamasti ei mõju gramnegatiivsetele bakteritele, sest neil bakteritel on lisaks veel lipopolüsahhariididest koosnev väline membraan, mida penitsilliin läbida ei suuda ja seega PBP inhibeerimine ei saa toimuda.

Mitmed bakterid on suutelised tootma ensüümi β -laktamaas, mis katalüüsib β -laktaamsete antibiootikumide tsükli avanemist ning inaktiivse penitsilliinhappe derivaadi moodustumust. Sellise ensüümi olemasolu mikroorganismis tingib resistentsuse β -laktaamsete antibiootikumide vastu. [29]

Resistentsus β -laktaamsete antibiootikumide vastu võib tekkida ka PBP ensüümi struktuurse modifitseerumise tagajärjel. Näiteks *Staphylococci* bakterites ei ole PBP ensüümi, vaid on PBP2a ensüüm. β -laktaamse antibiootikumi sidumisafiinsus PBP2a ensüümiga on palju halvem kui PBP-ga ning seetõttu ei inhibeeri β -laktaamsed antibiootikumid baktereid, mis sisaldavad endas modifitseeritud PBP ensüüme. [40]

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Kasutatud reaktiivid

- 1) Kaaliumdivesinikfosfaat (KH_2PO_4), AppliChem, Saksamaa, $\geq 99,5\%$
- 2) Kaaliumhüdrosiid (KOH), AppliChem, Saksamaa, $\geq 85\%$
- 3) Laktoosmonohüdraat ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$), AppliChem, Saksamaa, $\geq 99,9\%$
- 4) β -galaktosidaas, eraldatud *Aspergillus oryzae* seenest, 8,4 U/mg, Lot No 058K1284, Sigma-Aldrich, Jaapan
- 5) Glükoosi oksüdaas, eraldatud *Aspergillus niger* seenest, 17300 U/mg, Lot No 079K7450V, Sigma-Aldrich, Ameerika Ühendriigid
- 6) Orto-nitrofenüül- β -galaktosiid ($\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_2$), AppliChem, Saksamaa, $\geq 99\%$
- 7) Penitsilliin G ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{KN}_2\text{O}_4\text{S}$), AppliChem, Saksamaa, $\geq 98\%$

2.2. Kasutatud aparatuur

- 1) pH-meeter SevenEasy (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,02$ pH ühikut
- 2) Magnetsegaja MS 3000 (Biosan)
- 3) Amperomeetiline Clark-tüüpi hapnikuandur Helox 10, membraani paksus 15 μm , katodi pindala 6,08 cm^2 (Elke Sensor, Tallinn)
- 4) Optiline hapnikuandur kvartskiud, Pd-tetrafenüülporpüriin molekulid kapseldatud polümetüül-metakrülaad (PMMA) kilele; silindrikujulist andurit katab 30 mm pikk optiline kiud diameetriga 1 mm, valmistatud TÜ Füüsika instituudis
- 5) Spektrofotomeeter UV-1800 (Shimadzu)
- 6) Termovann Sky Line TW2.03 (Elmi)
- 7) Analüütiline kaal PB 602-S/FACT (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,01$ mg
- 8) Analüütiline kaal XS105 Dualrange (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,01$ g

2.3. Lahuste valmistamine

Kõik lahused valmistati Milli-Q vett kasutades (25 °C juures eritakistus 18,2 MΩ·cm), kineetiliste mõõtmiste läbiviimiseks kasutati 0,1 M fosfaatpuhverlahust (pH=6,50). Kõik töölahused valmistati eelnimetatud puhverlahusesse.

2.4. β-galaktosidaasi aktiivsuse määramine hapnikuanduriga

β-galaktosidaasi sisaldav lahus lisati laktoosilahusele (0,1 M fosfaatpuhveris, pH=6,50) nii, et laktoosi lõppkontsentratsiooniks jääks 0,14 M (koguruumala 35 ml). Algas laktoosi hüdrolyüs, mille kiirus sõltus β-galaktosidaasi aktiivsusest. Hüdrolyüsi kestvuse optimaalseks ajaks leiti 8 minutit ehk 480 sekundit (ptk 3.1) ja selle ajal toimus mõõterakus konstantse kiirusega segamine. Kõik mõõtelahused küllastati eelnevalt suruõhku kasutades 37 °C juures õhuhapnikuga 50 minuti jooksul.

Inkubeerimise ajaks asetati mõõterakku hapnikuandur (Clarki-tüüpi või optiline hapnikuandur), mille väljundvoolul lasti reaktsioonikeskkonnas stabiliseeruda. 480 sekundi möödudes süstiti mõõterakku glükoosi oksüdaasi (lõppkontsentratsiooniga 1 IU/ml), mis katalüüsis hüdrolyüsil tekkinud glükoosi oksüdeerumist lahustunud hapniku toimet. Glükoosi oksüdaasi süstimise hetkel alustati hapnikuanduri väljundvoolu registreerimist. Väljundvoolu digitaliseerimiseks kasutati A/D signaali muundurit (USB-1608, Measurement Computing) ja andmed registreeriti arvuti abil. Väljundvoolu muutust detekteeriti maksimaalselt 1200 sekundi jooksul pärast glükoosi oksüdaasi süstimist intervalliga 0,5 sekundit.

Iga eksperimentaalne kõver koosnes vähemalt 1500-2400 punktist. Andmete normaliseerimiseks jagati väljundvoolu signaal I_t ajahetkel t väljundvooluga I_0 ajahetkel $t=0$. Saadud normaliseeritud väljundvoolu I_t/I_0 abil arvutati signaali normaliseeritud muutus kui $1-I_t/I_0$.

Reaktsiooni iseloomustavate parameetrite arvutamiseks kasutati programme SigmaPlot[®] 13.0 (SPSS Software, USA), Graphpad Prism[®] 6.0 (Graphpad Software,

San Diego, CA, USA) ja Microsoft Excel[®] 15.0 (Microsoft Corporation, Washington, USA).

2.5. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramine spektrofotomeetriliselt

β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks lisati lahusele ONPG-i (lõppkontsentratsioon $2,65 \cdot 10^{-4}$ M). Reaktsioonisegu inkubeeriti 480 sekundit ning reaktsiooni peatamiseks lisati Na_2CO_3 lahust (lõppkontsentratsioon jäi 0,16 M).

Hüdrolüüsil moodustunud orto-nitrofenooli kontsentratsioon määrati lahuse neeldumise järgi lainepikkusel 420 nm. Mõõtmised viidi läbi kvartsküvettidega, mille paksus oli 10 mm ja ruumala 4 ml.

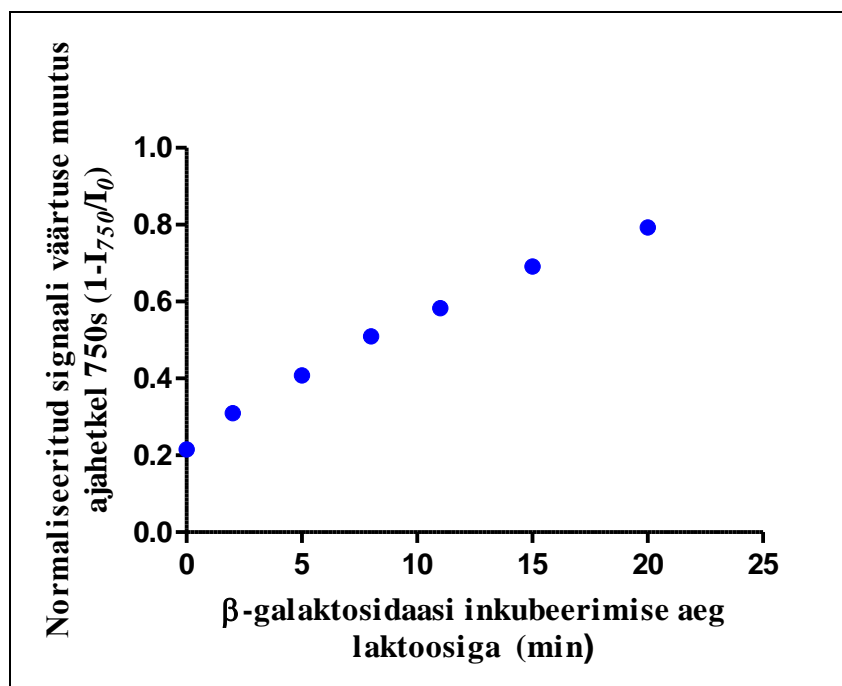
2.6. Bensüülpenitsilliini mõju mõõtmine β -galaktosidaasi aktiivsusele

β -galaktosidaasi (0,1 M fosfaatpuhvril, pH=6,50), kontsentratsiooniga 0,033 IU/ml, inkubeeriti bensüülpenitsilliiniga (0,1 M fosfaatpuhvril, pH=6,50), mille kontsentratsioon lahuses oli 0,0033 g/L. Inkubeerimine toimus 37 °C juures suletud klaasviaalis, mis oli asetatud vesivanni. Ensüümi ja bensüülpenitsilliini inkubeerimisega varieeriti vahemikus 0-48 tundi. Inkubeerimisaja lõppedes määrati β -galaktosidaasi aktiivsus.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

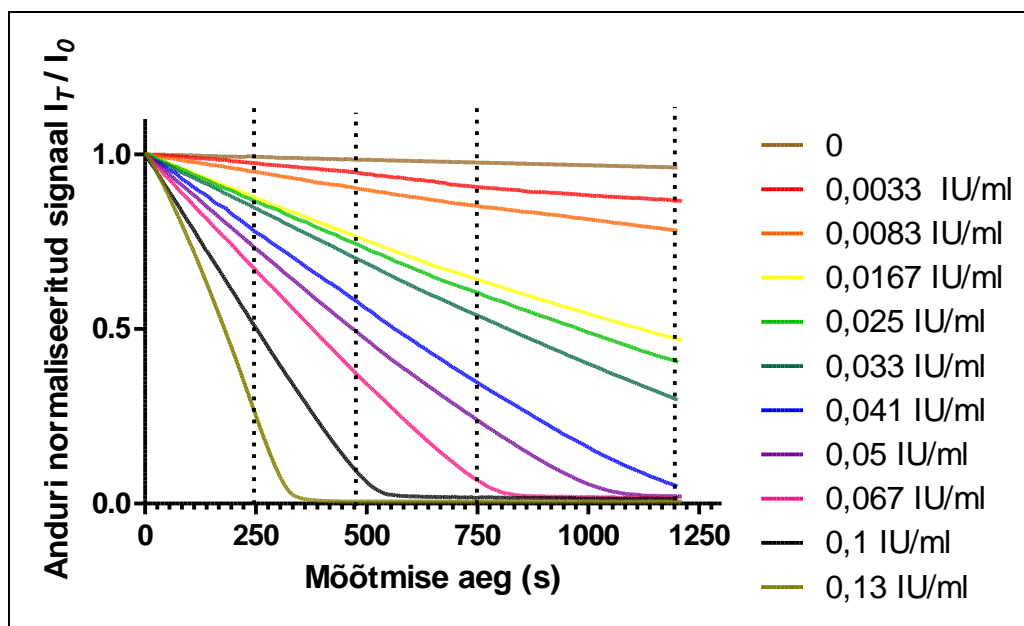
3.1. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks kasutatud meetodite võrdlus

Esmalt leiti β -galaktosidaasi optimaalne laktoosiga inkubeerimise aeg. β -galaktosidaasil ja laktoosil lasti inkubeerida 2-20 minutit ning hapnikuanduriga registreeriti β -galaktosidaasi poolt laktoosi hüdrolyüüsil tekkinud glükoosi katalüütilise oksüdeerimise poolt põhjustatud lahustunud hapniku kontsentratsiooni vähenemist lahuses 750 sekundi jooksul. Optimaalseks inkubeerimisajaks võeti 8 minutit, sest selle aja jooksul reageerib antud tingimustel ära ligikaudu pool lahustunud hapnikust (joonis 3).



Joonis 3. Signaali väärtuse sõltuvus β -galaktosidaasi ja laktoosi inkubeerimise ajast kaskaadses sensoris. Mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga küllastatud 0,1 M fosfaatpuhvris (pH=6,50) konstantsel segamisel 37 °C juures. Laktoosi kontsentratsioon lahuses oli 0,14 M, β -galaktosidaasi aktiivsus 0,033 IU/ml; glükoosi oksüdaasi aktiivsus 1 IU/ml, mõõtmise pikkus 750 sekundit.

Seejärel uuriti β -galaktosidaasi aktiivsuse määramise võimalusi hapnikuanduri abil. Hapnikuanduriga registreeriti β -galaktosidaasi poolt laktoosi hüdrolyüsil tekkinud glükoosi katalüütilise oksüdeerimise poolt põhjustatud lahustunud hapniku kontsentratsiooni vähenemist lahuses. Erinevatel β -galaktosidaasi kontsentratsioonidel saadud normaliseeritud hapniku kontsentratsiooni vähenemine ajas ühesugustel reaktsioonitingimustel on toodud joonisel 4. Clarki-tüüpi anduri korral on väljundvoolu sõltuvus hapniku kontsentratsioonist lahuses lineaarne, optilise anduri puhul arvutati hapniku kontsentratsioon lahuses Stern-Volmeri sõltuvuse abil.



Joonis 4. Hapnikuanduri normaliseeritud signaali muutus ajas kaskaadses sensoris erinevatel β -galaktosidaasi kontsentratsioonidel. Mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga küllastatud 0,1 M fosfaatpuhvis (pH=6,50) konstantsel segamisel 37 °C juures. Laktoosi kontsentratsioon lahuses oli 0,14 M, inkubeerimisaeg 480 sekundit; glükoosi oksüdaasi aktiivsus 1 IU/ml.

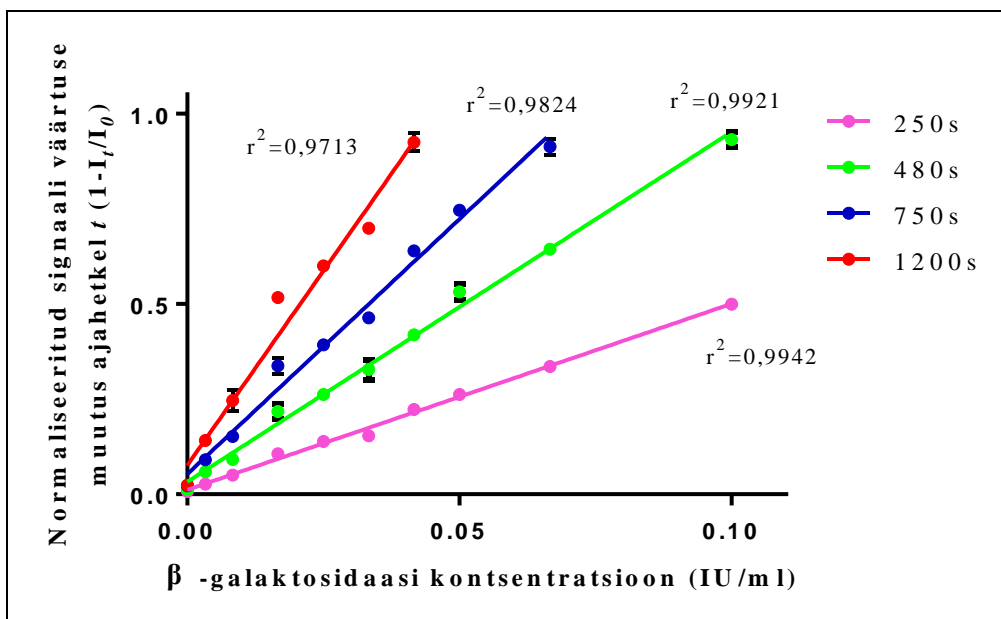
Saadud kõveratest leiti signaali muutumise suurus ajahetkedel, kui reaktsiooni algusest oli möödunud 250, 480, 750 ja 1200 sekundit. Erinevatele ajahetkedele vastava signaali muutuse kasutamine kõverate iseloomustamiseks võimaldab varieerida ensüümi aktiivsuse määramise meetodi tundlikkust ja kasutuspiirkonda. Kuna sensori

tööpiirkonna määrab lahustunud hapniku hulk reaktsioonisegus, siis pikemate või kõrgematel substraadi kontsentratsioonil toimuvate mõõtmiste korral tarbitakse reaktsiooni käigus kogu lahuses olev hapnik ning sensorsüsteem on väljaspool mõõtepiirkonda. Joonistelt 4 saab välja lugeda mõõtmise kestvusest sõltuv β -galaktosidaasi eristatavad kontsentratsioonivahemikud, mis on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Eristatav β -galaktosidaasi kontsentratsioonide vahemiku sõltuvus mõõtmise kestvusest.

Mõõtmise aeg (s)	Eristatav β -galaktosidaasi kontsentratsioonide vahemik (IU/ml)
250	0,0167-0,13
480	0,0083-0,1
750	0,0033-0,067
1200	0,0033-0,033

Siit selgub, et pikematel mõõtmistel pole võimalik kõrgemaid β -galaktosidaasi kontsentratsioone määrata, sest selle aja jooksul tarbitakse kogu reaktsioonikeskkonnas olev hapnik ära. Pikemad mõõtmised tõid kaasa ka suureneva taustmürade osakaalu. Selle iseloomustamiseks koostati graafik telgedes β -galaktosidaasi kontsentratsioon vs. signaali väärtuse muutus uuritava ajahetkel (joonis 5). Mida pikema mõõtmiste signaalid võeti, seda madalam determinatsioonikordaja (r^2) saadi. Determinatsioonikordaja näitab, kui hästi regressioonisirge lähendab vaatlusandmeid ehk kui lineaarne on mingi ala. Ideaalse lineaarsuse korral $r^2=1$. Mida kauem mõõdeti reaktsiooni kineetikat, seda madalamaks läks r^2 väärtus ehk lineaarsus halvenes. See on seletatav taustmürade osakaalu suurenemisega.



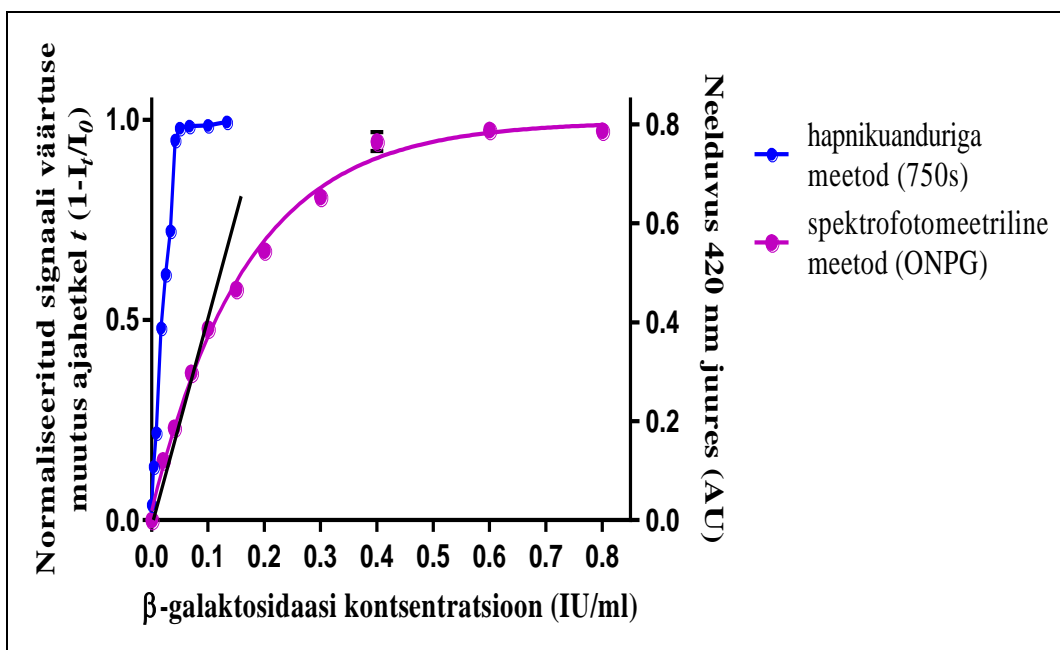
Joonis 5. Signaali väärtuse sõltuvus β -galaktosidaasi kontsentratsioonist ja kineetika mõõtmise kestvusest kaskaadses sensoris. Mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga küllastatud 0,1 M fosfaatpuhvrts (pH=6,50) konstantsel segamisel 37 °C juures. Laktoosi kontsentratsioon lahuses oli 0,14 M, inkubeerimisaeg 480 sekundit; glükoosi oksüdaasi aktiivsus 1 IU/ml.

Joonisel 5 toodud sõltuvuste tõusud iseloomustavad ka süsteemi tundlikkust erinevate signaalide kasutamise korral: mida suurem on kalibreerimisgraafiku tõus, seda tundlikum on süsteem. Kasutades pikemat mõõtmisaega, on võimalik suurendada mõõtesüsteemi tundlikkust, ehkki suureneb ka taustamürade osakaal. Taustamürade allikateks võivad olla elektromagnetilised uitväljad ning temperatuuri kõikumisest tingitud hapniku kontsentratsiooni muutused lahuses. Mõõtesüsteemi tundlikus erinevate signaalide kasutamise korral erines ligi 4 korda (tabel 5).

Tabel 5. β -galaktosidaasi aktiivsuse mõõtmise tundlikkus erinevate mõõteaegade korral.

Mõõtmise aeg (s)	Mõõtesüsteemi tundlikkus (ml/IU)
250	4,9 \pm 0,1
480	9,2 \pm 0,2
750	13,4 \pm 0,4
1200	20,4 \pm 1,0

β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks kasutati ka spektrofotomeetrilist meetodit, kus substraadina kasutati ONPG-d (joonis 6). Joonisel on võrdluseks toodud ka hapnikuanduri kasutamisel saadud sõltuvus β -galaktosidaasi aktiivsusest. Iga punkti jaoks teostati 3-5 korduskatset.

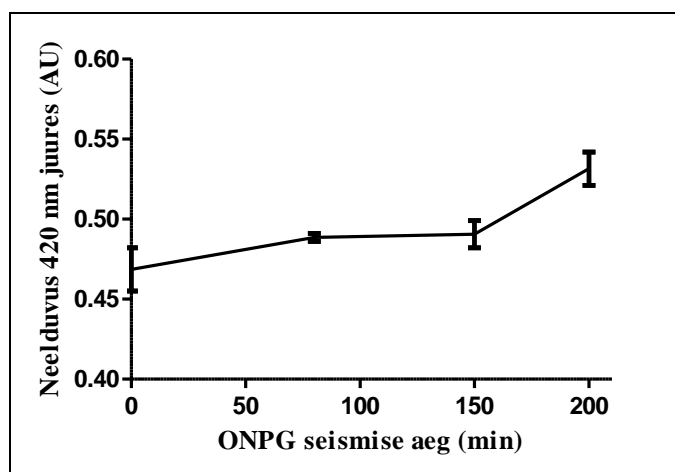


Joonis 6. β -galaktosidaasi aktiivsuse määramine spektrofotomeetrilise meetodiga ONPG-i abil. Inkubeerimisaeg ONPG-ga 480 sekundit, temperatuur 37 °C; ONPG-i kontsentratsioon lahuses $2,65 \cdot 10^{-4}$ M. Võrdluseks on toodud β -galaktosidaasi aktiivsuse määramise kalibreerimisgraafik hapnikuanduriga, kui mõõdetud signaali muutust mõõtmise 750 sekundil.

Spektrofotomeetrilise meetodi korral saadi mõõdetava suuruse lineaarne sõltuvus β -galaktosidaasi aktiivsusest kuni ensüümi aktiivsuseni 0,1 IU/ml; maksimaalne mõõdetud neelduvus oli 0,8 AU. Saadud lineaarse osa tõus oli 4,10 AU*ml/IU.

Võrreldes omavahel kasutatud meetodeid, selgus et hapnikuanduriga β -galaktosidaasi määramine on tundlikum kui spektrofotomeetriline meetod. Mõlema meetodi korral oli substraadi hüdrolyüüsi aeg 480 sekundit. Joonisel 6 toodud võrdlusest on näha, et hapnikuanduriga meetodi korral on signaali suhteline muutus selle võimaliku koguulatusega võrreldes hapnikuaanduri kasutamisel suurem kui spektrofotomeetrilise meetodi korral.

Spektrofotomeetrilise meetodi eeliseks võrreldes hapnikuanduri kasutamisega on väiksem ajakulu ning võimalus määrata kõrgemaid β -galaktosidaasi kontsentratsioone. Negatiivseks küljeks on substraadi kallis hind, selle väga piiratud lahustuvus ja ebapüsivus lahustites (seismisel kipub hüdrolyüüsuma ilma ensüümi katalüüsita, mis põhjustab kõrgendatud tulemusi [37]). ONPG-i püsivust ajas (toatemperatuuril) testiti spektrofotomeetriliselt ning leiti, et peale 200 minutit seismist on ligikaudu 15% ONPG-st iseeneslikult hüdrolyüüsunud (joonis 7).

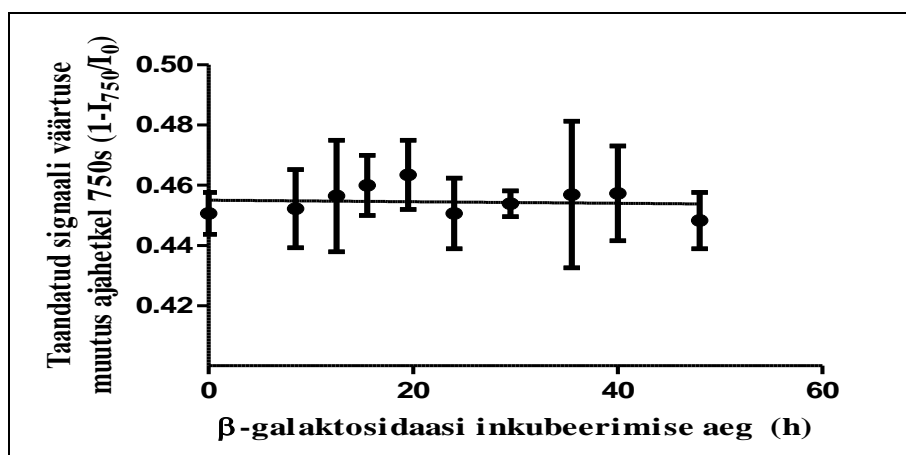


Joonis 7. ONPG püsivuse uurimine (toatemperatuuril) ajas spektrofotomeetrilise meetodiga. Mõõtmised teostati 0,1 M fosfaatpuhvrts (pH=6,5); β -galaktosidaasi

aktiivsus lahuses 0,033 IU/ml; inkubeerimisaeg ONPG-ga 480 sekundit, temperatuur 37 °C; ONPG-i kontsentratsioon lahuses $2,65 \cdot 10^{-4}$ M.

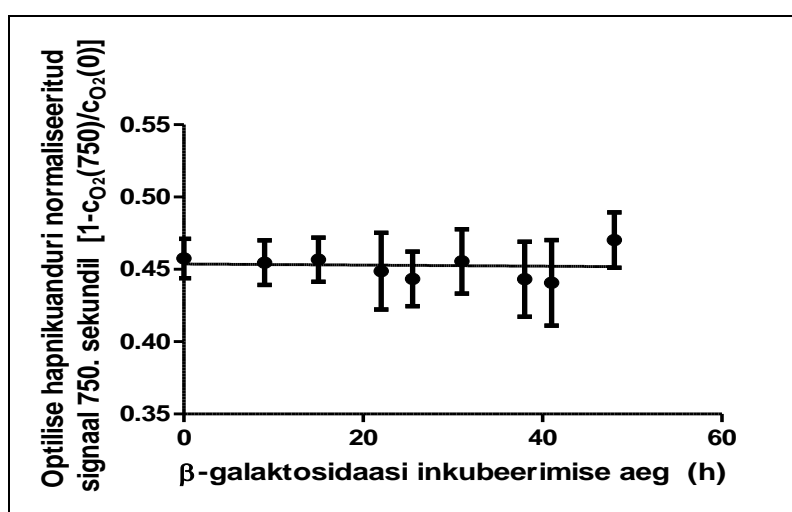
3.2. Lahustunud β -galaktosidaasi stabiilsus

0,1 M fosfaatpuhveris (pH=6,50) lahustunud β -galaktosidaasi stabiilsust uuriti 37 °C juures 48 tunni jooksul nii hapnikuanduri kui spektrofotomeetrilise meetodiga. Kuna ensüümi aktiivsus muutub selle aja jooksul suhteliselt vähe, siis vähemtundliku spektrofotomeetrilise meetodi ning lühema kui 750 sekundilise hapniku kontsentratsiooni vähenemise mõõtmise alusel seda teha ei saanud. Kasutades β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks taandatud signaali muutust 750-ndal sekundil (ΔI_{750}), saadi joonisel 8 toodud sõltuvus. Tehti 3-5 paralleelkatset ja ehkki mõõtevead on väga suured, leiti andmete analüüsil, et 48 tunni jooksul lahustunud β -galaktosidaasi aktiivsus 37 °C juures ei muutunud.



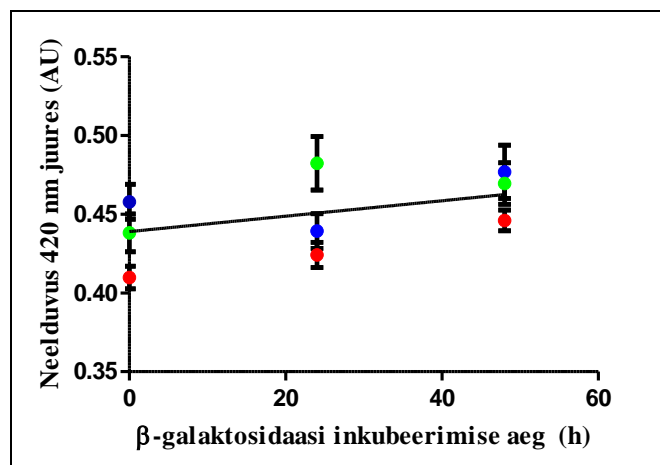
Joonis 8. Lahustunud β -galaktosidaasi stabiilsuse uurimine hapnikuanduriga. Mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga küllastatud 0,1 M fosfaatpuhveris (pH=6,50) konstantsel segamisel 37 °C juures. Laktoosi kontsentratsioon lahuses oli 0,14 M, β -galaktosidaasi aktiivsus 0,033 IU/ml; β -galaktosidaasi inkubeerimisaeg laktoosiga 480 sekundit; mõõtmise pikkus 750 sekundit; glükoosi oksüdaasi aktiivsus 1 IU/ml.

Lisaks Clarki tüüpi andurile kasutati hapniku kontsentratsiooni mõõtmiseks lahuses ka fiiberoptilist andurit, et vähendada elektromagnetiliste mürade osakaalu. Ehkki magnetsegajast põhjustatud kõikumised hapniku kontsentratsiooni määramisel vähenesid, ei saadud oluliselt paremaid tulemusi, sest fiiberoptiline hapnikuandur on väga tundlik temperatuurikõikumiste suhtes. [36] Kuna signaali püstitumise seaduspärasused on erinevate andurite puhul erinevad, siis signaali muutus oli natuke suurem Clarki anduri puhul. Ka optilise hapnikuanduri abil saadud tulemuste analüüsilusel võib öelda, et seismisel fosfaatpuhvril lahustunud ensüümi aktiivsus 48 tunni jooksul ei muutu (joonis 9).



Joonis 9. Lahustunud β-galaktosidaasi stabiilsuse uurimine fiiberoptilise hapnikuanduriga. Mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga küllastatud 0,1 M fosfaatpuhvril (pH=6,50) konstantsel segamisel 37 °C juures. Laktoosi kontsentratsioon lahuses oli 0,14 M, β-galaktosidaasi aktiivsus 0,033 IU/ml; inkubeerimisaeg 480 sekundit; mõõtmise pikkus 750 sekundit; glükoosi oksüdaasi aktiivsus 1 IU/ml.

ONPG-i abil läbiviidud β-galaktosidaasi aktiivsuse mõõtmistel erinesid lahuste neelduvused mõõtmiste alguses suhteliselt palju, mis viitab halvale korratavusele (joonis 10).



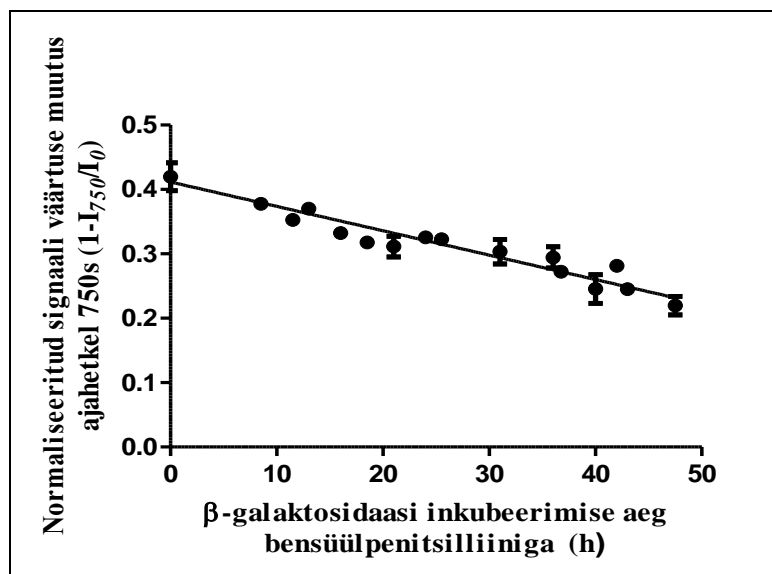
Joonis 10. Spektrofotomeetiline meetod lahustunud β -galaktosidaasi stabiilsuse määramiseks (erinevad mõõtmisseanssid). Mõõtmised viidi läbi 0,1 M fosfaatpuhvrts (pH=6,5); β -galaktosidaasi aktiivsus 0,033 IU/ml; inkubeerimisaeg ONPG-ga 480 sekundit, temperatuur 37 °C; ONPG-i kontsentratsioon lahuses $2,65 \cdot 10^{-4}$ M.

See võib olla põhjustatud substraadi halvast lahustumisest fosfaatpuhvrts, mis tingis substraadi lahuste kontsentratsioonide erinevuse erinevatel mõõtmisseanssidel. Suurte mõõtmisvigade põhjuseks võib olla ka ONPG-i iseeneslikust hüdrolüüsist tingitud ONP teke, mis omakorda annab kõrgendatud neelduvusintensiivsuse [37]. Nimetatud põhjustel pole joonisel 10 ilmnev näiline neelduvuse tõus, mis viitab β -galaktosidaasi aktiivsuse kasvule, usaldusväärne.

3.3. Bensüülpenitsilliini mõju β -galaktosidaasi aktiivsusele

Bensüülpenitsilliini mõju uurimiseks β -galaktosidaasi aktiivsusele inkubeeriti ensüümi bensüülpenitsilliini lahuses (0,003 g/L ehk 3,3 ppm) kuni 48 tundi ning määrati inkubeerimise jooksul ensüümi aktiivsus kahe erineva meetodiga: hapnikuanduriga (substraadiks laktoos) ja spektrofotomeetriselt (substraadiks ONPG).

Hapnikuanduriga sooritatud mõõtmistel saadud tulemused on toodud joonisel 11.



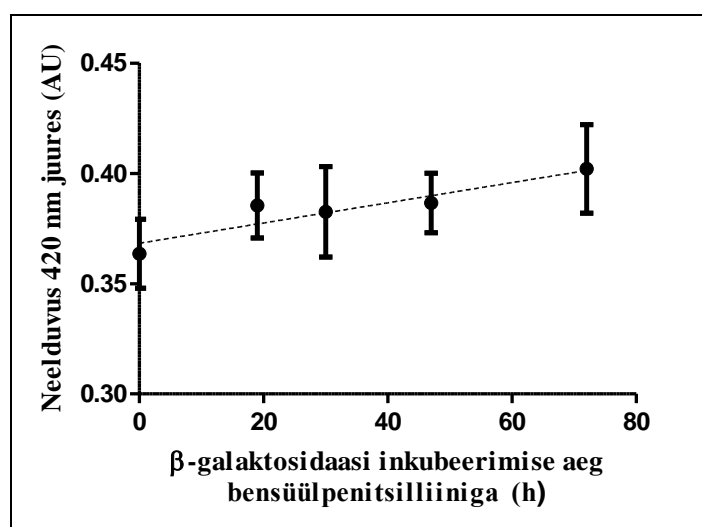
Joonis 11. Hapnikuanduriga mõõdetud bensüülpenitsilliiniga inkubeerimise mõju β -galaktosidaasi aktiivsusele. Mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga küllastatud 0,1 M fosfaatpuhvrts (pH=6,50) konstantsel segamisel 37 °C juures. Laktoosi kontsentratsioon lahuses oli 0,14 M, β -galaktosidaasi aktiivsus 0,033 IU/ml; bensüülpenitsilliini kontsentratsioon 0,0033 g/L; laktoosi inkubeerimisaeg β -galaktosidaasiga 480 sekundit; mõõtmise pikkus 750 sekundit; glükoosi oksüdaasi aktiivsus 1 IU/ml.

Selgus, et bensüülpenitsilliin inaktiveerib β -galaktosidaasi ning 48 tunnise inkubeerimise jooksul väheneb β -galaktosidaasi aktiivsus ligikaudu 35% võrreldes esialgsuga. Kuna ensüüm ise selle aja jooksul ei inaktiveeru (ptk 3.2), siis võib eeldada, et leitud efekt on põhjustatud bensüülpenitsilliini toimest. Uuritud ajavahemikus võib inhibeerimist vaadata kui lineaarset protsessi, mille hinnanguline poolestusaeg on ca 60 tundi.

Mõõtmistel kasutatud bensüülpenitsilliini kontsentratsioon oli 0,0033g/l ehk 3,3 ppm, mis on ligikaudu 1000 korda suurem kui bensüülpenitsilliini lubatud piirnorm piimas (4 ppb) [31]. Ravialuse lehma piimas ületab bensüülpenitsilliini kontsentratsioon lubatud piirnormi tegelikult aga kuni 3000 korda [42].

Seega on tõenäoline, et juba sellise bensüülpenitsilliini kontsentratsiooni korral piimas on biosensorivi abil nähtav efekt põhjustatud β -galaktosidaasi aktiivsuse vähenemisest tingitud madalamatest galaktoosi ja glükoosi kontsentratsioonidest. Samas on tundlikuma sensorsüsteemi kasutamisel võimalik tuvastada ka madalamaid antibiootikumijääkide kontsentratsioone.

Spektrofotomeetrilisel meetodil saadud tulemused on esitatud joonisel 12. Ehkki kõikidel uuritud ajamomentidel teostati 3-5 korduskatset, mille tulemustest võeti aritmeetiline keskmine, ei saadud antud meetodil usaldusväärseid tulemusi.



Joonis 12. Bensüülpenitsilliini inkubeerimine β -galaktosidaasiga ja aktiivsuse määramine spektrofotomeetriliselt. Mõõtmised viidi läbi 0,1 M fosfaatpuhvril (pH=6,5); β -galaktosidaasi aktiivsus 0,033 IU/ml; bensüülpenitsilliini kontsentratsioon 0,0033 g/L; inkubeerimisaeg ONPG-ga 480 sekundit, temperatuur 37 °C; ONPG kontsentratsioon lahuses $2,65 \cdot 10^{-4}$ M.

Seismisel toimub β -galaktosidaasi aktiivsuse näiv suurenemine, mis võib olla tingitud ONPG-i iseeneslikust hüdrolüüsist, mida on kirjeldatud ka varem [37]. Samas pole spektrofotomeetriline meetod nii madalate β -galaktosidaasi aktiivsuste korral piisavalt tundlik, mis tingib ka suured mõõtemääramused.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida ja võrrelda erinevaid meetodikaid β -galaktosidaasi aktiivsuse määramiseks ning uurida β -laktaamide hulka kuuluva antibiootikumi bensüülpenitsilliin mõju β -galaktosidaasi aktiivsusele, mis mõjutab oksüdaasidel põhineva biosensorrivi signaali piimas.

Hapnikuanduril põhineva ja spektrofotomeetrilise (substraadina kasutatakse orto-nitrofenüül- β -galaktosiidi ehk ONPG-i) β -galaktosidaasi aktiivsuse määramise meetodi võrdlemisel osutus tundlikumaks hapnikuanduril põhinev meetod, kusjuures selle tundlikkus oli seda suurem, mida pikem oli mõõtmise aeg; samas suurenes mõõtmisaja pikenedes eksperimentaalsete mürade osakaal. Spektrofotomeetriline meetod võimaldas määrata kõrgemaid β -galaktosidaasi kontsentratsioone, kuid võib tulemuseks anda näivalt kõrgemaid β -galaktosidaasi aktiivsusi ONPG iseeneseliku hüdrolüüsi tõttu. Kuigi hapnikuanduriga β -galaktosidaasi aktiivsuse määramise meetod on võrreldes spektrofotomeetrilise meetodiga kaks korda ajakulukam, on ta oluliselt tundlikum.

Lahustunud β -galaktosidaasi stabiilsust uuriti fosfaatpuhvril 48 tunni vältel temperatuuril 37 °C, kusjuures ensüümi aktiivsust mõõdeti nii hapnikuanduri abil kui spektrofotomeetriliselt. Leiti, et β -galaktosidaasi aktiivsus selle aja jooksul ei muutu.

Bensüülpenitsilliini mõju uurimisel β -galaktosidaasi aktiivsusele leiti hapnikuandurit kasutades, et 48 tunni jooksul vähenes β -galaktosidaasi aktiivsus bensüülpenitsilliini (3,3 ppm) mõjul 37 °C juures ligikaudu 35%, mis toetab töö eesmärgi seadmisel püstitatud hüpoteesi, et β -galaktosidaasi aktiivsus väheneb bensüülpenitsilliini toimel. Spektrofotomeetriline meetod polnud piisavalt tundlik, et vastavas vahemikus β -galaktosidaasi aktiivsuse muutust detekteerida.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Rincken, R.; Jaaniso, T. On-line system, method of its calibration and simultaneous detection of antibiotic residues and their concentration in milk. *EP* 2 529 217 B1, **2013**.
- [2] Juers, D. H.; Matthews, B. W.; Huber, R. E. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Sci.* **2012**, *21*, 1792–1807.
- [3] Mlichová, Z.; Rosenberg, M. Current trends of β -galactosidase application in food technology. *J. Food Nutr. Res.* **2006**, *45*, 2, 47–54.
- [4] Delavenne, E.; Mounier, J.; Déniel, F.; Barbier, G.; Le Blay, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *155*, 3, 185–190.
- [5] Franciosi, E.; Settanni, L.; Cavazza, A.; Poznanski, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *Int. Dairy J.* **2009**, *19*, 1, 3–11.
- [6] Matthews, B. W. The structure of *E. coli* β -galactosidase. *Comptes Rendus - Biol.* **2005**, *328*, 549–556.
- [7] Horiuchi, T.; Tanaka, Y.; Kagamiishi, A.; Kiuchi, A. Purification and properties of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.* **1975**, *77*, 1, 241–247.
- [8] Haider, T.; Husain, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41*, 72–80.
- [9] Martinez-Bilbao, M.; Holdsworth, R. E.; Edwards, L. A.; Huber, R. E. A Highly Reactive β -Galactosidase (*Escherichia coli*) Resulting from a Substitution of an Aspartic Acid for Gly-794. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 8, 4979–4986.
- [10] Juers, D. H.; Rob, B.; Dugdale, M. L.; Rahimzadeh, N.; Giang, C.; Lee, M.; Matthews, B. W.; Huber, R. E. Direct and indirect roles of His-418 in metal binding and in the activity of β -galactosidase (*E. coli*). *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1281–1292.
- [11] Crescimbeni, M. C.; Nolan, V.; Clop, P. D.; Marín, G. N.; Perillo, M. A. Activity modulation and reusability of β -D-galactosidase confined in sol-gel derived porous silicate glass. *Colloids Surfaces B. Biointerfaces.* **2010**, *76*, 387–396.

- [12] Tenu, J. T.; Viratelle, O. M.; Garnier, J.; Yon, J. pH Dependence of the Activity of β -Galactosidase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **1971**, *20*, 363–370.
- [13] Patel, G. B.; Mackenzie, C. R.; Agnew, B. J. Properties and potential advantages of β -galactosidase from *Bacteroides polypragmatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, *22*, 2, 114–120.
- [14] Stein, R. L. *Kinetics of Enzyme Action: Essential Principles for Drug Hunters*. John Wiley & Sons, Inc. 2011.
- [15] Rincken, T.; Peedel, D. Effect of temperature on the sensitivity of cascaded lactose biosensors. *Proc. Est. Acad. Sci.* **2012**, *61*, 1, 306–313.
- [16] Held, P. G. Determination of β -Galactosidase Activity using the Power Wave 200 Microplate Spectrophotometer. *Creating Solutions for the Future of Science™*. **2005**, 2–6.
- [17] Wutor, V. C.; Togo, C. A.; Pletschke, B. I. The effect of physico-chemical parameters and chemical compounds on the activity of β -D-galactosidase (β -GAL), a marker enzyme for indicator microorganisms in water. *Chemosphere.* **2007**, *68*, 622–627.
- [18] Smale, S. T. β -Galactosidase Assay (CPRG). *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, *5*, 1–8.
- [19] Serebriiskii, I. G.; Golemis, E. A. Uses of lacZ to study gene function: evaluation of β -galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system. *Anal. Biochem.* **2000**, *285*, 1–15.
- [20] Burn, S. F. Detection of β -Galactosidase Activity: X-gal Staining. *Kidney Dev.*, **2012**, *886*, 147–155.
- [21] Held, P. G. Determination of β -Galactosidase Activity using the FL600™ Microplate Fluorescence Reader. *BioTek Appl. Note.* **2006**.
- [22] Kishore, D.; Kundu, S.; Kayastha, A. M. Thermal, Chemical and pH Induced Denaturation of a Multimeric β -Galactosidase Reveals Multiple Unfolding Pathways. *PLoS One.* **2012**, *7*, 11.
- [23] Gong, H.; Zhang, B.; Little, G.; Kovar, J.; Chen, H.; Xie, W.; Schutz-Geschwender, A.; Olive, D. M. β -Galactosidase activity assay using far-red-shifted fluorescent substrate DDAOG. *Anal. Biochem.* **2009**, *386*, 1, 59–64.

- [24] Jain, V. K.; Magrath, I. T. A chemiluminescent assay for quantitation of β -galactosidase in the femtogram range: Application to quantitation of β -galactosidase in lacZ-transfected cells. *Anal. Biochem.* **1991**, *199*, 1, 119–124.
- [25] Bronstein, I.; Martin, C. S.; Fortin, J. J.; Olesen, C. E. M.; Voyta, J. C. Chemiluminescence: Sensitive detection technology for reporter gene assays. *Clin. Chem.* **1996**, *42*, 1542–1546.
- [26] Sezgintürk, M. K.; Dinçkaya, E. β -Galactosidase monitoring by a biosensor based on Clark electrode: Its optimization, characterization and application. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1799–1804.
- [27] Rao, S. P. N. Extended-spectrum β -lactamases. <http://www.microrao.com/micronotes/pg/ESBLs.pdf>. Viimati uuendatud **11.06.2012**.
- [28] Hubschwerlen, C. β -Lactam Antibiotics. *Compr. Med. Chem. II.* **2007**, *7*, 479–518.
- [29] Wang, J.; Macneil, J. D.; Kay, J. F. *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*. John Wiley & Sons: New Jersey, **2011**.
- [30] Tahlan, K.; Jensen, S. E. Origins of the β -lactam rings in natural products. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2013**, *66*, 401–410.
- [31] Commission regulation (EU) No 37/2010. Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **2009**.
- [32] Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 3, 226-236.
- [33] Gordillo, M. D.; Blanco, M. A.; Molero, A.; de la Ossa, E. M. Solubility of the antibiotic Penicillin G in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids.* **1999**, *15*, 183–190.
- [34] Abraham, E. Selective reminiscences of β -lactam antibiotics: early research on penicillin and cephalosporins. *Bioessays.* **1990**, *12*, 12, 601–606.
- [35] Burch, D. G. S. Penicillin V - more than just Streptococcal meningitis control. *Pig World.* **2007**.
- [36] Deshpande, A. D.; Baheti, K. G.; Chatterjee, N. R. Degradation β -lactam antibiotics. *Curr. Sci.* **2004**, *87*, 12, 1684–1695.

- [37] European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012. EMA/333921. **2014**.
- [38] Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, 1-15.
- [39] Tamm, E.; Kõljalg, S.; Lutsar, I.; Maimets, M.; Naaber, P. Pneumokokkinfektsioon lapseas. *Eesti Arst.* **2003**, *82*, 2, 464–471.
- [40] Chambers, H. F. Penicillin-binding protein-mediated resistance in Pneumococci and Staphylococci. *J. Infect. Dis.* **1999**, *179*, 2, 353-359.
- [41] Chu, C.-S.; Lo, Y.-L.; Sung, T.-W. Review on recent developments of fluorescent oxygen and carbon dioxide optical fiber sensors. *Photonic Sensors.* **2011**, *1*, 3, 234–250.
- [42] Knappstein, K.; Suhren, G.; Walte, H.-G. Influences of milking intervals and frequencies in automatic milking systems on excretion characteristics of different antibiotics in milk. <http://www.automaticmilking.nl/Projectresults/Reports/DeliverableD11.pdf> viimati uuendatud **10.2003**.

The Effect of Benzylpenicillin on the Activity of β -galactosidase

Gunnar Printsman

Summary

This study is a part of a project for the development of a biosensor array for rapid detection of antibiotic residues in raw milk. In the present study, different methods for the determination of β -galactosidase activity were used and evaluated to measure the inhibition of the enzyme by benzylpenicillin. In addition, we also studied the stability of soluble β -galactosidase.

The activity of β -galactosidase was determined with an oxygen sensor as well as spectrophotometrically, using orto-nitrophenyl- β -galactoside as a substrate. The method, based on the application of oxygen sensor proved to be more sensitive compared to the spectrophotometric method. The sensitivity of measurements with oxygen sensor increased along with increasing the length of the measurement time. However, this led to higher background noise and made the experimental procedure twice as long compared to the time, required to carry out the spectrophotometric method. The latter method enabled to measure higher concentrations of β -galactosidase, however, the results were higher than expected because of the spontaneous hydrolysis of orto-nitro-phenyl- β -galactoside.

The stability of dissolved β -galactosidase was studied in phosphate buffer solution at 37 °C over 48 hours. The activity of β -galactosidase during this period was characterized both with oxygen sensor and spectrophotometrically. It was shown that the activity of soluble β -galactosidase remained unchanged during its storage for 48 hours.

The effect of benzylpenicillin on the activity of β -galactosidase was studied with the help of oxygen sensor. β -galactosidase was incubated with benzylpenicillin (0,0033 g/L) in phosphate buffer solution at 37 °C for 48 hours. We found that after 48 h incubation β -galactosidase activity had decreased for approximately 35%. The obtained data supports the previously stated hypothesis that benzylpenicillin acts as an inhibitor towards β -galactosidase. It was not possible to apply spectrophotometric method for the measurements of β -galactosidase inhibition, as the sensitivity of this method was not sufficient.

Mina, Gunnar Printsman,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Bensüülpenitsilliini mõju uurimine β -galaktosidaasi aktiivsusele,

mille juhendaja on Toonika Rinke,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

*1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **04.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.*

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **29.05.2015**