

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut

Merle Muruvee

**Galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi eraldamine ja
puhastamine**

Bakalaureusetöö keemia erialal (12EAP)

Juhendajad: vanemteadur Toonika Rinke
teadur Kairi Kivirand

Tartu 2016

SISUKORD

Sissejuhatus	3
1. Kirjanduse ülevaade	4
1.1 Ensüümide iseloomustamine	4
1.1.1. Laktaadi oksüdaasi iseloomustamine	4
1.1.2. Galaktoosi oksüdaasi iseloomustamine.....	6
1.2. Jogurtikultuuri YC-X11 iseloomustamine	7
1.3. Valkude puhastamise meetodid.....	8
2. Eksperimentaalne osa.....	10
2.1 Kasutatud reaktiivid	10
2.2 Lahuste valmistamine.....	11
2.3 Ensüümide aktiivsuste mõõtmiste aparatuur ja meetodika	11
2.4 Reaktsiooni iseloomustavate parameetrite arvutamine	11
2.5 Ensüümide eraldamine ja puhastamine	12
2.5.1 Jogurtikultuuri YC-X11 kasvatamine	12
2.5.2 Ensüümide puhastamine baktermassist ja nende iseloomustamine	12
3. Tulemused ja arutelu	14
3.1 Laktaadi ja galaktoosi oksüdaaside aktiivsuste määramine	14
3.2. Ensüümide puhastamisetapid jogurtikultuurist YC-X11	15
Kokkuvõte	20
Kasutatud kirjandus.....	21
Summary	27
Infoleht	28
Lihtlitsents.....	29

Sissejuhatus

Galaktoosi oksüdaas ja laktaadi oksüdaas on ensüümid, mida leidub mitmetes bakterites ja seentes ning mida laialdaselt kasutatakse biosensorite bioäratundmissüsteemides. Kuna laktaadi oksüdaas ja galaktoosi oksüdaas on ensüümid, mis katalüüsivad piimas sisalduvate substraatidega toimuvaid reaktsioone, saab neid kasutada piima kvaliteeti iseloomustavates biosensorites. Kommertsiaalsed preparaadid on aga kallid ja ensüümide aktiivsus erinevates partiides üsna kõikuv. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida ensüümide laktaadi oksüdaasi (EC 1.13.12.4) ja galaktoosi oksüdaasi (EC 1.1.3.9) eraldamise ja puhastamise võimalusi jogurtikultuurist YC-X11.

Töö teoreetilises osas antakse ülevaade laktaadi ja galaktoosi oksüdaaside omadustest ja erinevatest võimalustest ensüümide puhastamiseks baktersistensioonist.

Töös praktilises osas uuritakse oksüdaaside puhastamise võimalusi jogurtikultuurist. Kuna laktaadi oksüdaas on intratsellulaarne ensüüm, ehk paikneb rakumembraanis, siis uuriti töö käigus ka erinevaid võimalusi ensüümide solubiliseerimiseks bakterisuspensioonist. Ensüümide aktiivsuste määramiseks erinevates etappides kasutati baaselektroodina amperomeetrilist Clark'i tüüpi hapnikuandurit, mis võimaldab jälgida ensüümi poolt katalüüsitava reaktsiooni käigus muutuvat hapniku kontsentratsiooni.

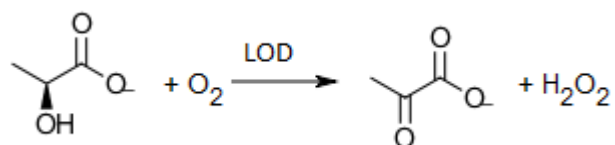
1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Ensüümide iseloomustamine

1.1.1. Laktaadi oksüdaasi iseloomustamine

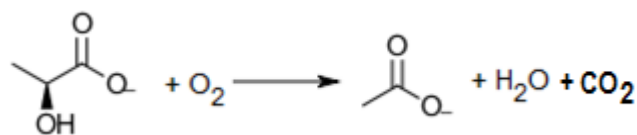
Laktaadi oksüdaas (LOD, EC.1.13.12.4), süstemaatilise nimetusega (S)-laktaat: laktaadi-2-oksüdoreduktaas on flavoensüüm, mis kuulub oksüdoreduktaaside klassi [1]. Oksüdoreduktaaside klassi kuuluvad ensüümid katalüüsivad redoksreaktsioone, millest võtab osa molekulaarne hapnik [2]. Katalüüsi läbiviimiseks on vajalik koensüüm, milleks on riboflaviin-5-fosfaat [3-6].

Laktaadi oksüdaasi katalüüsiv mõju võib toimuda kahel erineval viisil, sõltuvalt millisest bakteritüvest on ensüüm eraldatud. *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus*, *Aerococcus* perekonda kuuluvatest bakteritest puhastatud laktaadi oksüdaasi katalüüsib L-laktaadi oksüdeerumist püruvaadiks ja vesinikperoksiidiks (joonis 1).



Joonis 1. Laktaadi oksüdaasi poolt katalüüsitud L-laktaadi oksüdeerumine püruvaadiks ja vesinikperoksiidiks.

Mycobacterium smegmatis eraldatud LOD oksüdeerib L-laktaadi atsetaadiks, süsihappegaasiks ja veeks (joonis 2), kasutades molekulaarset hapniku elektrondoonaatorina [7].



Joonis 2. Laktaadi oksüdaasi poolt katalüüsitud L-laktaadi oksüdeerumine atsetaadiks, süsihappegaasiks ja veeks.

Vesinikperoksiid omab reaktsioonis osaleva laktaadi oksüdaasi suhtes inhibeerivat mõju [8]. Lisaks vesinikperoksiidile inhibeerivad ensüümi aktiivsust veel D-laktaat, 1-fluoro-2,4-dinitrobenseen, L-mandelaat, oksalaatioon, atsetaatioon ja fosfaatioon [1,8,9].

Ensüümi kasutatakse laktaadi biosensorites L-laktaadi määramiseks nii piimas kui veres [10]. Lisaks L-laktaadile on laktaadi oksüdaasi substraatideks glükolaat, 2-hüdroksübutüraat [1]. Ensüümi reaktsiooni iseloomustav konstant K_M vastab substraadi kontsentratsioonile, kui reaktsiooni kiirus on saavutanud pool maksimaalsest kiirusest. K_M väärtus sõltub ensüümi puhastamise algmaterjalist ja mõõtmistingimustest (pH, temperatuur).

LOD aktiivsust mõjutavad pH ja temperatuur, optimaalsed pH väärtused jäävad vahemikku 5,7-7,5 ning optimaalseks temperatuuriks on 35-40°C [1,6,11,12]. Ensüümi isoelektriline punkt on 4,3-4,6 [13,14]. Optimaalsed tingimused sõltuvad bakteritüvest, millest on laktaadi oksüdaas eraldatud.

LOD molekulmass sõltub sellest, millisest bakteritüvest on ensüüm eraldatud. Lisaks *Mycobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* perekonda kuuluvatele bakteritele on laktaadi oksüdaasi eraldatud veel *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Geotrichum*, *Enterococcus* bakteritest [1,5,7,14-20]. Eksperimentaalselt kõige madalama molekulmassiga (170-250 kDa) *Aerococcus viridans* bakteritüvest eraldatud ensüüm on tetrameerse struktuuriga ja suurima molekulmassiga (400 kDa) laktaadi oksüdaas on eraldatud *Geotrichum candidum* bakteritüvest, mis vastab oktameersele struktuurile [1,17,18,21].

Ensüümi puhastamine algmaterjalist on mitmeetapiline protsess. LOD on rakusisene ensüüm ja selle eraldamiseks on vajalik esmalt rakukestad purustada. Bakteriraku kesta purustamiseks on kasutatud erinevaid meetodeid: mehaaniline purustamine, detergendid ja lüsoosüümid. Peale bakteriraku kestade lõhustumist ja nende eraldamist keskkonnast (näiteks tsentrifuugimise teel) kasutatakse ensüümide sadestamist proovist. Ensüümide sadestamiseks on enim kasutatust leidnud ammooniumsulfaat, mida kasutatakse erinevatel küllastuskontsentratsioonidel (30%-80%), sõltuvalt puhastatavate ensüümide olemusest. Ammooniumsulfaadi eraldamiseks proovist kasutatakse dialüüsi, väljasoolamiskolonne või geelfiltratsiooni. Ensüümide edasiseks puhastamiseks kasutatakse erinevaid kromatograafilise meetodeid, enim levinud on ioonvahetus- ja afiinsuskromatograafia (tabel 1). [18,21,22]

Tabel 1. Laktaadi oksüdaasi puhastamise erinevatest bakterikultuuridest.

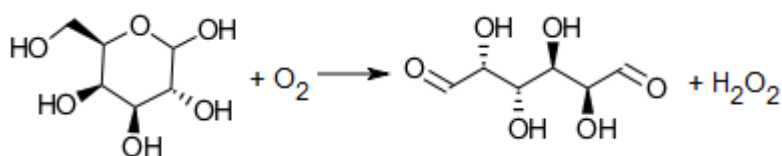
Puhastamiseks kasutatud kultuur	Puhastamise etapid	Molaarmass, kDa	Ensüümi struktuur	Saagis, %	Viide
<i>Geotrichum candidum</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ -ga sadestamine, geelkromatograafia	400	oktameer	-	[18]
<i>Aerococcus viridans</i>	Geelfiltratsioon, väljasoolamise kolonn, ioonvahetuskromatograafia	187,3	tetrameer	24	[21]

<i>Aerococcus viridans</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ -ga sadestamine, dialüüs, ionvahetus-, geelkromatograafia	176	tetrameer	61	[22]
KY6 gram-negatiivne bakter	(NH ₄) ₂ SO ₄ -ga sadestamine, ionvahetus-, geel- ja afiinsuskromatograafia	204	tetrameer	7	[23]
<i>Aerococcus viridans</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ -ga sadestamine, ionvahetuskromatograafia	172	tetrameer	60	[24]

1.1.2. Galaktoosi oksüdaasi iseloomustamine

Galaktoosi oksüdaas (GAO, EC.1.1.3.9), süstemaatilise nimetusega D-galaktoos: hapnik-6-oksüdüreduktaas, on metalloensüüm [1]. Metalloensüümid on proteiinid, mis sisaldavad tugevalt seotud metallikatiooni, mis võtab osa elektronide ülekandest redoksprotsessis [25,26]. Galaktoosi oksüdaas on monomeerne ensüüm, mille molekul sisaldab kofaktorina ühte vask(II)iooni ühe ensüümi molekuli kohta ning milles on kovalentne tioeeter side türosiini ja tsüteiini jääkide vahel [27,28].

Galaktoosi oksüdaas katalüüsib D-galaktoosi oksüdeerumist D-galaktoheksodialdoosiks ja reaktsioonis osavõttev molekulaarne hapnik redutseerub vesinikperoksiidiks (joonis 3) [29,30,31].



Joonis 3. Galaktoosi oksüdaasi poolt katalüüsitud galaktoosi oksüdeerumine D-galaktoheksodialdoosiks ja vesinikperoksiidiks.

GAO aktiivust mõjutavad nii pH kui ka temperatuur, optimaalne pH väärtus jääb vahemikku 5,5-7,5 ja optimaalne temperatuur on vahemikus 30-40°C [1,30,32]. Optimaalsed väärtused sõltuvad bakteritüvest, millest galaktoosi oksüdaas on eraldatud.

Galaktoosi oksüdaasi substraatideks on D-galaktoos, laktoos, primaarsed alkoholid, oligosahhariidid, glükolipiidid [1,33]. Ensüümi K_M väärtused erinevate substraatide suhtes sõltuvad puhastamiseks valitud algmaterjalist ja mõõtmisparameetritest (pH, temperatuur) GAO kasutatakse biosensorites D-galaktoosi ja laktoosi määramisel piimas, kuid ka veres ja teistes kehavedelikes [34-36]. GAO suhtes inhibeerivat mõju omavad tsüaniidid,

hüdroksüülamiin, dietüülditiokarbamaat, L-askorbiinhape, 2-deoksü-D-galaktoos, AgNO₃, NaN₃, naatriumdodetsüülsulfaat (SDS) ja etüleendiaminotetraatseethape (EDTA) [1,37,38].

Ensüümi on eraldatud peamiselt *Fusarium graminearum* bakteritest, kuid ka *Dactylium dendroides* (varasemalt *Polyporus circinatus*), *Gibberella fujikuroi* ja teistest *Fusarium* perekonda kuuluvatest bakteritest [1,30,38-41]. Molekulmass jääb 66-90 kDa ja see sõltub, millisest kultuurist on ensüüm puhastatud [1;38]. Peamiselt on eraldatud ekstratsellulaarset galaktoosi oksüdaasi, kuid *Dactylium dendroides* bakterites esineb ensüüm intratsellulaarsena, mis on stabiilsem vorm kui ekstratsellulaarne GAO [1,42].

Galaktoosi oksüdaasi puhastamine on mitmeetapiline protsess: ensüümi sadestamiseks on kasutatud ammooniumsulfaati erinevate küllastuskontsentratsioonidega (kuni 90%). Soola eraldamiseks on kasutatud dialüüsi (8-12 tundi) või geelfiltratsiooni ja ensüümi edasiseks puhastamiseks nii afiinsus- kui ka ionvahetuskromatograafiat (tabel 2):

Tabel 2. Galaktoosi oksüdaasi puhastamise meetodid.

Puhastamiseks kasutatud kultuur	Puhastamise etapid	Ensüümi asukoht bakterirakus	Molaarmass, kDa	Saagis, %	Viide
<i>Fusarium acuminatum</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ -ga sadestamine, dialüüs, geel-, afiinsuskromatograafia	ekstratsellulaarne	66	42	[38]
<i>Dactylium dendroides</i>	dialüüs, afiinsus- ja ionvahetuskromatograafia	ekstratsellulaarne	-	74	[39]
<i>Polyporus circinatus</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ -ga sadestamine, dialüüs, ionvahetus kromatograafia	ekstratsellulaarne	75	30	[43]
<i>Dactylium dendroides</i>	-	intratsellulaarne	72	64	[44]
<i>Gibberella fujikuroi</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ -ga sadestamine, dialüüs, ionvahetus-, geel-, hüdroksüapatiit-kromatograafia	ekstratsellulaarne	90	5	[45]

1.2. Jogurtikultuuri YC-X11 iseloomustamine

Piimatoodete, peamiselt jogurti valmistamisel lisatakse piimale bakterikultuuri, mille eesmärgiks on piimas sisalduva laktoosi lagundamine piimhappeks, seda protsessi nimetatakse piimhappekäärimiseks. Piimhappe ehk laktaadi teke muudab keskkonna happelisemaks, mis põhjustab piima hapnemist. Lisaks laktoosi lagundamisele kalgendavad piimhappebakterid piimavalke, mis annavad jogurtile paksema tekstuuri. Jogurti

valmistamisel kasutatakse starterkultuurina YC-X11, mis sisaldab piimhappebaktereid *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* (*L. bulgaricus*) ja *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) [46,47]. *S. thermophilus* ja *L. bulgaricus* on homofermentatiivsed gram-positiivsed bakterid, mis kasutavad oma elutegevuseks laktoosi, lagundades selle piimhappeks [48,49]. *S. thermophilus* ja *L. bulgaricus* baktereid kasutatakse lisaks jogurti valmistamisele ka juustu tootmisel (nt. Mozzarella ja Cheddar) [50-52]. Jogurtis leiduvad *S. thermophilus* ja *L. bulgaricus* on probiootilised bakterid, mis tagavad soolestiku mikrofloora tasakaalu, soodustades seedeprotsesse ning vähendades patogeensete mikroorganismide kasvamist ning kinnitumist soolesteseinale [53].

Optimaalseks kasvu temperatuuriks *L. bulgaricus* bakteritel on 43-46°C ja *S. thermophilus* bakteritel 35-42°C [54-56]. Mõlema bakteri optimaalne keskkonna pH jääb vahemikku 5,8-6,5 [55]. Rakukestades lõhustamiseks on kasutatud nii mehaanilisi kui mittemehaanilisi meetodeid [57].

1.3. Valkude puhastamise meetodid

Valkude puhastamine on mitmeetapiline protsess, mis algab valgu eraldamisest algmaterjalist (rakukultuur, bioloogiline kude) [58-60]. Rakumembraanides paiknevate valkude eraldamiseks on oluline rakumembraanide efektiivne lõhkumine. Selleks kasutatakse mitmeid erinevaid meetodeid: mehaaniline purustamine, purustamine helilainetega, proovi külmutamine/sulatamine, mitmesuguste lisandite kasutamine (näiteks detergendid).

Peamiselt kasutatakse rakusiseste valkude eraldamiseks mehaanilisi meetodeid, mis võivad aga põhjustada valkude denatureerumise ning valkude eraldamine teistest lahuses olevatest komponentidest on raskendatud [59,61]. Alternatiivseks meetodiks on lüütiliste ensüümide, detergentide või solventide kasutamine rakumembraanide lõhkumiseks. [61,62]

Detergendid muudavad membraanivalgud, lipiidi ja teised membraani hüdrofoobsed komponendid vees lahustuvateks, moodustades nende ümber mitsellid, mille tagajärjel pääsevad rakusisesed valgud lahusesse [59,63]. Detergendid jagunevad ioonseteks, mitteioonseteks ja tsvitterioonseteks. Peamine erinevus seisneb selles, et ioonsed ja tsvitterioonsed detergendid denatureerivad valke, seega detergenti valikul tuleb lähtuda edasisest puhastusprotsessist [59,60,63]. Detergente eraldatakse dialüüsi, geelfiltratsiooniga või ioonvahetuskromatograafia abil, sõltuvalt detergentide omadustest [64].

Valkude edasiseks puhastamiseks on kasutusel mitmesugused meetodid: tsentrifuugimine, sadestamine, dialüüs, geelfiltratsioon, ioonvahetus- ja afiinsuskromatograafia

[65,66]. Tsentrifugimist võib viia läbi mitmes etapis, kus esmalt eraldatakse madalatel pööratel (4000 kuni 20 000 xg) lahusest rakukestad, lipiidid ja organelid. Seejärel järk-järgult pöördeid (kuni 100 000 xg) suurendades sadenevad lahusest valgud [59]. Lahusest mitte-valguliste ja valguliste ühendite eraldamiseks kasutatakse sadestamist, milleks enim kasutatud soolaks on ammooniumsulfaat [65]. Ammooniumsulfaat vähendab valgu ja vee molekuli vahelisi interaktsioone, mis põhjustab valgu sadenemist. Valgud sadenevad nende hüdrofoobsete omaduste põhjal, mida hüdrofoobsem on valk, seda madalama ammooniumsulfaadi kontsentratsiooni juures toimub sadenemine. Välja sadenenud valgud eraldatakse tsentrifuugimisel ning soola kontsentratsiooni lahuses tõstetakse seni, kuni uuritav valk sadeneb. Soola eraldamiseks proovist kasutatakse dialüüsi või geelfiltratsiooni.

Puhastamise viimaseks etapiks on valkude eraldamine nende füüsikaliste omaduste põhjal kasutades erinevaid vedelikkromatograafia meetodeid [59]. Geelfiltratsioon põhineb molekulide eraldamisel nende molekulmassi alusel. Kolonnis olevad molekulid elueeritakse nende molekulmassi kahanemise järjekorras [59,67,68]. Ioonvahetuskromatograafia eraldab molekulid nende laengute alusel, põhinedes laengut omavate valkude ja vastaslaengut omava ligandi interaktsioonidel. Esmalt pestakse kolonnist välja statsionaarse faasiga mitteseostunud osakesed ja seejärel elueeritakse ligandiga seondunud valgud rakendades pH või soola gradienti. Ioonvahetuskromatograafia võimaldab lahutada komplektseid proove, kontsentreerida proove ning vabaneda laetud lisanditest (näiteks ioonsed detergendid) [59,69,70]. Afiinsuskromatograafia põhineb valgu ja selle spetsiifilise ligandi interaktsioonidel, näiteks antikeha-antigeeni vahelised interaktsioonid. Meetodit kasutatakse spetsiifilise biomolekuli eraldamiseks segudest. Afiinsuskromatograafia on kõrge selektiivsusega ja resolutsiooniga eraldusmeetod [59,71]. Kromatograafilise meetodi efektiivsus sõltub proovis sisalduvatest osakestest, vastavalt millele valitakse puhastamiseks ioonvahetus-, afiinsus- ja/või geelkromatograafia.

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Kasutatud reaktiivid

Kaaliumdivesinikfosfaat KH_2PO_4 (AppliChem, Lot nr 8L000272, min. 99,5%)

Kaaliumhüdrosiid KOH (AppliChem, Lot nr 0W006913, min. 85%)

Ammooniumsulfaat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (AppliChem, Lot nr 1E006739, min. 99,5%)

Triton X-100 (Ferak Berlin)

D(+)-galaktoos $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Applichem, Lot nr 5W012139, min. 98%)

L(+)-laktaat $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (AppliChem, Lot nr 6B009336, 90%)

Kaaliumkloriid KCl (AppliChem, Lot nr 4Z011388, min. 99,5%)

Galaktoosi oksüdaas (EC 1.1.3.9, Worthington BioChemical Corp. U.S.A., Lot nr 48P10945YH, *Dactylium dendroides*, 65 U/mg)

Laktaadi oksüdaas (EC 1.13.12.4, Sigma, Lot nr S45938-038, *Pediococcus species*, 50 U/mg)

Termofiilne jogurtikultuur YC-X11 (Chr-Hansen, 50 U)

Luria-Bertani (LB) vedelsööde 2%-line (1% trüptooni, 1% NaCl, 0,5% pärmiekstrakti)

Sephacryl S-200 (GE Healthcare) geelkolonni kalibreerimiseks kasutatud markerained:

Dekstraansinine (Reanal, Ungari)

Ovalbumiin (EC 232-692-7, Sigma, $\geq 97\%$, eraldatud munavalgest)

Glükoosi oksüdaas (EC 1.1.3.4, Sigma, Lot nr 079K7450V, *Aspergillus niger*, 17300 U/g)

Veise seerumi albumiin (BSA) (EC 232-936-2, Sigma, $\geq 98\%$, eraldatud veise vereseerumist)

Katalaas (EC 1.11.1.6, Sigma, Lot nr 54H7060, eraldatud veise maksast, 2700 U/g)

Trüpsiin (EC 3.4.21.4, Sigma, Lot.nr 22K7268, eraldatud sea pankreasest, 1120 U/mg)

Kaaliumdikromaat $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Reachim, Venemaa)

2.2 Lahuste valmistamine

Laktaadi oksüdaasi (LOD) aktiivsuse määramiseks valmistati 3 mM laktaadi lahus 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvrise (pH 6,5). Galaktoosi oksüdaasi (GAO) aktiivsuse määramiseks valmistati 50 mM galaktoosi lahus 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvrise (pH 6,5). 100 U/ml galaktoosi oksüdaasi ja 3,0 U/ml laktaadi oksüdaasi lahused valmistati 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvrise (pH 6,50), mis säilitati -18°C juures, mõõtmiste jaoks need sulatati ja hoiti +4°C juures.

Puhverlahuse valmistamiseks kasutati Milli Q vett (Millipore, Inc.) ja lahuse pH kontrolliti $\pm 0,02$ ühiku täpsusega. Reagentide kaalumiseks kasutati analüütilist kaalu täpsusega $\pm 0,01$ mg. Puhver- ja substraatide lahuseid säilitati +4°C juures.

2.3 Ensüümide aktiivsuste mõõtmiste aparatuur ja meetodika

Ensüümide aktiivsuste määramiseks viidi läbi mõõtmised amperomeetrilise Clark'i tüüpi hapnikuanduriga, mille abil jälgiti ensüümide poolt katalüüsitud reaktsioonide käigus muutuvat lahustunud hapniku kontsentratsiooni. Clark'i hapnikuandur töötab galvaanielemendina, mille katoodiks on anduri korpusele keritud kroom-nikkeltraat, mis on kaetud polümeerse kilega ja aniooniks on pressitud kaadmiumilaastud.

Ensüümide eriaktiivsuste mõõtmiseks kasutati 30 ml õhukindlat termostateeritud (37 °C) klaasist mõõterakku, kus toimus reaktsioonisegu ühtlane segamine magnetsegajal. Hapnikuandur viidi mõõterakus olevasse mõõtelahusesse, mida eelnevalt küllastati õhuhapnikuga ja oodati väljundvoolu stabiliseerumist. Seejärel süstiti 300 µl proovi või vajalik kogus ensüüm mõõterakku ja alustati väljundsignaali mõõtmist. Proovis sisalduv ensüüm põhjustab lahuses oleva hapniku kontsentratsiooni vähenemist. Amperomeetriline hapnikuandur oli ühendatud arvutiga, mis registreeris signaali muutuse ajas ja võimaldas andmeid koheselt töödelda. Galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi eriaktiivsuste arvutamiseks koostati kalibratsioonigraafikud. Kõik mõõtmised viidi läbi 37°C juures.

2.4 Reaktsiooni iseloomustavate parameetrite arvutamine

Hapnikuanduri väljundsignaal registreeriti 0,5-sekundilise intervalliga. Mõõtmise tulemusena saadud eksperimentaalne kõver sisaldas vähemalt 4000 andmepunkti, mida normaliseeriti ning keskmistati üle 20, et vähendada süsteemist tulevate mürade osakaalu. Saadud andmete töötlemiseks ja arvutamiseks kasutati programme Sigmaplot® 13.0 (SPSS Software, USA) ja Microsoft Excel 2013.

Hapnikuanduri väljundvoolu muutumise ΔI iseloomustamiseks ja tulemuste arvutamiseks kasutati võrrandit:

$$\Delta I = \frac{I_0 - I_t}{I},$$

kus I_0 on hapnikuanduri väljundsignaal ajahetkel $t=0$, I_t on hapnikuanduri väljundsignaal ajahetkel t .

2.5 Ensüümide eraldamine ja puhastamine

2.5.1 Jogurtkultuuri YC-X11 kasvatamine

Jogurtikultuur YC-X11 (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*) kasvatati 2%-lises Luria-Bertani (LB) vedelsöötmele, mis sisaldas 0,5% pärmiekstrakti, 1% trüptooni ja 1% NaCl. Jogurtikultuuri kasvatamiseks lisati 600 mg YC-X11 juuretisele 60 ml LB söödet (10 mg/ml) ja inkubeeriti vesitermostaadis 37°C juures 24 tundi. Kasvatatud mikroorganismid sadestati tsentrifuugimisel 700 xg 15 minutit 4°C juures, sademelt eraldati lahus (sööde). Sade lahustati külmas 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvril pH 6,50.

2.5.2 Ensüümide puhastamine baktermassist ja nende iseloomustamine

Bakterimass homogeniseeriti, selleks kasutati kahte meetodit: rakukestade lõhustamist ultrahelisonniga ja rakumembraani lüüsimist mitte-ioonse detergendiga. Rakukestade lõhkumiseks ultrahelisonniga kasutati tsükli intensiivsust 7/10 ja võimsust 90% 5 minuti jooksul. Ultrahelisonniga rakukestade lõhkumine viidi läbi vesivannil. Mitte-ioonse detergendina kasutati Triton X-100, rakumembraanide lüüsimiseks lisati Triton X-100 0,015% proovi ruumalast. Detergendi mõju uuriti erinevatel inkubeerimise aegadel: 30 min ja 1 tunni jooksul. Peale baktermassi töötlemist eraldati sade tsentrifuugimise teel 15 000 xg 15 minutit 4°C juures. Edasine töö viidi läbi ekstraktiga.

Proovis leiduvate ensüümide edasiseks puhastamiseks ja iseloomustamiseks kasutati vedelikkromatograafiat (ÄKTA Purifier 10). Valkude detekteerimiseks mõõdeti eluaadi neelduvust (lainepikkusel 280 nm) ja lahuse elektrijuhtivust.

Ioonvahetuskromatograafia läbiviimiseks kasutati eeltäidetud DEAE (dietüülaminoetüül) FF 16/10 Sepharose anioonvahetuskoloni ($\varnothing=1,6$ cm, h=10 cm), mida voolutati 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvriga (pH 6,50) viiekordse koloni ruumala (CV) ulatuses voolukiirusel 0,4 ml/min. Proov sisestati ja statsionaarse faasiga mitteseostunud osakesed

eraldati kolonnist 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvriga (pH 6,50) (3 CV). Statsionaarse faasiga seostunud valkude elueerimiseks tekitati segmenteeritud gradient 1,1 M KCl lahusega (0,1 M kaaliumfosfaatpuhvris). Gradient koosnes kolmest segmendist: astmeline 0-30% 3 CV; lineaarne 30-45% 3 CV; ning lõpuks lineaarne 45-90% 4 CV. Kolonnist elueeritud fraktsioonid koguti 5 ml kaupa ja neis määrati ensüümide aktiivsused.

Uuritavate ensüümide molekulmasside määramiseks kasutati geelkromatograafiat. Selleks kasutati Sephacryl S-200 kolonni ($\varnothing=1,6$ cm, $h=12,3$ cm), mida voolutati 0,1 ml/min 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvriga (pH 6,50) 5 CV. Kolonni kalibreerimiseks kasutati markerainetena dekstraansinist (2000 kDa), katalaasi (240 kDa), glükoosi oksüdaasi (160 kDa), veise seerum albumiini (BSA) (dimeer 132 kDa, monomeer 66 kDa), ovalbumiini (42,7 kDa), trüpsiini (23,3 kDa) ja kaaliumdikromaati (294 Da). Koostatud kalibreerimisgraafiku lineaarsest osast leiti puhastatud ensüümide molekulmassid. Kolonnist elueeritud fraktsioonid koguti 1 ml kaupa ja neis määrati uuritavate ensüümide aktiivsused.

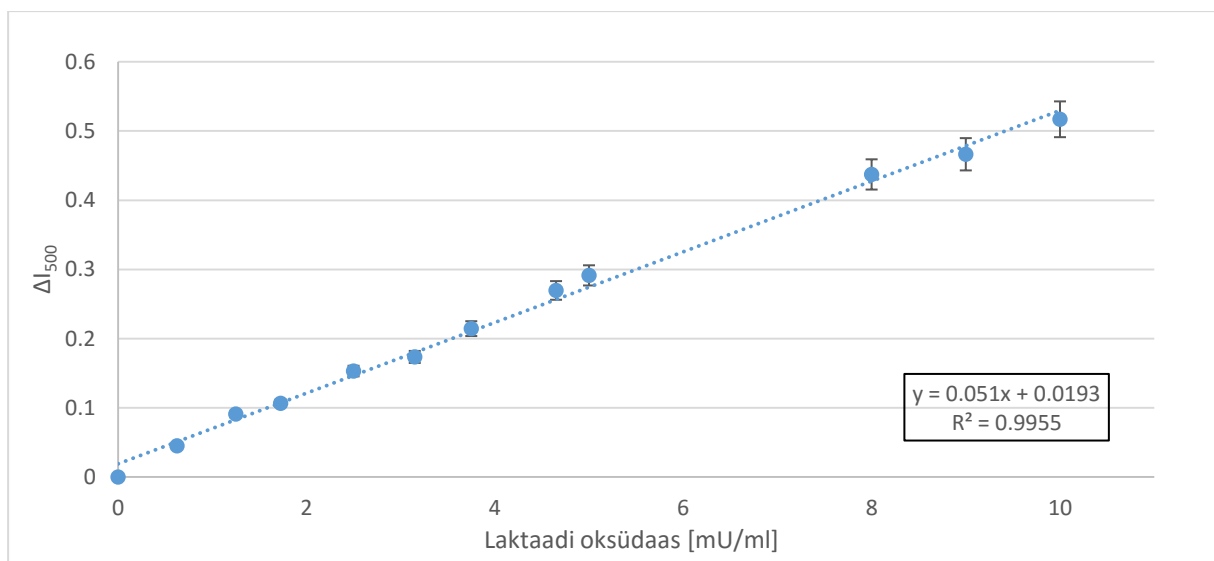
Ensüümide koguaktiivsused määrati igas puhastusetapis ning saagiste arvutamisel võeti maksimaalseks väärtuseks ööpäeva kasvanud bakterikultuuris mõõdetud ensüümide koguaktiivsused.

3. Tulemused ja arutelu

3.1 Laktaadi ja galaktoosi oksüdaaside aktiivsuste määramine

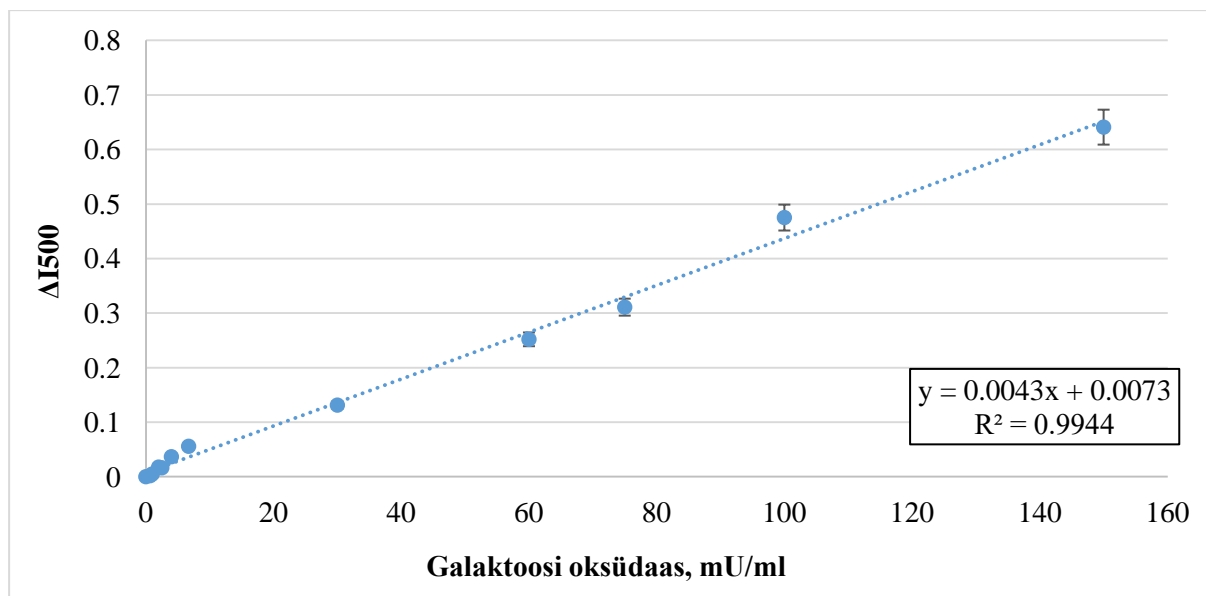
Oksüdaaside aktiivsuste määramiseks koostati esmalt kalibreerimisgraafikud, mille lineaarset osa kasutati ensüümide aktiivsuste määramiseks proovides.

Laktaadi oksüdaasi aktiivsuse määramiseks koostatud kalibreerimisgraafik (joonis 4) oli lineaarne kuni ensüümi kontsentratsioonini $10 \pm 0,15$ mU/ml, madalaim mõõdetud ensüümi kontsentratsioon oli $0,63 \pm 0,15$ mU/ml. Lineaarse osa tõus avaldub valemist $y = 0,051x + 0,0193$.



Joonis 4. Hapniku kontsentratsiooni muutuse parameetri sõltuvus laktaadi oksüdaasi kontsentratsioonist. Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 37°C 3 mM laktaadi lahuses, mis oli valmistatud 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvrisse (pH 6,50).

Galaktoosi oksüdaasi aktiivsuse määramiseks koostatud kalibreerimisgraafiku (joonis 5) lineaarne osa oli kuni ensüümi kontsentratsioonini $150 \pm 0,07$ mU/ml, madalaim mõõdetud ensüümi kontsentratsioon oli $0,67 \pm 0,07$ mU/ml. Lineaarse osa tõus avaldub valemist $y = 0,0043x + 0,0073$.



Joonis 5. Hapniku kontsentratsiooni muutuse parameetri sõltuvus galaktoosi oksüdaasi kontsentratsioonist. Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 37°C 50 mM laktaadi lahuses, mis oli valmistatud 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvrise (pH 6,50).

3.2. Ensüümide puhastamisetapid jogurtikultuurist YC-X11

3.2.1. Jogurtikultuuri YC-X11 kasvatamine

Jogurtikultuuri YC-X11 kasvatati erinevatel algkontsentratsioonidel (10 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml) 2%-lises Luria-Bertani vedelsöötmele 37°C juures 24h, et leida optimaalne algkontsentratsioon. Proovides mõõdeti hapnikutarve enne kasvamist ja peale kasvamist. Bakterikultuuri efektiivseimaks külvi algkontsentratsiooniks saadi 10 mg/ml, sest antud kontsentratsioonil oli saagise protsent kõige suurem: laktaadi oksüdaadi koguaktiivsus suurenes bakterite kasvu käigus 82±2% ja galaktoosi oksüdaasil 81±3%. Kontsentratsioonil 30 mg/ml ja 50 mg/ml saadi ensüümide aktiivsuse suurenemiseks vastavalt 70±2% ja 40±3%.

3.2.2. Bakterikultuuri homogeniseerimine

Õöpäeva kasvatatud bakterikultuur homogeniseeriti. Esmalt kasutati homogeniseerimiseks ultrahelisondi. Nii galaktoosi oksüdaasi kui laktaadi oksüdaasi koguaktiivsus proovis oli peale homogeniseerimist 13±3%. Seejärel uuriti bakterikultuuri rakukestade purustamise võimalust detergendiga, milleks kasutati Triton X-100 kontsentratsiooniga 0,015%. Triton X-100 kriitiline kontsentratsioon on 0,0155% (0,24 mM),

millest kõrgematel kontsentratsioonidel hakkab detergent moodustama mitselle ning detergendi eraldamine on komplitseeritud.

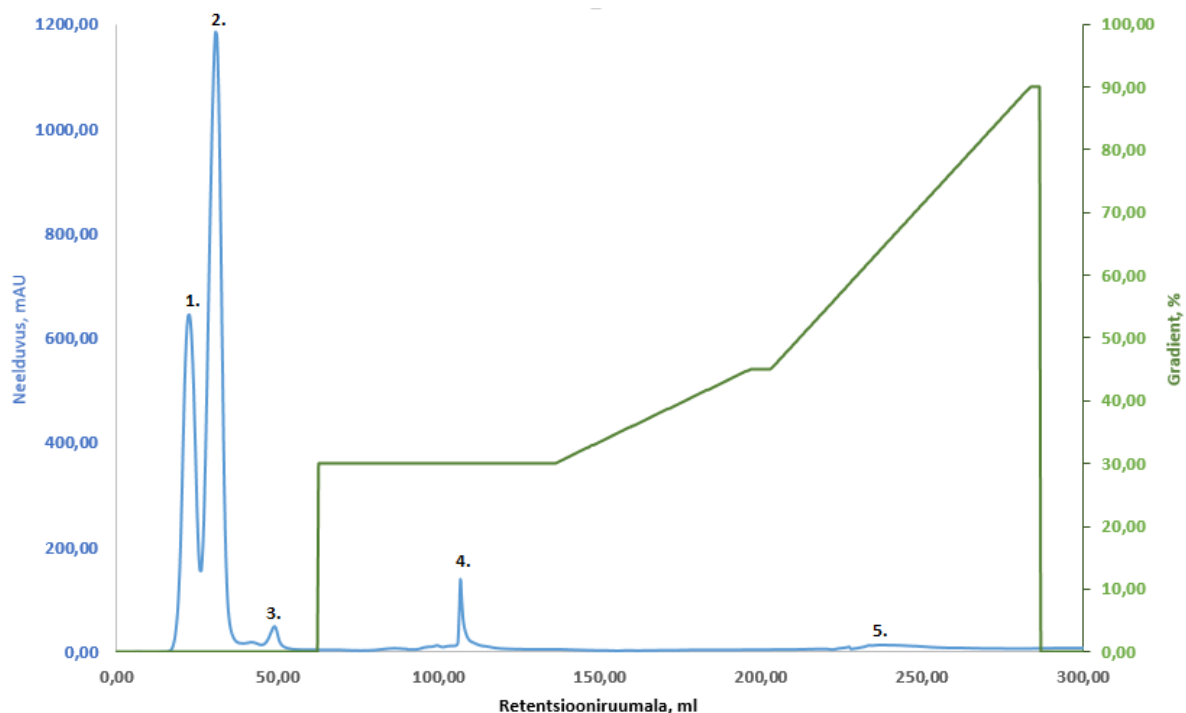
Kui detergendiga inkubeerimise aeg oli 30 minutit, oli galaktoosi oksüdaasi saagis $30\pm 1\%$ ja laktaadi oksüdaasil $23\pm 2\%$. Ühe tunni möödudes saadi ensüümide saagisteks $34\pm 2\%$. Edasipidi inkubeeriti proove detergendiga 1 tund. Rakukestad sadestati tsentrifuugimisel $15\ 000\ \text{xg}$ 15 minutit 4°C juures, sademelt eraldati lahus ning sade lahustati külmas $0,1\ \text{M}$ kaaliumfosfaatpuhvrise (pH 6,50). Eraldatud lahuses mõõdetud ensüümide koguaktiivsuse saagis oli $7\pm 1\%$. Kuigi sademes olid mõlema ensüümi koguaktiivsused kõrgemad kui lahuses, siis sade sisaldas lisaks ensüümidele ka purustatud rakukestasid, mistõttu kasutati edasises töös saadud ekstrakti.

Uuritud meetoditest saavutati paremad tulemused $0,015\%$ Triton X-100 kasutades 1 tunni jooksul. Ensüümide edasiseks puhastamiseks süstiti saadud ekstrakt otse ÄKTA'sse.

3.2.4. Ensüümide puhastamine ioonvahetuskromatograafia abil

Ioonvahetuskromatograafia läbiviimiseks DEAE FF 16/10 Sepharose anioonvahetuskolonniga tekitati ensüümide eraldamiseks gradient $1,1\ \text{M}$ KCl lahusega (valmistatud $0,1\ \text{M}$ kaaliumfosfaatpuhvrise, pH 6,50). Optimaalse gradiendi leidmiseks optimeeriti erinevaid tingimusi. Esmalt tekitati lineaarne gradient $1,1\ \text{M}$ KCl lahusega 0-90% 15 CV jooksul voolukiirusel $0,2\ \text{ml/min}$. Lineaarne gradient ei osutunud selektiivseks. Saadud tulemuste põhjal muudeti meetodit ning tekitati kolme osaline segmenteeritud gradient: astmeline 0-45% 2 CV, lineaarne 45-90% 8 CV ja lineaarne 90-100% 5 CV. Voolukiirus jäeti esmalt samaks $0,2\ \text{ml/min}$. Galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi leidis mitmes fraktsioonis. Seejärel muudeti taas gradienti: astmeline 0-30% 3 CV, lineaarne 30-45% 3 CV ja lineaarne 45-90% 4 CV ning ka voolukiirust, $0,4\ \text{ml/min}$. Lisaks muudeti katse läbiviimise temperatuuri (toatemperatuurilt 10°C peale), seda selleks, vähendada temperatuurist tingitud ensüümide inaktiveerumist ajas. Saadud kromatogrammi on esitatud joonisel 6.

Galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi aktiivsused olid kõige suuremad fraktsioonis nr 4, mis sisaldas $10,18\ \text{U-d}$ galaktoosi oksüdaasi ja $0,51\ \text{U-d}$ laktaadi oksüdaasi. Fraktsioonid 1-3 sisaldasid kolonniga mitteseostunud osakesi (näiteks aminohapped, Triton X-100). Kõikide puhastusetaapide saagised on esitatud tabelis 3.



Joonis 6. Ioonvahetuskromatograafia ensüümide galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi eraldamiseks DEAE FF 16/10 Sefaroos kolonniga. Elueerimispuhvriks oli 0,1 M kaaliumfosfaatpuhver (pH 6,50) ja gradient tekitati 1,1 M KCl (0,1 M kaaliumfosfaatpuhvris, pH 6,50). Voolukiirus 0,4 ml/min ja töötemperatuur 10°C. Sinine joon on neeldumine lainepikkusel 280 nm, roheline joon kirjeldabioonset jõudu. Numbrid tähistavad fraktsioone, milles määrati ensüümide koguaktiivsused.

Tabel 3. Galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi koguaktiivsused protsentides erinevatel puhastusetappidel.

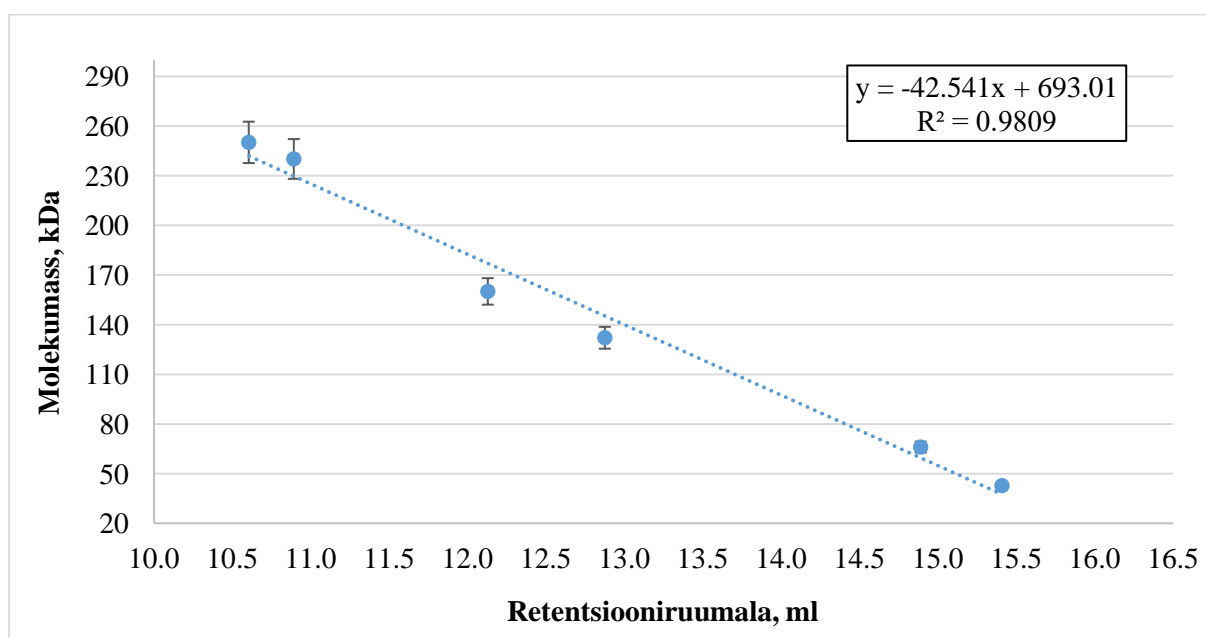
	Galaktoosi oksüdaas	Laktaadi oksüdaas
	Saagis, %	Saagis, %
Bakterite külv (ennem kasvatamist)	19 ± 3	18 ± 2
Bakterisuspensioon (peale kasvatamist)	100	100
Sade peale tsentrifugimist	43 ± 2	45 ± 2
Sade peale 0,015% Triton X-100 töötlemist	34 ± 1	34 ± 1
Lahus peale 0,015% Triton X-100 töötlemist	8 ± 1	7 ± 1
Ioonvahetuskromatograafia	7 ± 1	6 ± 1

Peale tsentrifugimist jäi sademesse (bakterisuspensioon) GAO $43\pm 2\%$ ja LOD $45\pm 2\%$; 0,015% Triton X-100 töötlemisel 1 tunnise inkubeerimisajaga jäi lahusesse vaid $8\pm 2\%$ GAO ja $7\pm 1\%$ LOD, ülejäänud ensüüm jäi sademesse koos rakukestade ja –membraanidega. Peale ionvahetuskromatograafiat oli galaktoosi oksüdaasi saagis $7\pm 1\%$ ja laktaadi oksüdaasil $6\pm 1\%$, mis on väga madalad võrreldes kirjanduse andmetega. Edaspidi tuleks ensüümide puhastamisel optimeerida Triton X-100 töötlemise parameetreid ja ionvahetuskromatograafia läbiviimist (voolukiirus, gradient).

3.2.3. Molekulmassi määramine

Proovis leiduvate ensüümide molekulmasside määramiseks kasutati Sephacryl S-200 täidetud kolonni. Sephacryl S-200 täidis on võimeline efektiivselt eraldama molekulmasse vahemikus 250 kuni 5 kDa. Sephacryl S-200 täidetud kolonni kalibreerimiseks kasutati erinevate molaarmassidega markeraineid. Kalibreerimisgraafik on toodud joonisel 7 (trüpsiin molekulmassiga 23,3 kDa jäi lineaarsest alast välja) Lisaks kalibreerimisgraafiku koostamiseks kasutatud markerainetele kasutati kolonni maksimaalse läbivooluruumala leidmiseks dekstraansinist, molekulmassiga 2000 kDa ja dikromaati, mille molekulmass on 294 Da.

Kalibratsioonigraafiku lineaarne osa jäi vahemikku 42,7-250 kDa ja lineaarse osa tõus avaldub valemist $y = -42,541x + 693,01$.



Joonis 7. Sephacryl S-200 kolonni kalibreerimisgraafik molekulmassi määramiseks. Sephacryl S-200 täidetud kolonn, voolukiirusel 0,1 ml/min. Markerained määrati neeldumise järgi lainepikkused 280 nm. Markerainetena kasutati dekstraansinine (2000 kDa), katalaasi (240 kDa), glükoosi oksüdaasi (160 kDa), BSA'd (veise seerumi albumiini, dimeer 132 kDa, monomeer 66 kDa), ovalbumiini (42,7 kDa).

Kalibreerimisgraafiku abil määratud molekulmass 148 ± 15 kDa võib vastab galaktoosi oksüdaasi dimeerile. Laktaadi oksüdaasi molekulmassiks määrati 250 ± 20 kDa. Metoodika, mida kasutati geelkromatograafia läbiviimiseks ei osutunud piisavalt selektiivseks, mistõttu tuleks edaspidi metoodikat mõnevõrra muuta, näiteks tõsta voolukiirust, vahetada välja kolonni maatriks.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli eraldada ja puhastada jogurtikultuurist YC-X11 ensüümid galaktoosi oksüdaas (EC. 1.1.3.9) ja laktaadi oksüdaas (EC.1.13.12.4). Jogurtikultuuris sisalduvaid baktereid (*S. thermophilus* ja *L. bulgaricus*) kasvatati ööpäeva 37°C juures ja bakterirakud sadestati tsentrifuugimisel. Rakukestade lõhkumiseks kasutati 0,015% Triton X-100 ja rakukestadest vabaneti tsentrifuugimise teel. Saadud ekstrakt sisestati DEAE FF 16/10 ioonvahetuskromatograafiasse. Ensüümide puhastamiseks optimeeriti ioonvahetuskromatograafia läbiviimise tingimusi.

Galaktoosi oksüdaas ja laktaadi oksüdaas elueerusid kolonnist ühe faktsiooninaku puhverlahuse ioonne jõud oli 0,66 M. Nende ensüümide eraldamiseks tuleks edaspidises uurimistöös kasutada proovide elueerimiseks kolonnist KCl astmelise gradiendi asemel lineaarset gradienti.

Ensüümide aktiivsused määrati iga puhastusetapi järel amperomeetrilise Clark'i tüüpi hapnikuanduriga eelnevalt koostatud kalibreerimisgraafikute alusel. Kogu puhastamisprotsessi saagiseks saadi galaktoosi oksüdaasil 7% ja laktaadi oksüdaasil 6%.

Kasutatud kirjandus

1. <http://www.brenda-enzymes.org/> viimati uuendatud 06.01.2016
2. P. A. Frey, A. D. Hegeman. Enzymatic reaction mechanisms. Oxford University Press, New York , 2007, p. 710.
3. H. U. Bergmeyer. Methods of analysis, Vol 4, Academic Press, Inc., New York and London, 1974, p. 2179.
4. I. Leiros, E. Wang, T. Rasmussen, E. Oksanen, H. Repo, S. B. Petersen, P. Heikinheimo, E. Hough, The 2.1 Å structure of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase (LOX). Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications. 62 (2006) 1185.
5. I. Taurino, R. Reiss, M. Richter, M. Fairhead, L. Thöny-Meyer, G. De Micheli, S. Carrara, Comparative study of three lactate oxidase from *Aerococcus viridans* for biosensing applications. Electrochimica Acta 93 (2013) 72.
6. Asahi Kasei Pharma Corporation, http://www.asahi-kasei.co.jp/shindan/pdf/T-47_catalog.pdf viimati alla laetud 11.05.2016
7. P. A. Sullivan, Crystallization and properties of L-lactate oxidase from *Mycobacterium smegmatis*. The Biochemical Journal 110 (1968) 363.
8. D. A. Giegel, V. Massey, C. H. Williams Jr., L-lactate-2-monooxygenase, sequence of peptides containing residues modified by 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. The journal of Biological Chemistry 262 (1987) 5705.
9. C. Gao, J. Qiu, C. Ma, P. Xu, Efficient production of pyruvate from DL-lactate by the lactate-utilizing strain *Pseudomonas stutzeri* SDM. PLoS One 7 (2012) e40755.
10. L. Rassaei, W. Olthuis, S. Tsujimura, E.J.R. Sudhölter, A. van den Berg, Lactate biosensors: current status and outlook. Analytical and Bioanalytical Chemistry 406 (2014) 123.
11. A. Sillero, A. Maldonado, Isoelectric point determination of proteins and other macromolecules: oscillating method. Computers in Biology and Medicine 36 (2006) 157.
12. Toyobo Enzymes Diagnostic Reagent Grade, http://www.toyobo-global.com/seihin/xr/enzyme/pdf_files/2010_189_192_LCO_301.pdf viimati alla laetud 11.05.2016

13. H. Taniai, K. Iida, M. Seki, M. Saito, S. Shiota, H. Nakayama, S. Yoshida, Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of *Streptococcus pneumoniae*: Role of lactate as an energy source. *Journal of Bacteriology* 190 (2008) 3572.
14. J. Gu, P. Xu, Y. Qu, A biocatalyst for pyruvate preparation from DL-lactate: lactate oxidase in a *Pseudomonas* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 18 (2002) 299.
15. M. B. Kupletskaya, M. V. Sukacheca, A. V. Kurakov, A. I. Netrusov, Search for lactate oxidase producer microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43 (2007) 178.
16. O. Barre, F. Mourlane, M. Solioz, Copper induction of lactate oxidase of *Lactococcus lactis*: A novel metal stress response. *Journal of Bacteriology* 189 (2007) 5947.
17. S.A. Streitenberger, J.A. Lopez-Mas, A. Sanchez-Ferrer, F. Gacia-Carmona, Use of dye affinity chromatography for the purification of *Aerococcus viridans* lactate oxidase. *Biotechnology Progress* 18 (2002) 657.
18. H. Sztajer, W. Wang, H. Lünsdorf, A. Stocker, Purification and some properties of a novel microbial lactate oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45 (1996) 600.
19. P. Xu, C. Ma, Q. Qi, Y. Shen, Y. Qu, Studies on the lactate oxidase producing conditions by *Edwardsiella tarda*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 39 (1999) 137.
20. M. Seki, K. Iida, M. Saito, H. Nakayama, S. Yoshida, Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: Involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. *The Journal of Bacteriology* 186 (2004) 2046.
21. B. Unterweger, T. Stoisser, S. Leitgeb, R. Birner-Grünberger, B. Nidatzky, Engineering of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase for site-specific PEGylation: characterization and selective bioorthogonal modification of a S218C mutant. *Bioconjugate Chemistry* 23 (2012) 1406.
22. J. D. Duncan, J. O. Wallis, M. R. Azari, Purification and properties of *Aerococcus viridans* lactate oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 146 (1989) 919.
23. P. Xu, T. Yano, K. Yamamoto, H. Suzuki, H. Kumagai, Characterization of a lactate oxidase from a strain of gram negative bacterium from soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 56 (1996) 277.

24. S.A. Streitenberger, J.A. Lopez-Mas, A. Sanhcez-Ferrer, F. Garcia-Carmona, Non-linear slow-binding inhibition of *Aerococcus viridans* lactate oxidase by Cibarcon Ble 3GA. *Journal of Enzyme Inhibition* 16 (2001) 301.
25. H. B Gray, W. R. Ellis, Jr., Electron Transfer. http://authors.library.caltech.edu/25052/7/BioinCh_chapter6.pdf viimati alla laetud 25.05.2016.
26. J.W. Whittaker, The radical chemistry of galactose oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433 (2005) 227.
27. S.J. Firbank, M.S. Rogers, C.M. Wilmot, D.M. Dooley, M.A Halcrow, P.F. Knowles, M.J. McPherson, S.E. Phillips, Crystal structure of the precursor of galactose oxidase: An unusual self-processing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98 (2001) 12932.
28. S.J. Firbank, M. Rogers, R. Hurtado-Guerrero, D.M. Dooley, M.A. Halcrow, S.E.V. Phillips, P.F.Knowles, M.J. McPherson, Enzyme mechanism – a structural perspective. Cofactor proceccing in galactose oxidase. *Biochemical Society Transactions* 31 (2003) 506.
29. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/> viimati uuendatud 01.04.2015
30. E. P. Lino Gasparotto, S. C. Garrard Abrão, S. Y. Inagaki, D. J. Tessmann, C. Kimmelmeier, I. P. B. Tessmann, Production and characterization of galactose oxidase produced by four isolates of *Fusarium graminearum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49 (2006) 557.
31. S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, I. A. Yaropolov, J. W. Whittaker, L. Gorton, Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 2517.
32. W. J. Sung, Y. H. Bae, Glucose oxidase, lactate oxidase, and galactose oxidase enzyme electrode based on polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant. *Sensors and Actuators B: Chemical* 114 (2006) 164.
33. E. M. Goudsmit, F. Matsuura, D. A. Blake, Substrate Specificity of D-galactose oxidase, evidence for the oxidation of internally linked galactosyl residues of helix pomatia galactogen. *The Journal of Biological Chemistry* 259 (1984) 259.
34. S.K. Sharma, A. Kumar, R. Chaudhary, Suman, SC. Pundir, N. Sehgal, Lactose biosensor based on lactate and galactose oxidase immobilized in polyvinyl formal. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* 35 (2007) 421.

35. E. Cevik, M. Segal, M. A. Abasiyanik, Construction of biosensor for determination of galactose with galactose oxidase immobilized on polymeric mediator contains ferrocene. *Current Applied Physics* 10 (2010) 1313.
36. H. Roth, S. Segal, D. Bertoli, The quantitative determination of galactose- An enzymic method using galactose oxidase, with applications to blood and other biological fluids. *Analytical Biochemistry* 10 (1965) 32.
37. R. Paukner, P. Staudigl, W. Choosri, D. Haltrich, C. Leitner, Expression, purification, and characterization of galactose oxidase of *Fusarium sambucinum* in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* 108 (2015) 73.
38. D. Alberton, L. Silva de Oliveira, R. M. Peralta, I. P. Barbosa-Tessmann, Production, purification, and characterization of a novel galactose oxidase from *Fusarium acuminatum*. *Journal of Basic Microbiology* 47 (2007) 203.
39. C.F. Mazitsos, D.J. Rigden, P.G. Tsoungas, Y.D. Clonis, Galactosyl-biomimetic dye-ligands for the purification of *Dactylium dendroides* galactose oxidase. *A Journal of Chromatography* 954 (2002) 137.
40. R. Paukner, P. Wührer, W. Choosri, D. Haltrich, C. Leitner, Enhanced production of recombinant galactose oxidase from *Fusarium graminearum* in *E. coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (2011) 1349.
41. A. M. Pereira, C. Kimmelmeier, Production of mycotoxins by galactose oxidase producing *Fusarium* using different culture media. *Brazilian Journal of Microbiology* 31 (2000) 129.
42. M. J. McPherson, Z. B. Ogel, C. Stevens, k. D. S. Yadav, J. N. Keen, P. F. Knowles, Galactose oxidase of *Dactylium dendroides*. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1992) 8146.
43. D. Amaral, L. Bernstein, D. Morse, L. Horecker, Galactose oxidase of *Polyporus circinatus*: A copper enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (1963) 2281.
44. G.T. Zanzan, M.H. Mendonca. Purification and characterization of intracellular galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 252 (1987) 507.
45. K. Aisaka, O. Terada. Purification and properties of galactose oxidase from *Gibberella fujikuroi*. *Agricultural and Biological Chemistry* 46 (1982) 1191.
46. <http://milkfacts.info/Milk%20Processing/Yogurt%20Production.htm> viimati alla laetud 25.05.2016

47. J. Süle, T. Kőrösi, A. Hucker, L. Varga, Evaluation of culture media for selective enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 45 (2014) 1023.
48. WMA. Mullan, Microbiology of starter cultures. <https://www.dairyscience.info/index.php/cheese-starters/49-cheese-starters.html> viimati uuendatud 02.2016
49. C. Delorme, Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology* 126 (2008) 274.
50. V. Michel, F.G. Martley, *Streptococcus thermophilus* in Cheddar sheese- production and fate of galactose. *Journal of Dairy Research* 68 (2001) 317.
51. Joint Genome Institute. <http://genome.jgi.doe.gov/strth/strth.home.html> viimati alla laetud 25.05.2016.
52. Dairy Connection Inc., <https://www.dairyconnection.com/Page3.html> viimati alla laetud 25.05.2016
53. A. H., Soomro, K. Manwaar, Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health- A review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1 (2002) 20.
54. L.C. Radke-Michelle, W.E. Sandine, Influence of temperature on the associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Science* 68 (1986) 2558.
55. C. Beal, P. Louvet, G. Corrieu, Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32 (1989) 148.
56. <http://www.bio.davidson.edu/genomics/2008/Simpson/Summary.html> viimati alla laetud 25.05.2016.
57. C. Tari, F.I. Ustok, S. Harsa, Production of food grade beta-galactosidase from artisanal yogurt strains. *Food Biotechnology* 24 (2010) 78.
58. D. A. Bender. The virtual laboratory: Enzyme purification. <http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzpur/enzypur.htm> viimati alla laetud 25.05.2016
59. GE Healthcare, Handbook, Strategies for protein purification, 2010.
60. J.M. Berg, J.L. Tymocko, L Stryer, The purification of proteinsi an essential first step in understanding their function. *Biochemistry* 5th edition. 2002 New york.
61. <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/DOWNSTREAM/disrupt.htm> viimati uuendatud 03.06.1996

62. <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/traditional-methods-cell-lysis.html> viimati alla laetud 25.05.2016.
63. D.W. Burden. Guide to the disruption of biological samples <http://www.opsdiagnostics.com/applications/samplehomogenization/homogenizationguides/depart4.html> viimati alla laetud 25.05.2016
64. https://proteomicsresource.washington.edu/docs/protocols03/Thermo_TechTip19_Detergent_Removal.pdf viimati alla laetud 11.05.2016
65. Amersham Pharmacia Biotech AB, Handbook, Protein purification handbook, 1999
66. GE Healthcare, Handbook, Protein sample preparation, 2010.
67. Amersham Biosciences AB, Gel filtration principles and methods, Handbook, 2002.
68. GE Healthcare, Handbook, Size exclusion chromatography, 2010.
69. Pharmacia Biotech, Handbook, Ion exchange chromatography, principles and methods, 2002.
70. GE Healthcare, Handbook, Ion exchange chromatography, 2010.
71. GE Healthcare, Handbook, Affinity chromatography, principles and methods, 2010.

Summary

Purification and separation of galactose oxidase and lactate oxidase

The aim of the present work was to purify galactose oxidase (EC. 1.1.3.9) and lactate oxidase (EC.1.13.12.4) from yoghurt culture YC-X11 (*S. thermophilus* and *L. bulgaricus* bacteria). Galactose oxidase catalyzes the oxidation of D-galactose into D-galacto-hexodialdose and lactate oxidase catalyzes the oxidation of L-lactate into pyruvate. Yoghurt culture YC-X11 has shown activity towards lactate, the reason it was chosen as a starting culture.

The purification of the enzymes included three main steps: the growth of bacteria, the optimisation of the cell culture homogenization method and the optimisation of the purification method using ion-exchange chromatography. The bacteria was grown in LB broth for 24 hours at 37°C and the best method for homogenization the cell culture was the solubilisation of cell membranes with detergent Triton X-100. Enzymes were purified with DEAE FF 16/10 anion-exchange chromatography.

As a result, galactose oxidase yield was 7% and lactate oxidase yield was 6%. Both enzymes were in one fraction after ion-exchange chromatography and were eluted at ionic strength 0.66 M. The method of purification needs to be modified for more effective purification and separation of galactose oxidase and lactate oxidase in the future.

Infoleht

Galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi eraldamine ja puhastamine

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli optimeerida puhastusmeetodeid ensüümide galaktoosi oksüdaasi (EC. 1.1.3.9) ja laktaadi oksüdaasi (EC.1.13.12.4) eraldamiseks ja puhastamiseks jogurtikultuurist YC-X11 (*S. thermophilus* ja *L. bulgaricus*). Bakterikultuuri kasvatati 24 tundi 37°C juures 2%-lises Luria-Bertani (LB) vedelsöötmele, seejärel homogeniseeriti proovi 0,015% Triton X-100 lahusega ning saadud ekstrakt süstiti DEAE FF 16/10 anioonvahetuskolonni. Ensüümide aktiivsuste määramiseks kasutati amperomeetrilist Clark'i tüüpi hapnikuandurit. Galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi saagisteks saadi vastavalt 7% ja 6%. Galaktoosi oksüdaas ja laktaadi oksüdaas elueerusid kolinnist ühe faktsiooninaku puhverlahuse ioonne jõud oli 0,66 M.

Märksõnad: *laktaadi oksüdaas, galaktoosi oksüdaas, jogurtikultuur YC-X11, vedelikkromatograafia*

Purification and separation of galactose oxidase and lactate oxidase

The aim of the present work was to purify galactose oxidase (EC. 1.1.3.9) and lactate oxidase (EC.1.13.12.4) from yoghurt culture YC-X11 (*S. thermophilus* and *L. bulgaricus* bacteria). The bacteria was grown in 2% Luria-Bertani (LB) liquid broth for 24 hours at 37°C and the best method for homogenization the cell culture was detergent Triton X-100. Enzymes were purified with DEAE FF 16/10 anion -exchange chromatography. Galactose oxidase yield was 7% and the lactate oxidase yield was 6%. Both enzymes were in one fraction after ion-exchange chromatography and were eluted at ionic strength 0.66 M.

Keywords: *lactate oxidase, galactose oxidase, yoghurt culture YC-X11, liquid chromatography*

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Merle Muruvee,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi eraldamine ja puhastamine“, mille juhendajad on Kairi Kivirand ja 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 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 26.05.2016