

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Hrachová aminoxidasa a aminy v pivu**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Tereza Smolková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.</b>
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

*Poděkování:*

*Chtěla bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Mgr. Janu Frömmelovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a rady při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. a Mgr. Rostislavu Halouzkovi za vypracování metody pro rychlou detekci koncentrace biogenních aminů v pivních vzorcích pomocí HPLC-MS/MS a jejich následnou analýzu.*

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Smolková
Název práce	Hrachová aminoxidasa a aminy v pivu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Biogenní aminy vznikají především dekarboxylací příslušných aminokyselin a jsou dále oxidovány aminoxidasami (EC 1.4.3.21, EC 1.4.3.22) na příslušné aldehydy. Biogenní aminy se přirozeně vyskytují v potravinách, přičemž jejich množství se může výrazně zvýšit mikrobiální kontaminací. Ve vyšších koncentracích jsou biogenní aminy (zejména histamin a tyramin) toxické.

V rámci experimentální části práce byly vypěstovány hrachové klíčky, z nichž byla následně izolována a purifikována hrachová aminoxidasa (PsAO). Dále byla změřena substrátová specifita PsAO a kinetika reakcí vybraných aminů a směsi aminů, detekována pomocí sprzęžené peroxidasové reakce. Dalším cílem bylo měření koncentrace biogenních aminů ve vzorcích piva za využití aminoxidas, kdy vzorky piva sloužily jako substráty hrachové aminoxidas. Jako referenční metoda pro určení koncentrace biogenních aminů ve vzorcích piv byla použita UHPLC-MS/MS.

Klíčová slova	Hrachová aminoxidasa, biogenní aminy, detekce biogenních aminů v pivu
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Tereza Smolková
Title	Pea amine oxidase and amines in beer
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.
The year of presentation	2018

### **Abstract**

Biogenic amines are formed primarily by decarboxylation of the respective amino acids and are further oxidized by the amine oxidases (EC 1.4.3.21, EC 1.4.3.22) to the corresponding aldehydes. Biogenic amines are naturally occurring in food. Their concentration can be increased by microbial contamination. At higher concentrations, biogenic amines are toxic, especially histamine and tyramine.

In the experimental part of the work pea seedlings were grown and pea amine oxidase (PsAO) subsequently isolated and purified. The substrate specificity of PsAO as well as the kinetics of the reaction of selected amines and amine mixtures were measured by using a coupled peroxidase reaction. The last task was to measure the concentration of biogenic amines in beer samples using amine oxidase reaction, where beer samples were used as pea amine oxidase substrates. UHPLC-MS/MS was used as a reference method for determining of concentration of biogenic amines in beer samples.

Keywords	Pea diamine oxidase, biogenic amines, biogenic amines in beer
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	<b>9</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>10</b>
2.1. Biogenní aminy a polyaminy	10
2.1.1. Vznik biogenních aminů	11
2.1.2. Katabolismus biogenních aminů	12
2.1.3. Výskyt a vznik aminů v pivu	13
2.1.4. Vliv aminů na lidský organismus	14
2.1.5. Histamin	16
2.1.6. Tyramin, tryptamin a fenyletylamin	17
2.1.7. Putrescin, kadaverin, agmatin, spermin a spermidin	18
2.2. Aminoxidasy	18
2.2.1. FAD obsahující aminoxidasy	19
2.2.2. Cu/chinon obsahující aminoxidasy	20
2.2.2.1. Hrachová diaminooxidasa	21
2.3. Základní principy použitých metod	22
2.3.1. Spektrofotometrie	22
2.3.1.1. Stanovení koncentrace proteinů	23
2.3.1.2. Stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů hrachové aminoxidasy (PsAO)	23
2.3.2. Kapalinová chromatografie	23
2.3.3. Elektroforéza	24
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>25</b>
3.1. Biologické materiály	25
3.2. Chemikálie a materiály	25
3.3. Přístroje	26
3.4. Metody	26
3.4.1. Vypěstování etiolovaných hrachových klíčků	26
3.4.2. Izolace a purifikace hrachové aminoxidasy z etiolovaných hrachových klíčků	26
3.4.3. Kontrola purifikace pomocí SDS PAGE elektroforézy	28
3.4.4. Stanovení obsahu proteinů	30
3.4.5. Stanovení aktivity enzymu	30

3.4.6.	Stanovení substrátové specifity PsAO a měření se směsí aminů v koncentracích typických pro pivo	31
3.4.7.	Měření se vzorky piv	32
3.4.8.	Referenční stanovení koncentrace aminů ve vzorcích piv pomocí UHPLC	33
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>35</b>
4.1.	Vypěstování etiolovaných hrachových klíčků a purifikace hrachové aminoxidasy	35
4.2.	Stanovení substrátové specifity PsAO	38
4.3.	Kinetické parametry PsAO	39
4.4.	Vliv ethanolu na PsAO	41
4.5.	Množství biogenních aminů ve vzorcích piv stanovených pomocí UHPLC-MS/MS	42
4.6.	Porovnání spektrofotometrického stanovení koncentrace aminů ve vzorcích s referenční metodou UHPLC-MS/MS	45
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>52</b>

## **Cíle práce:**

### **Teoretické:**

- literární rešerše na téma biogenní aminy a polyaminy
- literární rešerše na téma aminoxidasy
- literární rešerše na téma aminy obsažené v pivu

### **Praktické:**

- izolace aminoxidasy z klíčků hrachu setého (PsAO)
- měření substrátové specifity PsAO vůči biogenním aminům přítomným v pivu a kinetické měřeními účinku PsAO u vybraných substrátů
- měření se směsí aminů v poměru koncentrací typickém pro pivo a s vybranými vzorky piva jakožto substráty PsAO
- referenční měření pro zjištění koncentrace biogenních aminů ve vzorcích za použití UHPLC-MS/MS



## 1. ÚVOD

Biogenní aminy jsou dusíkaté organické látky, které vznikají především dekarboxylací příslušných aminokyselin. Polyaminy jsou rovněž syntetizovány z argininu a methioninu. Aminy jsou dále oxidovány aminoxidasami (EC 1.4.3.21, EC 1.4.3.22) na příslušné aldehydy či aminoaldehydy. Ty mohou samovolně cyklizovat (pyrrolidin, piperidin) a slouží tak jako prekurzory rostlinných alkaloidů. Rovněž mohou být dále oxidovány na příslušné karboxylové kyseliny, které se posléze metabolizují na komponenty citrátového cyklu.

Biogenní aminy a polyaminy se přirozeně vyskytují v potravinách, např. v rybách, sýrech, čokoládě. Častá je jejich přítomnost ve fermentovaných výrobcích (kysané zelí, víno, pivo). Jejich zvýšená koncentrace bývá způsobena mikrobiální kontaminací, a tak značí možné zkažení potravin. Vysoké koncentrace biogenních aminů, zejména pak histaminu a tyraminu, jsou toxické a mohou vyvolat řadu potíží (bolesti hlavy, migrény, zvracení, křeče hladkého svalstva či tachykardie).

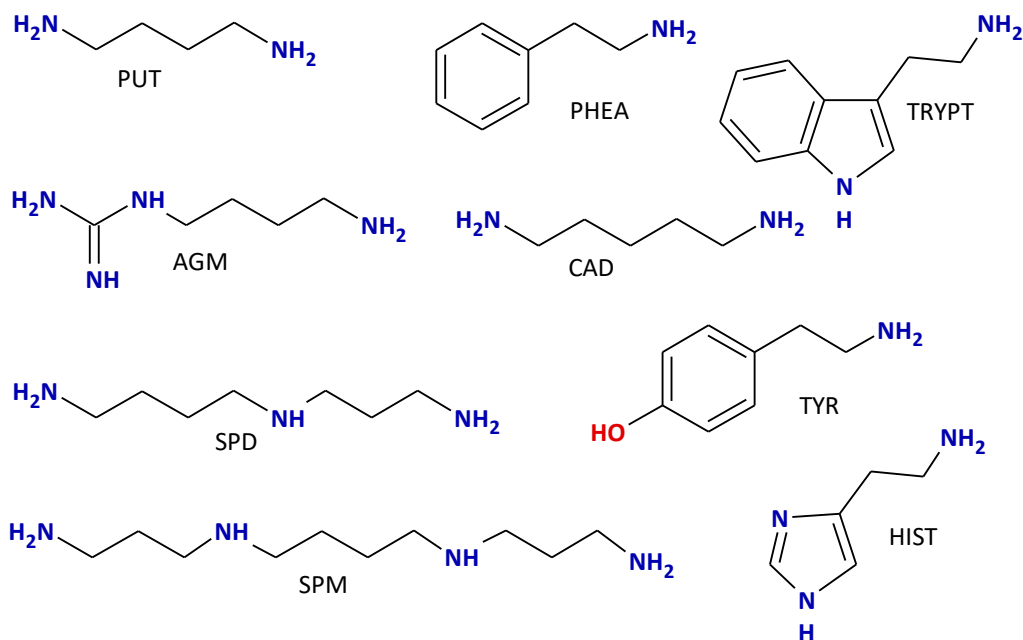
.První krok katabolismu aminů, jejich oxidace za vzniku příslušného aldehydu či aminoaldehydu, peroxidu vodíku a amoniaku, je katalyzován aminoxidasami. Aminoxidasy se podle kofaktoru dělí do dvou základních skupin: FAD obsahující aminoxidasy (polyaminoxidasy) a Cu/topachinon obsahující aminoxidasy (diaminoxidasy). Konkrétně hrachová aminoxidasa (PsAO) patří mezi diaminoxidasy.

V rámci této bakalářské práce bylo studováno možné použití hrachové aminoxidasy (PsAO) pro detekci aminů v pivu. Ke srovnání výsledků získaných pomocí měření přeměny aminů přítomných v pivu katalyzované PsAO se spektrofotometrickou detekcí její aktivity byla použita metoda HPLC.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Biogenní aminy a polyaminy

Biogenní aminy a polyaminy (Obr. 1), dusíkaté organické látky odvozené od amoniaku, jsou nízkomolekulární bazické deriváty aminokyselin, které můžeme rozdělit do čtyř skupin: alifatické biogenní aminy (putrescin, kadaverin), aromatické biogenní aminy (tyramin, fenyletylamin), heterocyklické biogenní aminy (histamin, tryptamin) a polyaminy (agmatin, spermin, spermidin). Zřídka bývají začleněny zvláště i diaminy (Buňka et al., 2012; Boucherau *et al.*, 2000).



Obr. 1: Strukturální vzorce aminů a polyaminů, které jsou předmětem této práce pro jejich výskyt v pivo. Překresleno podle (Kalač a Křížek, 2003).

Biogenní aminy se vyskytují v rostlinných a živočišných buňkách, kde vykonávají množství důležitých funkcí např. při syntéze makromolekul, hormonů či obraně proti osmotickému stresu. Biogenní aminy vznikají především z aminokyselin působením dekarboxylas a jsou odbourávány pomocí aminoxidas na příslušné aldehydy či aminoaldehydy za vzniku peroxidu vodíku a amoniaku (Boucherau *et al.*, 2000).

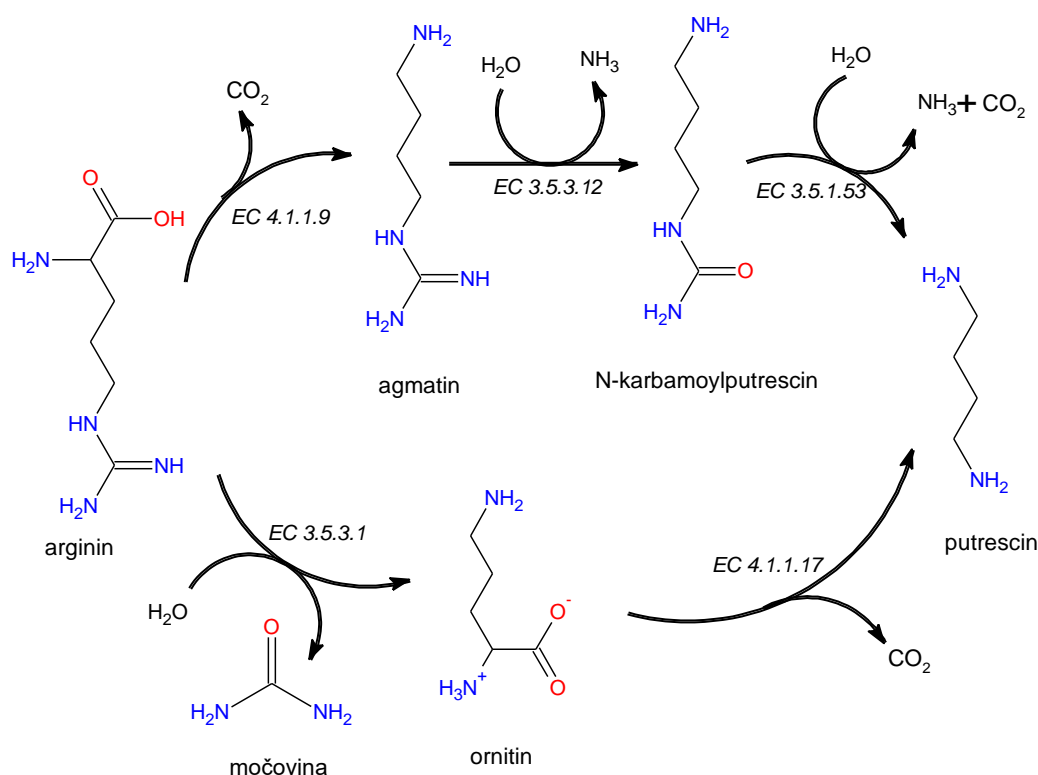
Vzhledem k jejich přirozenému výskytu v organismech se aminy nacházejí v potravinách, jako jsou maso, ryby, sýry, čokoláda a fermentované výrobky například víno, pivo či kvašené zelí. Koncentrace aminů stoupá nejčastěji procesem fermentace a působením bakterií. Větší obsah aminů může být známkou zkažení potravy. Zvýšený příjem aminů společně se sníženým odbouráváním může vést ke vzniku zdravotních problémů, jako jsou bolesti hlavy, zvracení, průjemy (Kalač a Křížek, 2003).

### 2.1.1. Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy jsou syntetizovány všemi živými organismy, jakožto důležitá složka pro jejich růst, vývoj, ochranu před stresem a patogeny či apoptózu a buněčnou smrt. U vyšších rostlin jsou nejhojněji zastoupeny putrescin, spermin a spermidin (Rangan et al., 2014). Jako první byl v roce 1908 objeven putrescin v houbě paličkovici námelové (Rielander, 1908).

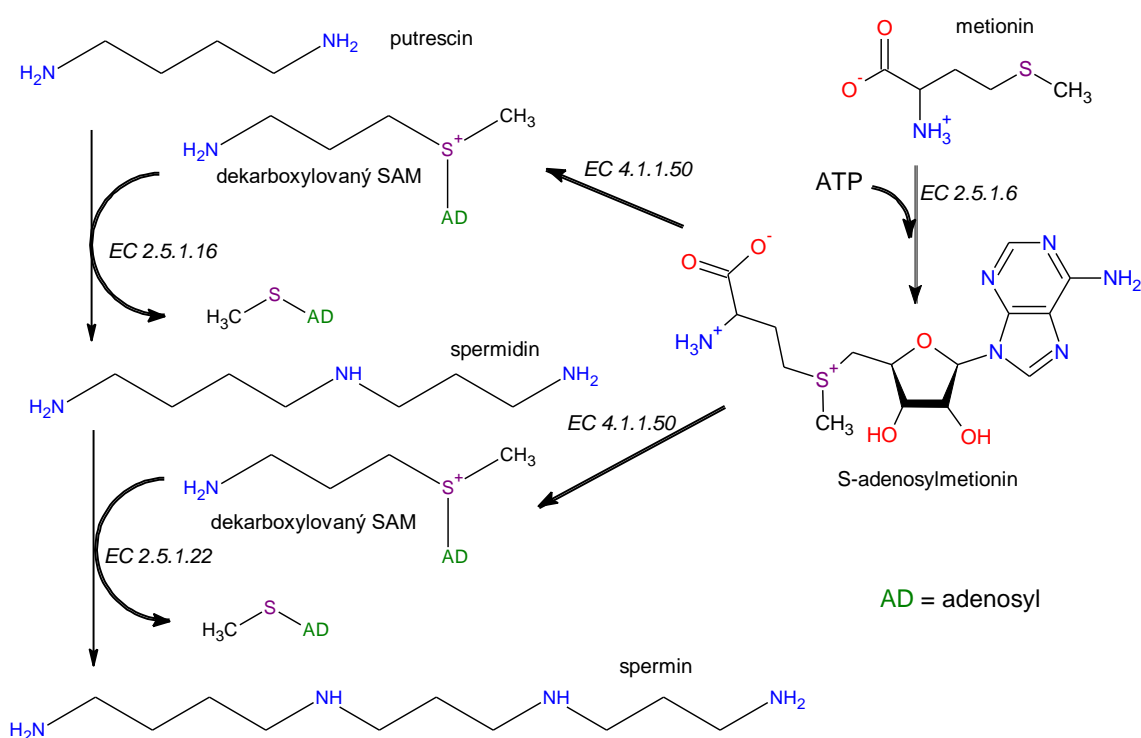
Při syntéze putrescinu jsou využívány dvě rozdílné metabolické dráhy (Obr. 2). Obě metabolické dráhy využívají jako prekurzor arginin. Ornitinová dráha probíhá v mitochondriích živočišných buněk jakožto jediná možná cesta syntézy putrescinu. Nejprve dochází k přeměně argininu na ornitin pomocí argininy (EC 3.5.3.1). Druhým krokem syntézy putrescinu je přeměna ornitinu na putrescin pomocí ornitindekarboxylasy (EC 4.1.1.17).

Agmatinová dráha, která je využívána rostlinami či řadou bakterií, byla objevena v roce 1944 Nakamurou. Arginin je prvně pomocí arginindekarboxylasy (EC 4.1.1.9) přeměněn na agmatin. Dalším krokem je vznik N-karbamoylputrescinu z agmatinu katalyzovaný agmatiniminohydrolasou (EC 3.5.3.12). V posledním kroku dojde k odstranění N-karbamoylového konce pomocí N-karbamoylputrescinamidohydrolasy (EC 3.5.1.53) za vzniku putrescinu (Rangan et al., 2014; Handa et al., 2018).



Obr. 2: Agmatinová a ornitinová dráha syntézy putrescinu. Překresleno podle (Rangan et al., 2014).

Putrescin je poté společně s ATP a methioninem (Obr. 3) prekurzorem dalších polyaminů jako spermin a spermidin. Prvním krokem jejich syntézy je vznik dekarboxylovaného S-adenosylmethioninu (dcSAM), který vzniká přeměnou methioninu S-adenosylmethionindekarboxylasou (EC 4.1.1.50) a S-adenosylmethioninsyntasou (EC 2.5.1.6). Aktivovaný dcSAM slouží poté jako aminopropylový donor. Reakce aminopropylového zbytku s putrescinem je katalyzována spermidinsyntasou (EC 2.5.1.16). Pomocí sperminsyntasy (EC 2.5.1.22) dochází přidáním dalšího aminopropylového zbytku k spermidinu ke vzniku sperminu (Rangan *et al.*, 2014).

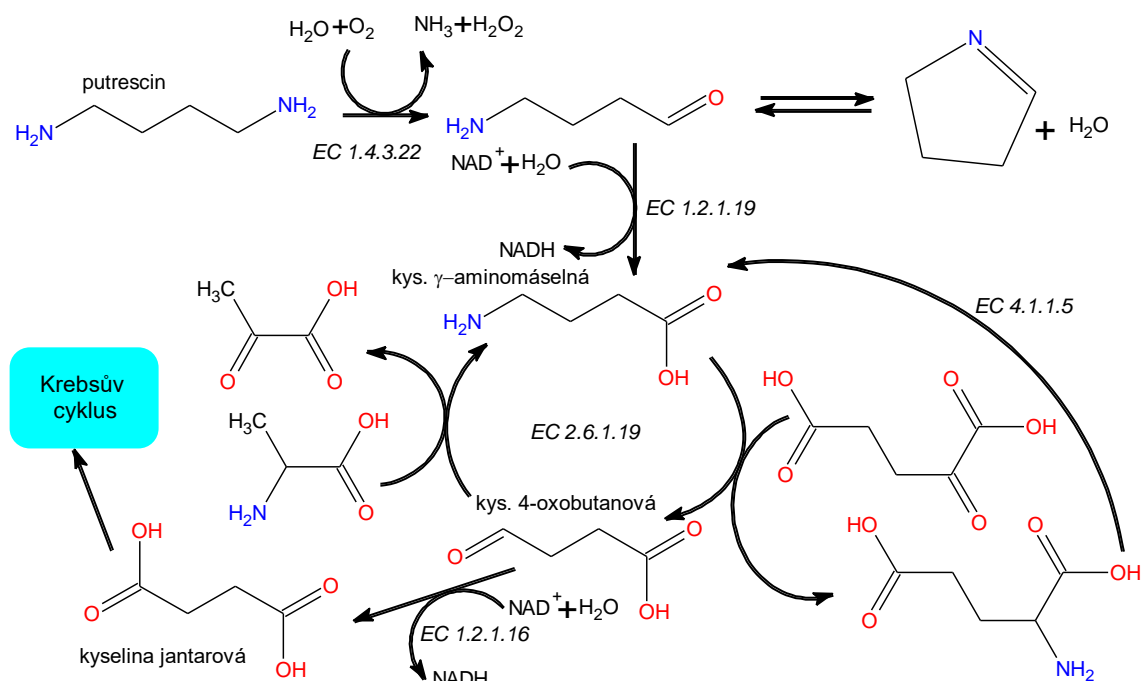


Obr. 3: Syntetická dráha sperminu a spermidinu. Převzato a upraveno (Rangan *et al.*, 2014)

### 2.1.2. Katabolismus biogenních aminů

Aminy a polyaminy jsou oxidovány pomocí aminoxidas na příslušné aminoaldehydy či aldehydy. Vzniklé aminoaldehydy jsou poté dále metabolizovány (Obr. 4), popř. se samovolně cyklizují (*N*-amidino-2-hydroxipyrrolidin, pyrrolidin, piperidin). (Tylichová *et al.*, 2007). Tyto heterocykly slouží jako prekurzory mnohých rostlinných alkaloidů (nikotin). Pokud nedojde k cyklizaci, mají aminoaldehydy různé dráhy odbourávání. Například 4-aminobutanal, který je produktem deaminace putrescinu pomocí diaminoxidasy (EC 1.4.3.22), je za přítomnosti aminoaldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.19) oxidován na kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA). GABA, jež je důležitou

signální molekulou savců, je dále odbourávána pomocí GABA-transaminasy (EC 2.6.1.19) na kyselinu 4-oxobutanovou neboli sukcinátsemikarbaldehyd. Následuje oxidace sukcinátsemialdehyddehydrogenasou (EC 1.2.1.16) a vzniká kyselina jantarová (sukcinát), která je jedním z komponentů Krebsova cyklu (Eisenreichová *et al.*, 1992; Seiler, 2004; Tylichová *et al.*, 2007).



Obr. 4: Degradace putrescinu. Převzato a upraveno (Tylichová *et al.*, 2007).

### 2.1.3. Výskyt a vznik aminů v pivu

V pivu biogenní aminy zastupuje hlavně agmatin (AGM), putrescin (PUT), kadaverin (CAD) a tyramin (TYR). V nižších koncentracích jsou zastoupeny i histamin (HIST), tryptamin (TRYPT), fenyletylamin (PHEA), spermin (SPD) a spermidin (SPM). Obsah těchto aminů se v různých pivech značně liší (Kalač a Křížek, 2003).

Druh a množství aminů nacházejících se v pivu je ovlivněný surovinami použitými k jeho výrobě, technikou výroby piva a mikrobiální kontaminací. Pivo se vyrábí nejčastěji ze čtyř základních surovin: vody, ječného sladu, pivovarnických kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*) a chmele (*Humulus lupulus*) či jeho extraktů. Samotný ječmen obsahuje TYR, PUT, SPM, SPD a AGM. Oproti tomu ječný slad obsahuje ve větší míře PUT, AGM, SPM, SPD a v malém množství HIST, PHEA, TRYPT a CAD. Vysoká hladina TYR, PHEA, PUT, SPM, SPD a AGM je obsažena v chmelu, avšak kvůli malému množství, které je nutné k výrobě piva, je jeho vliv na celkové množství biogenních aminů v pivu zanedbatelný. Snížení obsahu biogenních

aminů lze účinně docílit přidáním rýže při tvorbě mladiny (Glória a Izquiero-Pulido, 1999).

Během rmutování a vaření mladiny stoupá vlivem tepelné dekarboxylace aminokyselin hladina TYR a AGM. Nejvýraznější nárůst koncentrace TYR, HIST a CAD nastává během fermentace, ačkoliv kvasinky nemají vliv na zvýšení koncentrace TYR či HIST. Pozitivní nárůst koncentrace byl pozorován u bakterií rodu *Lactobacillus* např: *Lactobacillus frigidus*, *L. brevis* a *L. brevisimilis*. Na nárůst TYR a TRYPT má vliv rod *Pediococcus* zastoupený hlavně s *Pediococcus damnosus*. *Enterobacteriae* a *Pseudomonas* produkují především putrescin a cadaverin. Efektivním způsobem snížení obsahu především TYR může být např. vymytí fermentačních kádí kyselinou fosforečnou, kdy dojde k odstranění výše zmíněných bakterií během procesu fermentace (Glória a Izquiero-Pulido, 1999; Kalač a Křížek, 2003).

K dalšímu zvýšení hladiny biogenních aminů může docházet během uskladnění piva. Výzkumný tým docenta Františka Buňky testoval zvýšení obsahu biogenních aminů a polyaminů u 114 vzorků českých piv, které byly skladovány po dobu 38-173 dnů. U 25 % z nich se obsah biogenních aminů zvýšil až na hladinu  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . U 6 % zkoumaných vzorků byla dokonce překročena hranice  $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , což už může být koncentrace škodlivá i pro zdravou populaci. (Buňka *et al.*, 2012). Zvýšení hladiny biogenních aminů, zejména tedy TYR, HIST, PUT, CAD, SPD a SPM může být způsobeno dokvašovacími procesy, nedostatečnou pasterizací či následnou kontaminací mikroorganismy (Kalač a Křížek, 2003).

#### **2.1.4. Vliv aminů na lidský organismus**

Aminy jsou nedílnou součástí každého organismu. Podílí se na základních procesech, mezi které náleží kondenzace chromatinu, DNA replikace a transkripce či syntéza proteinů. Důležitou roli mají polyaminy také při obnově klidového membránového potenciálu či udržování elektrolytické rovnováhy, neboť usnadňují průchod  $\text{K}^+$  do buněk. Spermidin se váže na *N*-methyl-*D*-aspartátové (NMDA) receptory a receptory  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyseliny (AMPA) nervových buněk mozku a má vliv jejich funkci včetně paměti (Jiménez-Bremont *et al.*, 2014; Handa *et al.* 2018).

Udržování optimální hladiny biogenních aminů a polyaminů je důležité pro základní funkci buněk, proto je jejich hladina kontrolována řadou enzymů, jako jsou

například: monoaminoxidasa, diaminoxidasa, spermin-spermidin-N-acetyltransferasa, acetylpolyaminoxidasa nebo sperminoxidasa (Maintz a Novak, 2007; Pegg, 2016).

Ačkoliv jsou polyaminy snadno získatelné z potravy, živočichové si potřebné aminy jako spermin, spermidin a putrescin syntetizují sami. Poruchy jejich syntézy pak způsobují závažné zdravotní problémy. Například Snyder-Robinsonův syndrom je způsoben mutací genu sperminsintetasy na chromozomu X. Tato mutace způsobí při přepisu předčasné vložení stop kodonu a enzym ztrácí svou aktivitu. Postižení je recesivní a postihuje pouze mužskou populaci. Důsledkem nedostatku SPM jsou mentální retardace, poruchy řeči, svalová hypoplazie, snížená tělesná hmotnost a osteoporóza. Fyzické příznaky poruchy se s věkem zhoršují (Pegg, 2009; Pegg, 2016).

Tab. 1 Účinek jednotlivých aminů na lidský organizmus. Převzato a upraveno (Shalaby 1997).

Amin	Prekurzor	Účinek na organismus
Histamin	Histidin	Uvolňuje adrenalin a noradrenalin Dráždí hladké svalstvo dělohy, střev a respiračního traktu Stimuluje senzorické i motorické neurony Ovlivňuje sekreci žaludečních šťáv
Tyramin	Tyrosin	Vazokonstrikce periferních cév Zvýšení srdečního výdeje Způsobuje slzení a slinění Zrychluje dýchání Zvyšuje hladinu glukosy v krvi Uvolňuje noradrenalin ze sympatického nervového systému Způsobuje migrénu
Putrescin a kadaverin	Arginin, ornitin a lysin	Hypotenze Snížení srdečního rytmu Křeče žvýkacího svalstva Částečná paralýza svalstva končetin Umocňují toxicitu jiných aminů
Fenyletylamin	Fenylalanin	Uvolňuje noradrenalin ze sympatického nervového systému Zvyšuje krevní tlak Způsobuje migrénu
Tryptamin	Tryptofan	Zvyšuje krevní tlak

Nadbytečný přísun biogenních aminů a polyaminů je pro člověka nebezpečný a způsobuje u něj různé potíže (Tab. 1) od bolestí hlavy, svědění, zrudnutí, otoků, průjmu a zvracení, přes závažnější problémy jako jsou poruchy srdečního rytmu a poruchy dýchacího systému. Největší nebezpečí představují histamin, tyramin, fenyletylamim a tyramin pro jejich interakci s neutrálními transmitery a vazoaktivním účinkům. Putrescin, kadaverin, spermin a spermidin nejsou tak biologicky aktivní, spíše umocňují účinky výše zmíněných díky kompetitivní inhibici jejich oxidace. (Shalaby 1997, Glória a Izquierdo-Pulido, 1999).

### 2.1.5. Histamin

Histamin je silně biologicky aktivní látka, objevená roku 1910 a o několik let později určena jako mediátor anafylaktických reakcí. Je syntetizován pomocí *L*-hystidindekarboxylasy (EC 4.1.1.22) z aminokyseliny histaminu v žírných buňkách, bazofilech či krevních destičkách. Je poté skladován v granulech, ze kterých může být vnějším podnětem (hypoxie, extrémní horečky, alkohol, drogy nebo určité potraviny) uvolněn.

Má schopnost se vázat na čtyři druhy histaminových receptorů a působí tak na buňky rozličných tkání. Způsobuje kontrakci hladké svaloviny, vazodilataci, zvyšuje propustnost cévních stěn, ovlivňuje krevní tlak a působí na produkci žaludečních šťáv. Dále má vliv na zvýšení imunitní odpovědi, krvetvorbu, hojení ran a ovlivňuje cirkadiánní rytmus (Maintz a Novak, 2007).

Hladina histaminu je kontrolována pomocí dvojice enzymů: diaminoxidasou (DAO; EC 1.4.3.22) a histamin-N-metyltransferasou (HNMT; EC 2.1.1.8). DAO je skladována v plazmatické membráně epitelových buněk tenkého střeva, vzestupného tračníku, dělohy a ledvin. Po stimulaci je sekretována do okolí buňky. Oproti HNTM, která je intracelulárním enzymem. HNTM je v lidských tkáních široce rozšířena, ale v největší koncentraci se nachází v jaterní tkáni, slezině, tlustém střevu, prostatě vaječnicích, a v bronchiálním epitelu (Maintz a Novak, 2007).

Problémy mohou nastat zvýšeným příjmem histaminu konzumací potravin s jeho vysokým obsahem, jako jsou ryby čeledi makrelovití (*Scombridae*) a rohořetkovití (*Scromberesocidae*) nejčastěji sardinka, makrela, tuňák a marlin. Další potraviny s vyšší koncentrací histaminu jsou fermentované uzeniny, zrající sýry (Gouda, Cheddar, Ementál), pivo nebo víno. Významným zdrojem histaminu jsou taktéž



již se kazící potraviny, kdy dochází k nárůstu hladiny histaminu vlivem bakteriálního růstu. Tomuto aspektu napomáhá vyšší teplota. Pokud dojde k překročení hladiny, kdy detoxifikační systém DAO a HNMT není schopen rozložit histamin na netoxické produkty (imidazol acetát a N-metylimidazol acetát), dojde k rozvoji symptomů tzv. histaminózy. Mezi nejčastější symptomy patří: vyrážka, průjem, zvracení, pocení, bolesti hlavy, bušení srdce, hypotenze a dýchací obtíže. Histaminóza může být umocněna příjmem dalších aminů, jako jsou putrescin, kadaverin či spermin. (Shalaby, 1997)

Funkce detoxifikačního systému může být narušena inhibitory, jako jsou alkohol a DAO blokuující léčiva. Proto by měla být maximální povolená hladina pro histamin v potravinách stanovena na 100 mg/kg a pro alkoholické nápoje 2 mg·l<sup>-1</sup> (Maintz a Novak, 2007). V roce 2005 byl v EU stanoven limit pro histamin (č. 2073/2005), který byl novelizován roce 2013 (č. 1019/2013). Limit histaminu u čerstvých ryb byl stanoven na 200 mg·kg<sup>-1</sup> a u fermentované rybí omáčky 400 mg·kg<sup>-1</sup> (Telsing *et al.*, 2012a; [www.eur-lex.europa.eu](http://www.eur-lex.europa.eu), duben 2018).

### **2.1.6. Tyramin, tryptamin a fenyletylamin**

Tyramin, tryptamin a fenyletylamin vykazují vazoaktivní účinky. Nejvíce toxickým, byť samostatně jen mírně, je tyramin a to v důsledku reakce s monoaminoxidasovými inhibitory. Tato situace má za následek vznik hypertenzní krize, kdy dochází k uvolnění noradrenalinu a zúžení periferních cév. Dalšími projevy působení tyraminu jsou zúžení zornic, slzení, zvýšená produkce slin, zvýšení krevního cukru a tlaku či zrychlení dechu. Za podmínek, které se nacházejí v žaludku, může docházet k reakci tyraminu s dusitanem za vzniku 3-diazotyraminu, který způsobuje rakovinu ústní dutiny u potkanů. (Shalaby, 1997).

Toxická dávka se liší v závislosti na individuálních predispozicích a přítomnosti dalších aminů. Hodnoty 100-800 mg·kg<sup>-1</sup> pro tyramin a 30 mg·kg<sup>-1</sup> pro fenyletylamin jsou považovány pro zdravou populaci za toxické. Nicméně pro osoby vrozenou poruchou odbourávání biogenních aminů nebo pro osoby užívající léky inhibující monoaminooxidasy, je nebezpečný celkový příjem 3 mg fenyletylaminu a 6 mg tyraminu (Santos, 1996).

### 2.1.7. Putrescin, kadaverin, agmatin, spermin a spermidin

Polyaminy putrescin, spermin a spermidin ovlivňují růst a dělení buněk, a proto se v rychle rostoucích tkáních vyskytují ve vyšších koncentracích. Ačkoliv nebyla zjištěna přímá spojitost mezi polyaminy a vznikem rakoviny, bylo dokázáno, že mají vliv na rychle rostoucí tkáň nádorových buněk. Několik výzkumů potvrdilo, že snížení nebo úplné odstranění polyaminů z potravy vyvolalo remisi či redukci nádorových buněk u zvířat (Handa *et al.*, 2018).

Toxické dávky u lineárních aminů a polyaminů jsou velmi vysoké. Pro laboratorní krysy je toxická dávka orálně přijatého sperminu a spermidinu  $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  živé váhy, pro putrescin  $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  a pro kadaverin více než  $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (Til *et al.*, 1997). Na druhou stranu je nutno podotknout, že polyaminy mají řadu prospěšných funkcí, ať už je to ochrana proti oxidativnímu stresu, inhibice oxidace polynenasycených mastných kyselin či podpora hojení ran (Santos, 1996).

Aminy byly taktéž zkoumány jako možné mutagenní prekurzory látek, které jsou schopny tvořit nitrosaminy – karcinogenní látky pro různé živočišné druhy. Bylo zjištěno, že putrescin a kadaverin se po zahřátí přeměňují na pyrrolidin a piperidin. Tyto látky pak během uzení mohou vytvářet společně s dusičnany používanými v směsi na solení karcinogenní N-nitrosopyrrolidin a N-nitrosopiperidin. Agmatin, spermin a spermidin mohou být také prekurzory nitrososloučenin (Shalaby, 1997).

## 2.2. Aminoxidasy

Aminoxidasy jsou skupina enzymů katalyzující oxidaci aminu a polyaminů na odpovídající aldehydy či aminoaldehydy, amoniak a peroxid vodíku. Podle kofaktoru se aminoxidasy dělí do dvou hlavních skupin: flavinadenindinukleotid (FAD) aminoxidasy (EC 1.5.3.3) a měď obsahující aminoxidasy, které byly původně označovány jako (EC 1.4.3.6). FAD aminoxidasy jsou často označovány jako polyaminoxidasy (PAO) a Cu-aminoxidasy jako diaminoxidasy (DAO), podle substrátů, které oxidují (Angelini *et al.*, 1994; Medda *et al.*, 1995).

Aminoxidasy nalezneme u rostlin, živočichů, bakterií, hub i kvasinek (Frébort a Adachi, 1995). Z rostlinného extraktu byla poprvé izolována před 60 lety, a od té doby byla již purifikována do homogenity a charakterizována (příklady v Tab. 2) řada těchto enzymů (Medda *et al.*, 1995).

Tab. 2 Některé vlastnosti vybraných rostlinných aminoxidas. Převzato a upraveno (Medda *et al.*, 1995).

	Cizrna beraní ( <i>Cicer arietinum</i> )	Sója luštinatá ( <i>Glycine max</i> )	Čočka jedlá ( <i>Lens esculenta</i> )	Pryšec statný ( <i>Euphorbia characias</i> )	Ječmen setý ( <i>Hordeum vulgare</i> )
Molekulová hmotnost					
Gelová chromatografie	150 000	113 000	150 000	140 000	150 000
SDS PAGE elektroforéza	72 000	77 000	75 000	72 000	75 000
Obsah mědi % (g Cu/g protein)	ND	0,109	0,082	0,09	0,082
Izoelektrické body	6,0	7,1	6,1	5,2	6,8
	5,81	7,05	5,9		
	5,1	7,0	5,1		
		6,9			
Obsah sacharidů % (w/w)	ND	ND	14	12	14

### 2.2.1. FAD obsahující aminoxidasy

Mezi FAD obsahující aminoxidasy řadíme savčí monoaminoxidasy (EC 1.4.3.4) a rostlinné i živočišné polyaminoxidasy (EC 1.3.5.13-17). Katalyzují přeměnu primárních, sekundárních a terciálních aminů na odpovídající iminy, kdy dochází k oxidativnímu štěpení vazby  $\alpha$ -uhlíku substrátu. Imin je poté neenzymaticky hydrolyzován na odpovídající aldehyd a amoniak. Současně dochází k redukci FAD. Ten se poté oxiduje kyslíkem za tvorby peroxidu vodíku (Binda *et al.*, 2002).

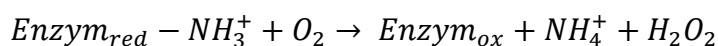
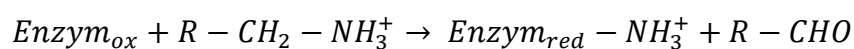
U lidské monoaminoxidasy (MAO) je molekula FAD kovalentně vázána k enzymu přes aminokyselinu cystein. MAO se nachází na vnější mitochondriální membráně a katalyzuje rovněž deaminaci biogenních a xenobiotických aminů jako serotonin, dopamin a norepinefrin. Z toho důvodu hraje MAO důležitou roli u některých neurologických poruch jako deprese či Parkinsonova choroba. Inhibicí MAO dochází k zvýšení hladiny neurotransmiterů v CNS, proto se inhibitory MAO používají k léčbě výše zmíněných nemocí (Son *et al.*, 2008).

U polyaminoxidasy je FAD vázán nekovalentně. PAO oxidují sekundární aminoskupinu ( $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ) polyaminů sperminu a spermidinu, které hrají důležitou roli při buněčné diferenciaci a růstu. Bylo prokázáno, že aktivita PAO tkání karcinomu střeva, prsu a jiných nádorů oproti zdravé tkáni snížena (Binda *et al.*, 2002; Vujcic *et al.*, 2003).

### 2.2.2. Cu/chinon obsahující aminooxidasy

Měď obsahující aminooxidasy (Cu-AO) jsou široce rozšířené a vyskytují se jak v prokaryotických tak eukaryotických organismech. Příkladem jsou savčí plazmatická aminooxidasa, hrachová diaminoxida a další rostlinné či prokaryotické aminooxidasy. Dělí se do dvou skupin: primární aminooxidasy (EC 1.4.3.21) a diaminoxidasy (EC 1.4.3.22). K Cu-AO se řadí i lisyloxidasa (EC 1.4.3.13), která deaminuje  $\epsilon$ -aminoskupinu lysinu nebo hydroxylysinu u reziduí kolagenu (Buffoni a Ignesti, 2000; <https://www.brenda-enzymes.org>, duben 2018).

Cu-AO katalyzují oxidativní deaminaci primárních aminů na aldehydy ping-pongovým mechanismem zahrnující transaminaci s následnou dvouelektronovou výměnou, která redukuje molekulární kyslík a produkuje peroxid vodíku.



V aktivním centru se kromě atomu mědi nachází organický kofaktor 2,4,5-trihydroxyfenylalanin chinon (topachinon). Topachinon je tvořen posttranslační oxidací tyrosinového zbytku (Pietrangeli *et al.*, 2007).

Aminooxidasy mají v organismech řadu funkcí. Prokaryotické organismy využívají aminooxidasy k rozkladu aminů, jako zdroje uhlíku a dusíku pro růst. U vyšších organismů se podílejí mimo jiné na katabolismu sperminu, spermidinu a putrescinu, které ovlivňují řadu důležitých funkcí např.: diferenciaci buněk, proliferaci, buněčnou smrt či růst nádorů. U savců stoupá aktivita aminooxidasy během březosti, neboť dochází k nadprodukci polyaminů. Velké množství aminooxidasy se nachází také v tenkém střevě, kde dochází k odbourávání biogenních aminů a polyaminů přijatých s potravou (Frébort a Adachi, 1995).

Podle substrátové specifity můžeme aminooxidasy rozdělit do 4 skupin. Skupinu první tvoří savčí plazmatická aminooxidasa, která oxiduje benzylamin a další monoaminy. Druhou skupinu tvoří savčí diaminoxidasy (ledvinové a placentální enzymy), které mají nejvyšší specifitu účinku u diaminů a histaminu. Třetí skupinou jsou rostlinné DAO preferující putrescin a kadaverin. Poslední skupinu tvoří mikrobiální aromatické aminooxidasy, které preferují substráty jako tyramin, histamin, fenyletylamin či jiné aryalkylaminy (Frébort a Adachi, 1995).

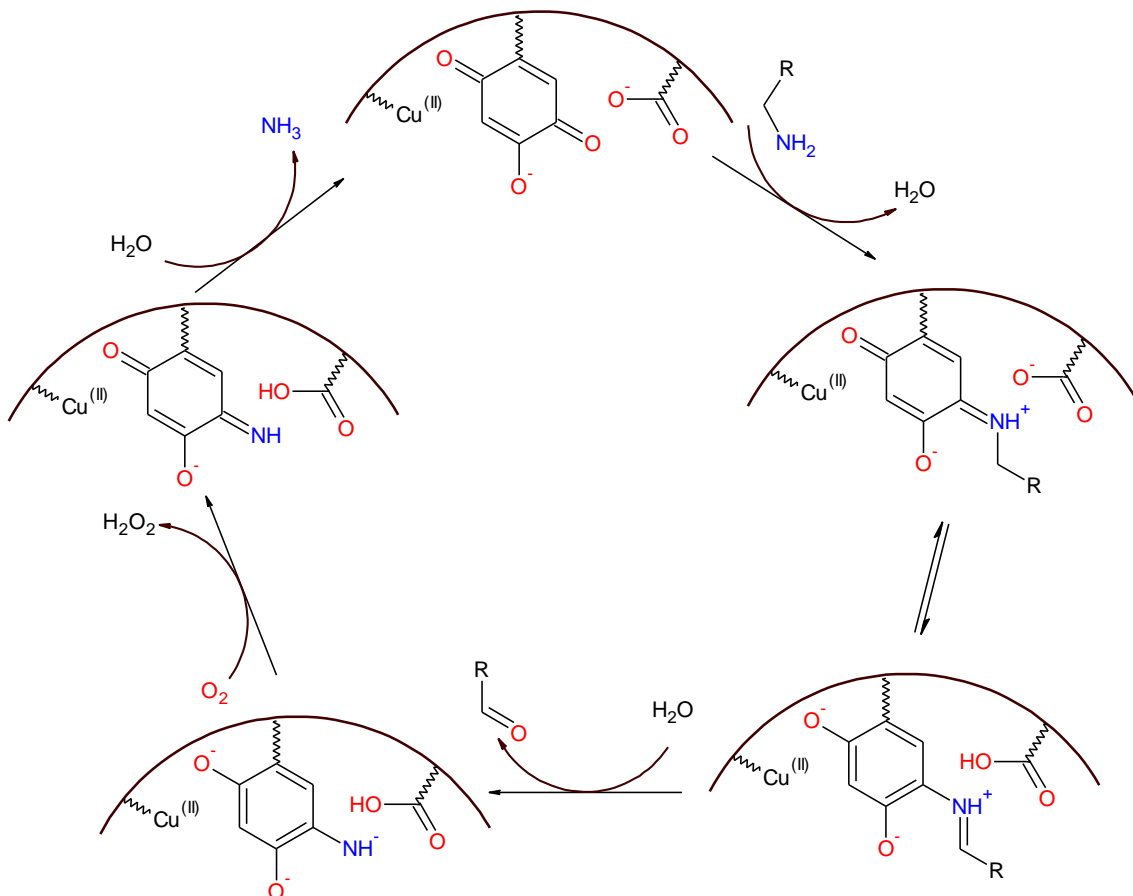
### 2.2.2.1. Hrachová diaminoxidasa

Rostlinné DAO jsou volně usazeny v buněčné stěně. Nejvyšší koncentraci DAO nalezneme u dvouděložných rostlin, jako jsou hrách, cizrna, čočka či sója, a to především v okamžiku jejich růstu (Cona *et al.*, 2006). Rostlinné DAO mají molekulovou hmotnost v rozmezí 70-95 kDa, skládají se ze dvou homologních podjednotek a každá podjednotka obsahuje  $\text{Cu}^{\text{II}}$  a topachinon (Vianello *et al.*, 1998).

Konkrétně hrachová diaminoxidasa (PsAO) se skládá ze dvou podjednotek o molekulové hmotnosti 67 kDa (Frébort a Adachi, 1995). Podle krystalové struktury se každá jednotka skládá ze tří domén (D2, D3 a D4). Největší je D4 doména sestavená z  $\beta$ -sendviče, který obsahuje dva zkroucené antiparalelní  $\beta$ -skládané listy s osmi a deseti vlákny. Zbylé dvě domény (D2 a D3) jsou umístěny na povrchu  $\beta$ -sendviče D4 domény a skládají se z 2  $\alpha$ -helixů propojených čtyřvláknovým antiparalelním  $\beta$ -skládaným listem (Kumar *et al.*, 1996).

$\text{Cu}^{\text{II}}$  je v aktivním místě koordinován třemi imidazolovými kruhy histidinů (His442, His444 s His603) a svázán s dvěma molekulami vody. Aktivní centrum je uloženo hluboko v enzymu a je nutná reorganizace peptidu. K tomu dochází po navázání substrátu. Topachinon se nachází v blízkosti  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Reakcí se substrátem (Obr. 5) se tvoří Schiffova báze, kdy v několika krocích dochází k vzniku aldehydu příslušného aminu (Prabhakar a Siegbahn, 2001). Následuje oxidace topachinonu kyslíkem za vzniku iminochinonu, poté pomocí hydrolyzy dochází k odštěpení amoniaku a enzym se tak vrací do původního stavu (Mukherjee *et al.*, 2008).

PsAO má širokou substrátovou specifitu účinku, jejími nejlepšími substráty jsou putrescin a kadaverin, následované agmatinem, spermidinem a histaminem. Další substráty se setkávají s nižší aktivitou enzymu (Kivirand a Rinken, 2007).



Obr. 5: Mechanismus oxidativní deaminace aminu pomocí DAO. Převzato a upraveno z (Prabhakar a Siegbahn, 2001).

## 2.3. Základní principy použitých metod

### 2.3.1. Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je analytická metoda pro stanovení koncentrace a dalších vlastností

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I} \quad A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

zkoumaného vzorku. Pracuje na principu pohlcení paprsku záření při průchodu vzorkem (absorbance). Vztah absorbance (pohlceného záření) a transmittance (prošlého záření) se řídí Lambert-Beerovým zákonem.

Spektrofotometr se skládá z pěti základních částí: zdroj záření, monochromátor, kyvetový prostor, detektor a zesilovač.

### **2.3.1.1. Stanovení koncentrace proteinů**

Pro spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů se používá řada metod (Biuretová, Lowryho, Bradfordové, bicinchoninová...). V rámci této práce byla využita bicinchoninová (BCA) metoda, při které se používá sodná sůl kyseliny bicinchoninové, která tvoří komplex s měďnými ionty. Měďnaté ionty síranu měďnatého při tvorbě peptidové vazby v alkalickém prostředí redukuje na měďné ionty, ty poté tvoří se soli kyseliny bicinchoninové purpurově zbarvený komplex. BCA činidlo se skládá ze soli kyseliny bicinchoninové a síranu měďnatého v poměru 100:1. Měření probíhá proti standardu hovězího sérového albuminu při 562 nm (Smith *et al.*, 1985).

### **2.3.1.2. Stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů hrachové aminoxidasy (PsAO)**

Ke stanovení aktivity a kinetických parametrů PsAO lze využít několika metod, které jsou založeny na voltametrické, amperometrické či spektrofotometrické detekci reaktantů či produktů reakce PsAO nebo reakce spřažené. Pro jeho jednoduchost a dostupnost je nejvíce využíváno spektrofotometrické stanovení. (Telsing *et al.*, 2012a; Telsing *et al.*, 2012b). Pro naše účely bylo využito spektrofotometrické metody, kdy byla využita spřažená reakce s peroxidasou detekující vzniklý peroxid vodíku pomocí oxidace aminoantipyrinu (AAP) a 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonátu sodného (DCHBS). Dochází k vzniku fialovo-růžového zbarvení, které se detekuje při 515 nm (Ascenzi *et al.*, 2002, Fossati *et al.*, 1980).

### **2.3.2. Kapalinová chromatografie**

Chromatografické metody slouží k rozdělení směsi látek v tekoucí mobilní fázi na základě jejich rozdílné interakce s fází stacionární. Doba mezi nanesením vzorku a elucí látky (retenční čas) je pro určitou látku pro daný systém specifická. Látky se v závislosti na charakteru stacionární fáze použitého chromatografického systému separují podle různých vlastností (polarita, elektrický náboj, velikost molekuly, přítomnost charakteristických skupin specificky interagujících se stacionární fází).

Pro analýzu koncentrace biogenních aminů je použití kapalinové chromatografie oproti jiným metodám (enzymatické stanovení, tenkovrstvá chromatografie, radioimunologická analýza) výhodné z hlediska vysoké selektivity a citlivosti. Nevýhodou je, že většina aminů obsažených v potravinách či pivu není detekovatelná

v UV-VIS spektru či pomocí fluorescence, bez předchozí úpravy. Vzorky proto bývají derivatizovány. Podle použité metody detekce se využívá množství derivatizačních činidel. Pro fluorescenční detekci například *orto*-ftaldialdehyd, 2-merkptoethanol a 2-naftyloxokarbonylchlorid. Pro UV-VIS detekci se nejčastěji používají 3,5-dinitrobenzoylchlorid, benzoylchlorid, dansylchlorid či ninhydrin (Kirchbaum *et al.*, 2000; Gómez-Alonso *et al.*, 2007).

Konkrétně pro potřeby referenčního stanovení koncentrace aminů u pivních vzorků byla využita ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektroskopií (UHPLC-MS/MS).

### **2.3.3. Elektroforéza**

Elektroforéza je separační technika pracující na principu pohybu částic v elektrickém poli. Částice se v poli pohybují různou rychlostí v závislosti na poměru náboje a velikosti částice (působení třecích sil). Pro elektroforézu se využívá různých materiálů (papír, acetát celulosy, agarosový gel, polyakrylamidový gel,...). V rámci bakalářské práce byla využita elektroforéza na akrylamidovém gelu, pro kontrolu přítomnosti a čistoty izolované PsAO.



### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Biologické materiály

Osivo hrachu setého (*Pisum sativum*) odrůda Abarth

#### 3.2. Chemikálie a materiály

1,4-diaminobutan dihydrochlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. 32810)
1-amino-4-guanidinbutan sulfát	(Sigma-Aldrich, kat. č. A-7127)
2-fenyletylamin	(Sigma-Aldrich, kat. č. P6513)
3,5-dichlor-2-hydroxibenzofulfonát sodný	(Sigma-Aldrich, kat. č. D4645)
4-aminoantipyrin	(Sigma-Aldrich, kat. č. 06800)
Akrylamid	(Sigma-Aldrich, kat. č. A8887)
Benzoylchlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. 259950)
Bicinchoninová směs	(Sigma-Aldrich, kat. č. B9643)
Coomassie Brilliant blue R250	(VWR, kat. č. 443283M)
Dietyléther	(Lach:Ner, kat. č. 20018-ATO)
Dihydrogenfosforečnan draselný	(Lach:Ner, ČR, kat. č. 30016-APO)
Dodecylsulfát sodný	(VWR, kat. č. 205-788-1)
Ethanol	(Lach:Ner, 20025-099)
Glycin	(Sigma-Aldrich, kat. č. G8898)
Histamin dihydrochlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. H7250)
Hydrogenfosforečnan draselný	(Lach:Ner, ČR, kat. č. 30060-APO)
Hydroxid amonný	(Lach:Ner, 1000 1-A25)
Hydroxid sodný	(Sigma-Aldrich, kat. č. 71690)
Chlorid sodný	(Lach:Ner, kat. č. 30093-APO)
Kadaverin dihydrochlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. C8561)
Křenová peroxidasa	(Sigma-Aldrich, kat. č. 77322)
Kyselina mravenčí	(Merck KGA, kat. č. 47653764624)
Kyselina octová	(Lach:Ner, kat. č. 30591)
Kyselina trichloroctová	(Sigma-Aldrich, kat. č. T4885)
Laemmliho pufr	(BIO-RAD, kat. č. 161-0747)
Marker Protein ladder 10-250 kDa	(BioLabs, kat. č. P7703S)
Methanol (HPLC)	(Biosolve, kat. č. 0013687802BS)
Methanol (SDS-PAGE)	(Lach:Ner, kat. č. 20038-ATO)
Pentahydrát síranu měďnatého	(Lach:Ner, kat. č. 30625 0502)
Peroxodisíran amonný	(BIO-RAD, kat. č. 161-0700)
Síran amonný	(Lach:Ner, ČR, kat. č. 30165-CPO)
Spermidin trihydrochlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. 85578)
Spermin tetrahydrochlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. 85610)
TEMED	(BIO-RAD, kat. č. 161-0800)
Trishydroximetylaminoetan	(Sigma-Aldrich, kat. č. 154563)
Tryptamin hydrochlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. 246557)
Tyramin hydrochlorid	(INC Biomedicals, kat. č. 103173)
Tyroglobulin	(Sigma-Aldrich, kat. č. T1001)
Glukosaoxidasa	(Serva, kat. č. 22739)
Perlit	(Perlit s.r.o. Šenov u Nového Jičína)

### 3.3. Přístroje

Accublock™ digital dry bath	(Labnet)
Centrifuga 5430	(Ependorf)
Centrifuga Bench top 4-16k s	(Sigma)
Centrifuga IEC CL31R Multispeed	(Thermo electron corporation)
Centrifuga Minispin	(Ependorf)
Gel Doc™ EZ Imager	(BioRad)
Heating-cooling dry block CH-100	(BioSan)
Magnetická míchačka basic C	(IKA RET)
Spektrofotometr UV-VIS 8453	(Agilent)
Termostat láznový cc1-166A	(Merci)
Třepačka 130 Basic	(IKA KS)
UHPLC sestava	(SHIMADZU)
-řídící jednotka CBM 20	
-pumpy Nexera x2 LC 30AD	
-autosampler Nexera x2 SIL BOAL	
-degaser DGu-20A5R	
-kolona CTO 20AC	
-MS detektor LCMS 8050	
Vortex M53 Basic	(IKA)

### 3.4. Metody

#### 3.4.1. Vypěstování etiolovaných hrachových klíčků

Hrachová semena o celkové hmotnosti 1 kg byla po dobu 24 hodin namočena v přibližně dvojnásobném objemu vody. Nabobtnalý hrách byl druhého dne vyset na navlhčený perlit. Po dobu 7 dní byl ponechán ve tmě s každodenní zálivkou ve fytotronu při teplotě 25°C a vlhkosti 50%. Po 7 dnech byly etiolované hrachové klíčky odštířeny od semene a zbaveny lístků a zamrazeny. Pro zvýšení výtěžku bylo pěstování provedeno třikrát a získané klíčky ze všech tří várek byly po zamražení spojeny do jedné várky.

#### 3.4.2. Izolace a purifikace hrachové aminoxidasy z etiolovaných hrachových klíčků

Izolace PsAO ze semidenních etiolovaných hrachových klíčků, proběhla podle metody vyvinuté pro izolaci aminoxidasy z hrachoru (Šebela et al., 1998). Použitý purifikační postup zahrnoval po homegenizaci v draselně-fosforečném (KPi) pufru o koncentraci 0,1 mol·l<sup>-1</sup> a pH 7,0, vysolení pomocí síranu amonného do 30 a 70% nasycení, řízenou tepelnou denaturaci při 60 °C, tandemovou iontoměničovou chromatografií za použití kolony Bio RAD – High Que a kolony s hydroxyapatitem a gelovou permeační chromatografií za použití kolony se Sephadexem S300. Samotná izolace probíhala

v chladové místnosti při teplotě 4 °C. Mezi jednotlivými kroky byl vždy odebrán vzorek pro následnou analýzu.

Zmražené hrachové klíčky byly nožem nakrájeny na délku cca 1 cm a zhomogenizovány pomocí mixéru v přibližně 2 KP<sub>i</sub> pufru o koncentraci 0,1 mol·l<sup>-1</sup> a pH 7,0 bez přídavku měďnatých kationů. Homogenát byl zfiltrován přes nylonovou síťku a filtrát zcentrifugován při 10500 g (centrifuga Sigma, Bench top 4-16k s) po dobu 20 min při teplotě 4 °C. Po centrifugaci byl odebrán 1 ml supernatantu (vzorek č. 1), který byl zamražen.

Následovalo vysolení homogenátu síranem amonným do 30 % nasycení (176 g·l<sup>-1</sup>). Síran byl dávkován postupně za stálého míchání pomocí magnetické míchačky (IKA RET basic C). Po 30 minutách vysolování byl homogenát zcentrifugován při 10500 g (centrifuga Sigma, Bench top 4-16k s) po dobu 25 min při teplotě 4 °C. Ze získaného supernatantu byl odebrán vzorek č. 2 (1 ml), který byl zamražen.

K druhému vysolení do 70 % nasycení bylo použito 273 g·l<sup>-1</sup> síranu amonného. Síran byl přidáván postupně za stálého míchání pomocí magnetické míchačky, po 30 minutách byl homogenát zcentrifugován při teplotě 4 °C a 10500g (centrifuga Sigma, Bench top 4-16k s) po dobu 25 min. Supernatant byl vylit a precipitát byl rozpuštěn v KP<sub>i</sub> pufru o pH 7,0 a koncentraci 100 mmol·l<sup>-1</sup>. Z rozpuštěného precipitátu byl odebrán (1 ml vzorek č. 3) k zamražení.

Roztok precipitátu byl dialyzován přes noc ve 3 litrech stejného pufru, v kterém byl rozpuštěn, přičemž byl pufr 1x během dialýzy vyměněn. Dialyzát byl na vodní lázni zahřán na teplotu 58 °C a poté po dobu 5 minut inkubován ve vodní lázni o teplotě 60 °C. Následovalo ochlazení na ledu do dosažení teploty kolem 4 °C s následnou centrifugací po dobu 2 hodin při teplotě 4 °C a 10500 g (centrifuga Sigma, Bench top 4-16k s). Ze supernatantu byl odebrán vzorek č. 4. Zbylý supernatant byl přes noc dialyzován dvakrát ve 3 litrech KP<sub>i</sub> pufru o koncentraci 20 mmol·l<sup>-1</sup> a pH 7,0 se síranem měďnatým o koncentraci 1 μmol·l<sup>-1</sup>. Dialyzát byl před nanesením na chromatografickou kolonu opět centrifugován při teplotě 4 °C, 10 500 g po dobu 30 min.

Enzym byl přečištěn pomocí tandemové iontoměničové a adsorbční chromatografie za použití kolony Bio RAD – High Que a kolony s hydroxyapatitem. Jako mobilní fáze s průtokem 2 ml/min byl použit KP<sub>i</sub> pufr o koncentraci 10 mmol·l<sup>-1</sup> a pH 7,0 se síranem měďnatým o koncentraci 1 μmol·l<sup>-1</sup>. K uvolnění aminoxidasy z kolony

s hydroxyapatitem byl použit  $\text{KPi}$  pufr o koncentraci  $750 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,0 a přídavkem  $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  síranu měďnatého. Ze zachycené eluce s aminoxidasou, byl odebrán vzorek č. 5 (0,5 ml) a zamražen. Eluce s aminoxidasou byla přes noc dialyzována v  $\text{KPi}$  pufru ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,0) s přídavkem síranu měďnatého o výsledné koncentraci měďnatých iontů  $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následně byla centrifugována po dobu 30 min při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $12\,000 \text{ g}$  (centrifuga Sigma, Bench top 4-16k s). K vymytí proteinů z první kolony posloužil  $\text{KPi}$  pufr o koncentraci  $750 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 7,0 a přídavkem  $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  síranu měďnatého a  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  chloridu sodného.

Supernatant s aminoxidasou byl poté pomocí ultrafiltrace zahuštěn na 3 ml. Nejprve byl na gelovou kolonu (Sephadex S300) nanesen kalibrační roztok obsahující tyroglobulin (670 kDa), cytochrom C (12,4 kDa) a glukosaoxidasu (153,9 kDa). Po zjištění elučního času aminoxidasu pomocí výše zmíněného kalibračního roztoku, byl nanesen na gelovou kolonu zahuštěný supernatant. Jako mobilní fáze s průtokem  $2 \text{ ml/min}$  byl použit  $\text{KPi}$  pufr o koncentraci  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a pH 7,0 s obsahem  $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  síranu měďnatého. Vzorek byl sbírán v elučním čase 110-140 minut od nanesení vzorku. Získaná eluce byla zahuštěna ultrafiltrací. Ze zahuštěné eluce bylo odebráno 0,5 ml enzymu (vzorek č. 6) a zbylý enzym byl rozpipetován po 1 ml do mikrozkušavek.

### **3.4.3. Kontrola purifikace pomocí SDS PAGE elektroforézy**

Pro kontrolu čistoty enzymu byla použita SDS PAGE elektroforéza na akrylamidovém gelu. Gel se skládal z 4% zaostřovacího akrylamidového gelu a 10% rozdělovacího akrylamidového gelu. Dělicí gel se skládal z 3,4 ml roztoku akrylamidu (30 % monomer; 0,8 % dimer), 2,5 ml Tris-HCl pufru ( $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; pH 8,8), 3,8  $\mu\text{l}$  vody, 100  $\mu\text{l}$  10% roztoku dodecylsírany sodné (SDS) a 15  $\mu\text{l}$  tetramethylethylendiamin (TEMED). Polymerace akrylamidu byla zahájena přidáním 50  $\mu\text{l}$  10% roztoku peroxodisírany amonného (APS). Roztok byl nalit mezi elektroforetická sklíčka a převrstven n-butanolem. Po 30 minutách polymerizace byl n-butanol odlit a jeho zbytek vypláchnut destilovanou vodou.

Zaostřovací gel se skládal z 0,65 ml roztoku akrylamidu (30 % monomer; 0,8 % dimer), 1,25 ml Tris-HCl pufru ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; pH 6,8), 100  $\mu\text{l}$  10% roztoku SDS a 15  $\mu\text{l}$  TEMED. Polymerace akrylamidu byla zahájena přidáním 60  $\mu\text{l}$  10% roztoku APS.

Tab. 3 Množství vzorků v jamkách pro SDS PAGE elektroforézu.

Vzorky neřaděné			Vzorky 10x řaděné		
Číslo jamky	Vzorek	Množství vzorku v $\mu\text{l}$	Číslo jamky	Vzorek	Množství vzorku v $\mu\text{l}$
1	Marker	2	1	Marker	2
2	Vzorek 1	10	2	Vzorek 1	15
3	Vzorek 2	2	3	Vzorek 2	15
4	Vzorek 3	2	4	Vzorek 3	3
5	Vzorek 4	2	5	Vzorek 4	3
6	Vzorek 5	10	6	Vzorek 5	15
7	Vzorek 6	10	7	Vzorek 6	2

Roztok byl nalit mezi sklíčka a do roztoku byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek k nanášení vzorků. Po 30 minutách byla sklíčka vložena do elektroforetické komůrky a do elektrodových prostorů byl nalit elektrodový pufr skládající se z  $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  trisaminomethanu,  $0,192 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  glycinu o pH 8,3.

Pro elektroforézu bylo použito 6 vzorků odebraných během jednotlivých kroků purifikace (1. vz. homogenát, 2. vz. vysolení 30% síranem amonným, 3. vz. vysolení 70% síranem amonným, 4. vz. řízená tepelná denaturace, 5. vz. 2-D iontoměničová chromatografie, 6. vz. gelová permeační chromatografie). K řaděným i neřaděným vzorkům byl přidán shodný objem Laemmliho pufru, výsledná směs promíchána, povařena při  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 5 minut a krátce ztočena na stolní centrifuze. Jako marker byl použit Brecison Plus Dual Collor Standard od firmy BioRAD s rozsahem 10-250 kDa. Vzorky a marker byly naneseny do jamek gelu (Tab. 3).

Napětí zdroje bylo nastaveno na 110 V a ve chvíli, kdy vzorky přešly do dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 140 V. Jakmile čelo vzorků (Bromfenolová modř) doputovalo na konec gelu (přibližně po 2 hodinách) byla elektroforéza ukončena a akrylamidový gel byl přes noc ponechán v barvicím roztoku na třepačce. Barvicí roztok obsahoval 40 % methanolu, 7 % kyseliny octové a 0,025 % barviva Coomassie Brilliant blue R250. K odstranění přebytečného barviva na gelu byl použit odbarvovací roztok obsahující 7 % kyseliny octové a 5 % methanolu v destilované vodě. Tento roztok byl použit třikrát po dobu jedné hodiny za stálého promíchávání na třepačce. Následně byl gel ponechán v destilované vodě a vyfocen pomocí Gel Doc<sup>TM</sup> EZ Imageru (BioRad).

Tab. 4 Množství vzorku pipetované do reakční směsi pro stanovení proteinů metodou kyseliny bicinchoninové.

Vzorek	Neředěný (μl/kyveta)	10x ředěný (μl/kyveta)
Homogenizace	2,5	5
Vysolení (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> v 30 % nasycení	2,5	5
Vysolení (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> v 70 % nasycení	0,5	2
Dialýza	0,5	2
Řízená tepelná denaturace	1	2,5
2-D iontová chromatografie	15	15
Gelová permeační chromatografie	20	20

### 3.4.4. Stanovení obsahu proteinů

Měření obsahu proteinů proběhlo pomocí bicinchoninové metody. Nejprve byla vytvořena kalibrační řada BSA standardu v rozsahu od 1 μg·ml<sup>-1</sup> do 40 μg·ml<sup>-1</sup>). Následně byla změřena koncentrace bílkovin v 7 vzorcích odebraných při purifikaci. Do kyvety byly napipetovány 2 ml roztoku BCA činidla se síranem měďnatým (50 ml bicinchoninové směsi, 1 ml síranu měďnatého o koncentraci 1 mol·l<sup>-1</sup>). Posléze byl přidán roztok BSA roztok o koncentraci 1,0 mmol·ml<sup>-1</sup> v objemu potřebném pro dosažení příslušné koncentrace dle kalibrační řady, množství vzorků bylo aplikováno dle (Tab. 4). Po 30 minutách inkubace při 37 °C byla změřena absorbance při 562 nm.

### 3.4.5. Stanovení aktivity enzymu

K měření aktivity i substrátové specifity PsAO, byla využita spřažená reakce s peroxidasou, kdy byl vzniklý peroxid vodíku detekován oxidací AAP a DCHBS. Zásobní roztok obsahoval 100 μg·l<sup>-1</sup> křenové peroxidasy, 1,25 μmol·l<sup>-1</sup> DCHBS a 125 μmol·l<sup>-1</sup> AAP rozpuštěné ve fosforečnanovém pufru (100 mmol·l<sup>-1</sup>, pH 7,0).

Pro stanovení aktivity PsAO u jednotlivých kroků purifikace byl použit roztok putrescinu o koncentraci 100 mmol·l<sup>-1</sup> ve fosforečnanovém pufru s totožnou koncentrací a pH 7,0. K měření byl využit UV-VIS spektrofotometr 8453 od firmy Agilent. Do kyvety bylo napipetováno 1600 μl zásobního roztoku, příslušné množství purifikačního vzorku a vody viz Tabulka č. 5, aby výsledný reakční objem v kyvetě byl 2000 μl. Takto připravený vzorek byl vyblankován a reakce byla odstartována přidáním 20 μl roztoku putrescinu (100 mmol·l<sup>-1</sup>). Měření probíhalo ve 3 replikacích v kinetickém modu po dobu 6 minut při 515 nm a 30 °C za stálého míchání magnetickým míchadlem.

Tab. 5 Množství jednotlivých složek pro stanovení aktivity enzymu.

Vzorek purifikace	Množství zásobního roztoku ( $\mu\text{l}$ )	Množství vzorku z purifikace ( $\mu\text{l}$ )	Voda ( $\mu\text{l}$ )	Putrescin ( $\mu\text{l}$ ) $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Homogenizace	1600	20	360	20
Vysolení $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v 30 % nasycení	1600	20	360	20
Vysolení $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v 70 % nasycení	1600	2	378	20
Dialýza	1600	2	378	20
Řízená tepelná denaturace	1600	2	378	20
2-D iontová chromatografie	1600	5	375	20
Gelová permeační chromatografie	1600	2	378	20

### 3.4.6. Stanovení substrátové specifity PsAO a měření se směsí aminů v koncentracích typických pro pivo

Substrátová specifita vybraných aminů (PUT, CAD, HIST, AMG, TRYPT, TYR, PHEA, SPD, SPM) a směsi těchto aminů byla stanovena pro koncentraci  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Směs aminů, jejichž koncentrace odpovídá poměrnému zastoupení jednotlivých aminů v pivu, byla připravena z roztoků jednotlivých aminů ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ve fosfátovém pufru o koncentraci  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Tab. 6).

K samotnému měření bylo použito jako v případě měření aktivity enzymu  $1600 \mu\text{l}$  zásobního roztoku, příslušné množství 10krát ředěného enzymu a vody, tak aby po přidání substrátu byl celkový objem  $2000 \mu\text{l}$ . Reakce byla odstartována přidáním příslušného množství substrátu, aby jeho koncentrace odpovídala  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měření probíhalo při  $515 \text{ nm}$  na totožném spektrofotometru jako v případě měření aktivity. Doba měření se lišila v závislosti na použitém substrátu (3-60 minut). Pro aminy, u kterých se dle literatury očekávalo, že budou dobrými substráty, se zvolila kratší doba měření. Naopak pro směs aminů a aminy, které dle literatury jsou špatnými substráty, byla použita delší doba měření.

Tab. 6 Složení směsi aminů použité jako modelová směs aminů obsažených v pivu. Zásobní roztok by připraven o koncentraci  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Amin	PUT	CAD	SPD	SPM	AGM	PHEA	TYR	TRYPT	HIS
n/n (%)	23,06	14,83	1,91	1,82	31,96	0,57	16,65	1,63	7,56

Pro určení základních kinetických parametrů byly použity různé koncentrace aminů i směsi ( $20\text{-}8000\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v závislosti na použitém substrátu tak, aby pro každý substrát bylo provedeno měření při minimálně 15 koncentracích substrátu. Pro ověření vlivu ethanolu na působení PsAO byly provedeny měření se směsí aminů tak, aby výsledná koncentrace ethanolu v květetě po přidání reakční směsi, substrátů a enzymu byla 0,5 % a 1 %, což odpovídalo koncentraci ethanolu v reakční směsi po přidavku vzorků piva. Základní kinetické parametry ( $K_m$ ,  $V$ ) byly poté vypočítány pomocí programu GraphPAD Prism 5.

### 3.4.7. Měření se vzorky piv

Pro měření bylo pořízeno 20 vzorků různých druhů piv (tmavá, polotmavá, světlé ležáky viz tabulka 6) v originálně zabalených lahvích. Osmnáct piv od českých pivovarů bylo zakoupeno v olomouckých a ostravských supermarketech, 2 piva byla dovezena z Belgie. Z každého piva byl odebráno kolem 40 ml do zkumavky a zamraženo.

Tab. 6 Základní informace o pivech použitých jako substráty PsAO.

Číslo vzorku	Pivovar - název piva	Obsah ethanolu	Druh piva
Vzorek č. 1	Ostravar – Originál	4,1 %	Světlý ležák
Vzorek č. 2	Budweiser Budvar – B classic	4,0 %	Světlý ležák
Vzorek č. 3	Krušovice královský pivovar – 10 ze žateckého chmele	4,2 %	Světlý ležák
Vzorek č. 4	Plzeňský prazdroj – Pilsner Urqell	4,4 %	Světlý ležák
Vzorek č. 5	Rohozec – Dvanáctka	5,3 %	Světlý ležák
Vzorek č. 6	Porter – Original Dark Beer	8,0 %	Tmavý ležák
Vzorek č. 7	CHIMAY – PÉRES TRAPPISTES	9,0 %	Polotmavé belgické pivo
Vzorek č. 8	Cuvee des Trolls	7,0 %	Světlé belgické pivo
Vzorek č. 9	Gambrinus – Plná 12	5,2 %	Světlý ležák
Vzorek č. 10	Velkopopovický kozel - 11	4,6 %	Světlý ležák
Vzorek č. 11	Braník – Světlý	4,1 %	Světlý ležák
Vzorek č. 12	Radegast – Birel	0,5 %	Světlý ležák
Vzorek č. 13	Primus – Výčepní světlé	3,8 %	Světlý ležák
Vzorek č. 14	Holba – Šerák	4,7 %	Světlý ležák
Vzorek č. 15	Zubr – Grand 11	4,8 %	Světlý ležák
Vzorek č. 16	Zlatopramen	3,8 %	Světlý ležák
Vzorek č. 17	Staropramen – Granát	4,8 %	Polotmavý ležák
Vzorek č. 18	Lobkowicz – Ale Premium	4,4 %	Světlý ležák
Vzorek č. 19	Radegast – Ryze hořká 12	5,1 %	Světlý ležák
Vzorek č. 20	Litovel – Free	0,5 %	Světlý ležák



Pro jednotlivá měření, která probíhala za obdobných podmínek jako měření s aminy jakož substráty PsAO, bylo použito 400  $\mu\text{l}$  piva jako substrátu, 1600  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku a 5  $\mu\text{l}$  10x ředěného enzymu. Každý vzorek byl měřen ve čtyřech replikacích po dobu 1 hodiny.

### **3.4.8. Referenční stanovení koncentrace aminů ve vzorcích pív pomocí UHPLC**

Pro měření byly vytvořeny kalibrační roztoky směsi aminů (PUT, CAD, AGM, PHEA, HIST, TYR, TRYPT, SPM a SPD) v rozsahu koncentrací od 1,0  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  do 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Připravené kalibrační roztoky byly společně se vzorky pív zderivatizovány pomocí benzoylchloridu. K derivaci aminů a polyaminů byl využit upravený pracovní postup z laboratorního cvičení experimentální metody biochemie pro 1. ročník magisterského studia k úloze Stanovení polyaminu v rostlinných extraktech (Bouchereau *et al.*, 2000; Taibi *et al.*, 2000).

Pro přípravu kyselé extrakce derivovaných kalibračních standardů bylo použito 100  $\mu\text{l}$  jednotlivých standardů, pro přípravu derivovaných vzorků bylo použito 20  $\mu\text{l}$  vzorku s 80  $\mu\text{l}$  deionizované vody. Ke všem roztokům bylo přidáno 900  $\mu\text{l}$  kyseliny trichloroctové, 2000  $\mu\text{l}$  hydroxidu sodného (2  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a 10  $\mu\text{l}$  čerstvě připraveného benzoylačního činidla (50 % benzoylchlorid, 50 % ethanol). Každá směs byla důkladně protřepána na vortexu a poté 40 minut ponechána stát. Po 40 minutách byly přidány 2 ml chloridu sodného. K okyselení byl použit 1 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 3,73  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a pro udržení požadovaného kyselého pH byl přidán 1 ml fosfátového pufru o koncentraci 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následný 2 ml dietyletheru pro extrakci derivátů aminů. Po důkladném protřepání na vortexu (3x 10s) a oddělení obou fází (dietylether-voda), bylo odebráno 1500  $\mu\text{l}$  etherového extraktu do mikrozkuhavky a odpařeno při 55  $^{\circ}\text{C}$ . K vzorkům byly přidány další 2 ml dietyletheru a postup extrakce byl zopakován, avšak bylo odebráno jen 1200  $\mu\text{l}$  etherové fáze do téže mikrozkuhavky a odpařeno. Mikrozkuhavky s odpařenými extrakty byly skladovány ve tmě a teplotě do 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Připravené vzorky a kalibrační standardy byly rozpuštěny v mobilní fázi (50% methanol) a analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS. Analýzu vzorků zařídil vedoucí bakalářské práce u týmu pana docenta Tarkowského.

Tab. 7 Množství mobilní fáze B dávkované pumpami v čase.

čas (min)	0,01	2,20	3,40	8,50	10,00	12,00	15,00
B fáze (%)	8	8	57	90	90	10	8

Měření bylo provedeno na UHPLC sestavě SHIMADZU, která se skládala z řídicí jednotky CBM 20, pumpy Nexera x2 LC 30AD, autosampleru Nexera x2 SIL BOAL, kolonového prostoru CTO 20AC, kolony Nucleodur C18 Gravity s rozměry 100 x 2 mm a velikostí částic 1,8  $\mu\text{m}$ , degaseru DGu-20A5R a MS-detektoru LCMS 8050.

K analýze byl použit gradient dvou mobilních fází A a B. Mobilní fáze A se skládala z vodného roztoku kyseliny mravenčí o pH 3,5 o koncentraci 15  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; pH bylo upraveno pomocí hydroxidu amonného. Jako druhá mobilní fáze (B) byl použit methanol. Složení mobilní fáze v průběhu analýzy ukazuje tabulka 7. Derivované aminy a polyaminy, které byly rozděleny na koloně pomocí UHPLC, byly následně ionizovány eletrosprejem v pozitivním módu s následnou detekcí vzniklých fragmentů. Získaná data o kvantifikačních a konformačních přechodech (Tab. 8) byla analyzována pomocí softwaru, který byl součástí softwarového vybavení chromatografické jednotky (Rittenberg a Foster, 1940; Novák *et al.*, 2008).

Tab. 8 Monitorovací okna, kvantifikační a konformační přechody pro jednotlivé aminy

Amin	monitorovací okno (min)		$[\text{M}+\text{H}]^+$	kvant. přechod	m/z	
	od	do			konf. přechod 1	konf. přechod 2
PUT	4,6	6,0	296,80	296,80 > 105,15	296,80 > 176,20	
CAD	4,8	6,2	311,10	311,10 > 105,20	311,10 > 190,20	
SPD	5,8	6,9	457,80	457,80 > 104,50	457,80 > 162,05	457,80 > 336,30
SPM	6,0	7,3	618,90	618,90 > 497,25	618,90 > 162,25	618,90 > 105,15
AGM	3,6	5,2	339,20	339,20 > 105,15	339,20 > 176,15	
PHET	5,0	6,4	226,10	226,10 > 105,15	226,10 > 77,05	226,10 > 103,15
TYR	6,8	9,0	346,30	346,30 > 105,20	346,30 > 121,20	346,30 > 225,00
TRYPT	4,8	6,2	265,10	265,10 > 144,15	265,10 > 105,15	
HIST	0,0	4,2	216,10	216,10 > 95,00	216,10 > 105,10	

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. Vypěstování etiolovaných hrachových klíčků a purifikace hrachové aminoxidasy

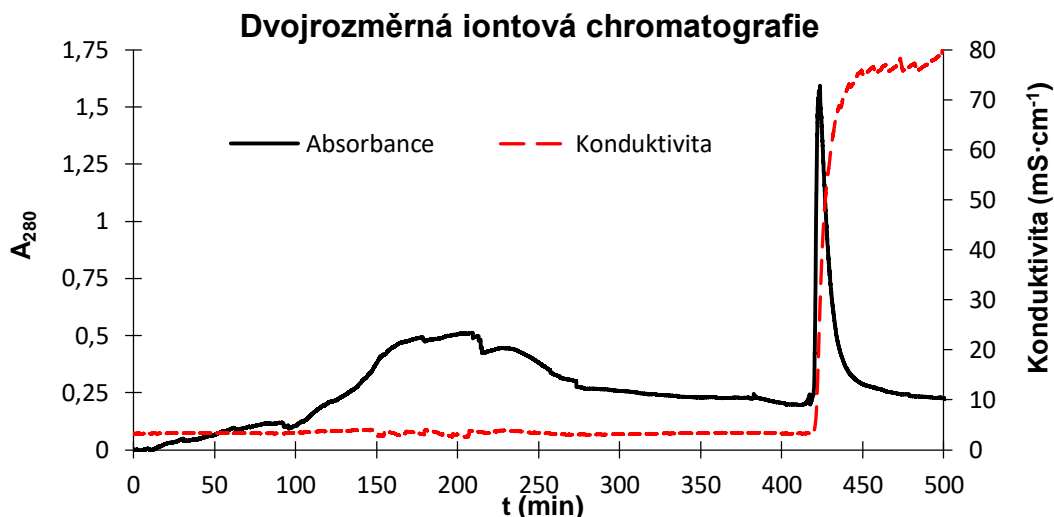
Ve třech pěstebních várkách bylo získáno 645, 635 a 840 g etiolovaných hrachových klíčků (Obr. 6). Celkové množství 2,12 kg bylo následně použito pro izolaci enzymu.



Obr. 6: Sedmidenní etiolované hrachové klíčky.

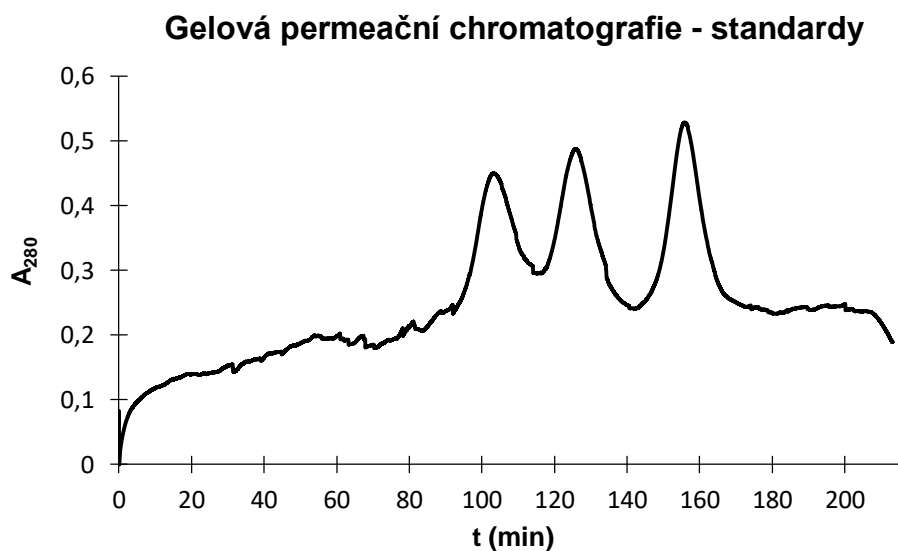
V prvním kroku izolace PsAO (homogenizace hrachových klíčků) bylo získáno 3380 ml homogenátu se specifickou aktivitou  $6,119 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Po prvním purifikačním kroku, 30% vysolení síranem amonovým, bylo získáno 3600 ml směsi, jejíž specifická aktivita se zvedla jen nepatrně ( $6,287 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Výrazné zvýšení aktivity nastalo po 70% vysolení síranem amonovým, kdy se specifická aktivita zvedla na  $16,89 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . V tomto kroku došlo také k 30% ztrátě celkové aktivity roztoku enzymu, která byla způsobena jak částečnou degradací PsAO tak degradací jiných látek oxidujících aminy. Řízenou tepelnou denaturací, se specifická aktivita enzymu zvýšila téměř dvojnásobně ( $29,95 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ ).

Nejvyšší nárůst specifické aktivity a taktéž nejvýraznější přečištění enzymu je patrné z použití tandemové iontoměničové a adsorbční chromatografie (Obr. 7), kdy specifická aktivita dosáhla hodnoty  $205,6 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . V tomto kroku purifikace byla zaznamenána nejvýraznější ztráta celkové aktivity. Ta byla způsobena jednak částečnou ztrátou enzymu při ultrafiltraci a jeho částečnou degradací, tak separací dalších enzymů, které mají schopnost oxidovat aminy.



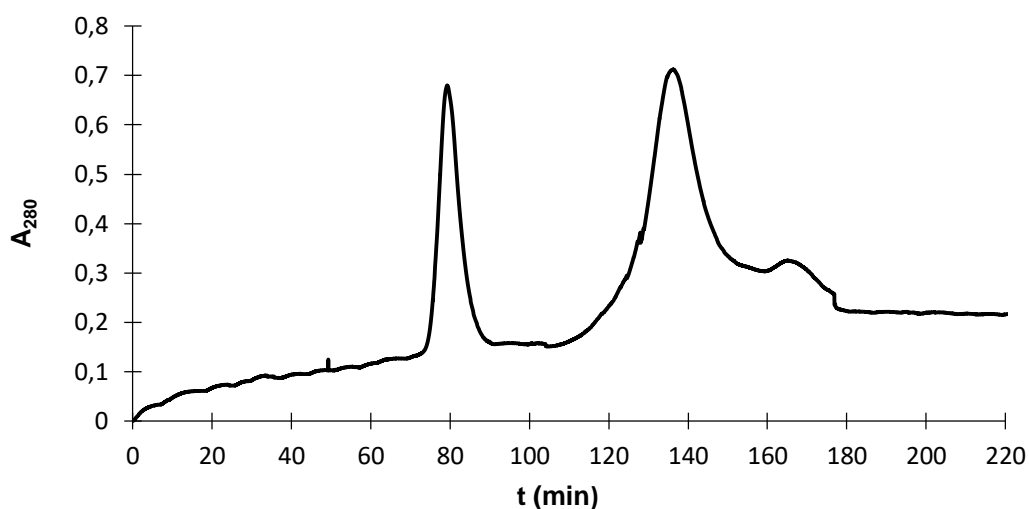
Obr. 7: Chromatogram 2-D iontové chromatografie. Eluce aminoxidasy je patrná v čase 420 minut od startu.

Poslední fází purifikace byla gelová permeační chromatografie (GPC). Z chromatogramu standardu (Obr. 8) je patrné že vrchol eluce aminoxidasy se nachází kolem 125 minut. Eluce aminoxidasy při purifikaci byla zachytávána v elučním čase 110-140 min (Obr. 9). Bylo získáno 49 ml eluce, která byla ultrafiltrací zahuštěna na 13 ml roztoku, který obsahoval 39,59 mg proteinu o specifické aktivitě  $220,0 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ .



Obr. 8: Chromatogram standardů. Eluční čas aminoxidasy se nachází mezi 110-140 minutou.

### Gelová permeační chromatografie - PsAO



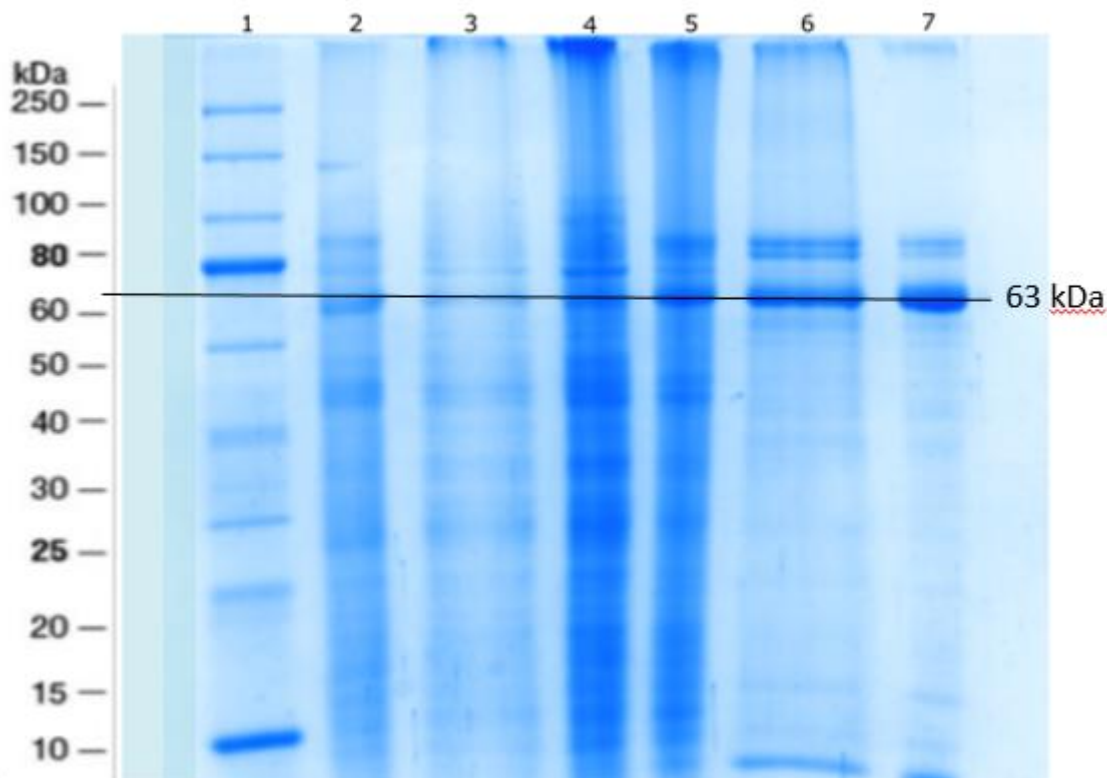
Obr. 9: Chromatogram gelové permeační chromatografie hrachové aminoxidasy.

Purifikovaný enzym byl pro následnou práci a měření v získán dostatečné čistotě a s dostatečně vysokou aktivitou. Rovněž množství enzymu bylo postačující. Všechny kroky purifikace jsou přehledně shrnuty v purifikační tabulce (Tab. 8).

Přečištění a zakoncentrování enzymu je patrné z elektroforegramu (Obr. 10) purifikace hrachové aminoxidasy získaného pomocí SDS PAGE elektroforézy na 10% akrylamidovém gelu. Molekulová hmotnost nejsilnějšího píku (vzorek č. 7 – přečištění GPC) 63 kDa odpovídá molekulové hmotnosti podjednotky PsAO.

Tab. 8 Izolace PsAO ze sedmidenních etiolovaných hrachových klíčků – purifikační tabulka.

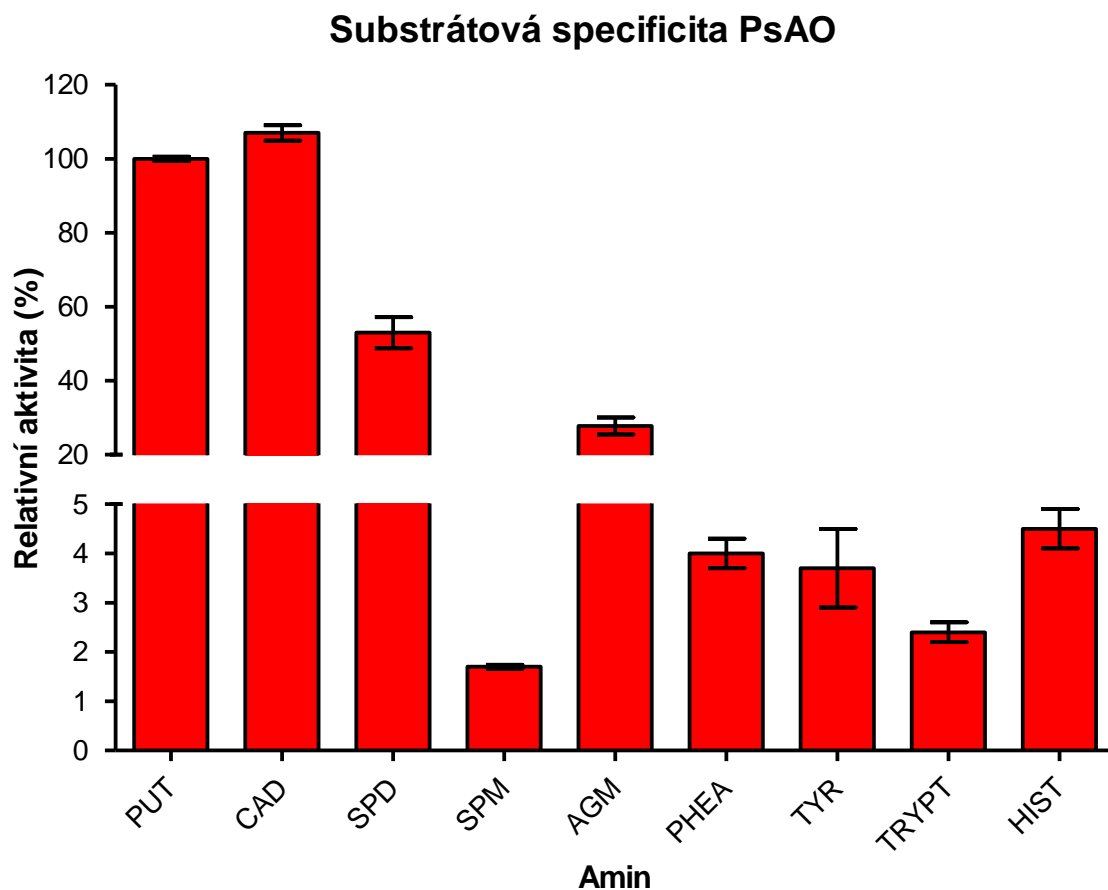
Purifikační krok	Celkový objem (ml)	Celková hmotnost (mg)	Celková aktivita (nkat)	Specifická aktivita (nkat·mg <sup>-1</sup> )	Výtěžek	Stupeň přečištění
Homogenizace	3380	31820	1947000	6,119	100%	1
vysolení (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> v 30 % nasycení	3600	30330	1907000	6,287	98%	0
vysolení (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> v 70 % nasycení	315	7809	1319000	16,89	68%	2,8
řízená tepelná denaturace	365	3954	1184000	29,95	61%	4,9
2D iontová chromatografie	100	121,0	248800	205,6	13%	33,6
gelová permeační chromatografie	13	39,59	87880	220,0	4,5%	36,3



Obr. 10: Elektroforegram purifikace PsAO. Vzorky v jednotlivých jamkách: (1) Marker, (2) Homogenát, (3) 30% vysolení  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (4) 70% vysolení  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (5) Řízená tepelná denaturace, (6) 2-D iontoměničová chromatografie, (7) GPC.

#### 4.2. Stanovení substrátové specifity PsAO

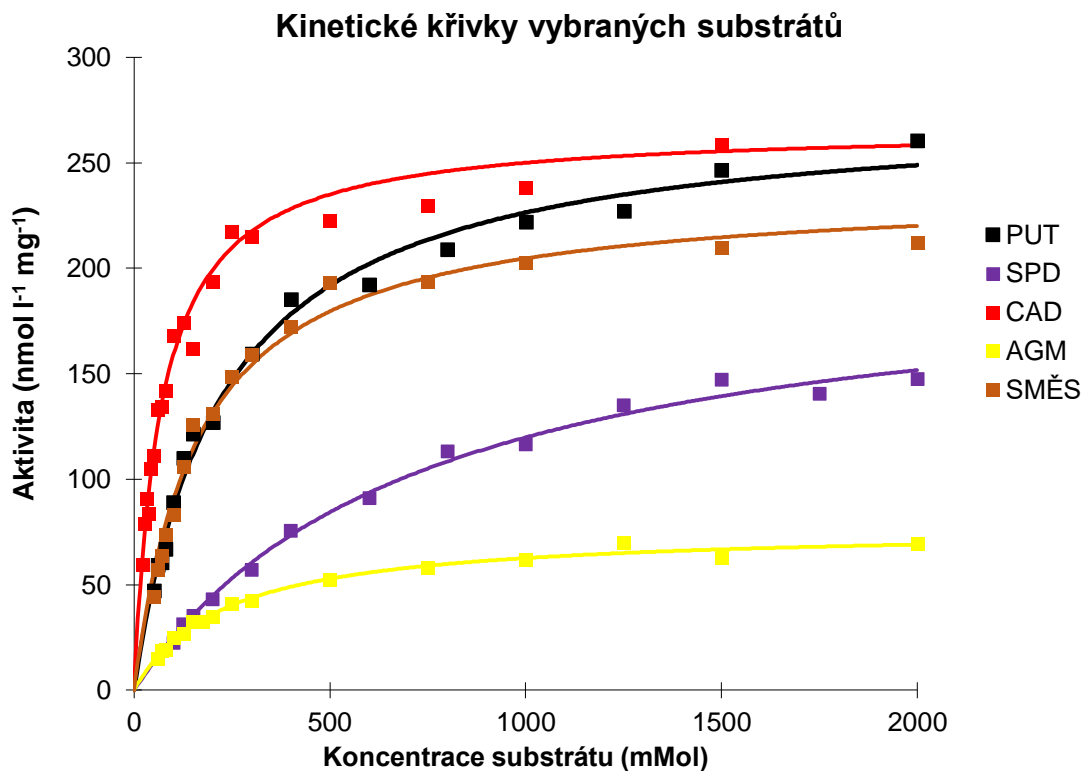
Substrátová specifita změřená pro jednotlivé substráty  $[\text{S}] = 1,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  při  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  byla vyhodnocena v podobě grafu (Obr. 11). Hodnoty relativní aktivity jsou uvedeny v % aktivity substrátu vůči aktivitě putrescinu. Nejlepšími substráty PsAO byli putrescin a kadaverin, o něco horšími pak spermidin a agmatin. Spermin, fenylethylamin, tyramin, tryptamin a histamin byli pro PsAO slabými substráty, neboť jejich aktivita dosahovala hodnot do 5 % aktivity putrescinu. Stanovené hodnoty substrátové specifity jednotlivých aminů odpovídaly hodnotám nalezených v literatuře.



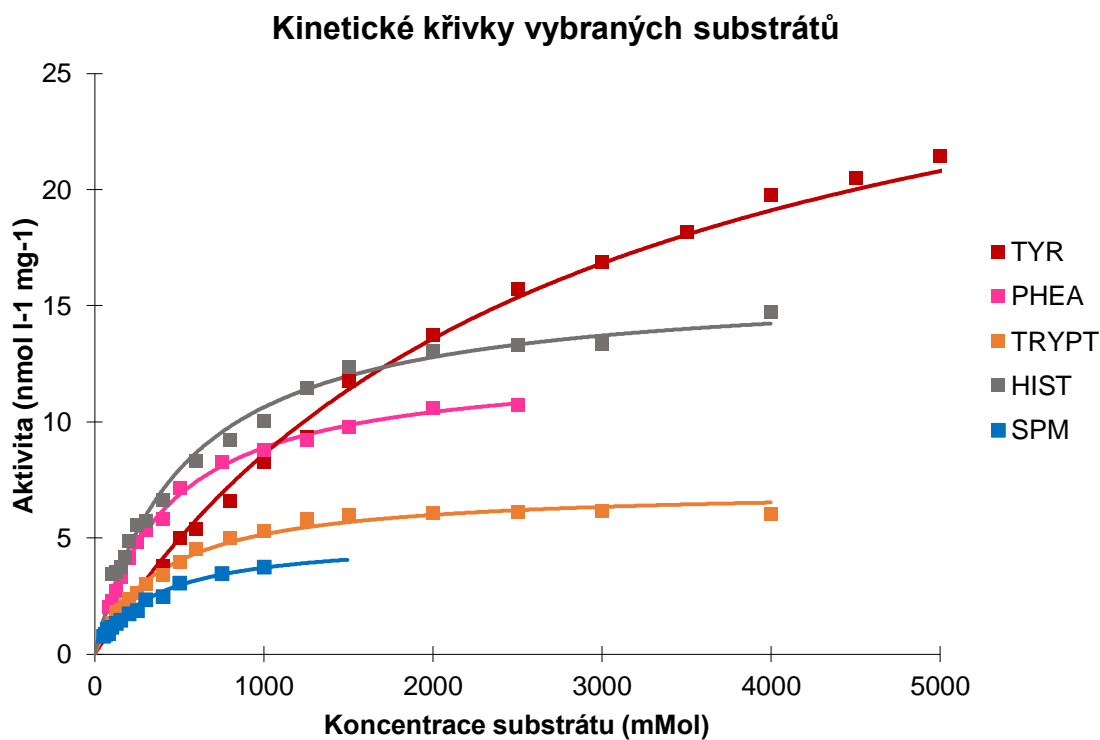
Obr. 11: Substrátová specifita PsAO vůči vybraným aminům.

### 4.3. Kinetické parametry PsAO

Z kinetiky reakcí měřených při 30 °C vyplývá, že nejlepším substrátem pro PsAO je kadaverin u kterého poměr  $V/K_m$  odpovídá 321,14 % hodnoty pro oxidaci putrescinu (Tab 9.) Nižší poměr  $V/K_m$  je pozorovatelný u spermidinu a agmatinu (22,72 a 26,49 % PUT). Nejnižší poměr  $V/K_m$  má tyramin a to pouhých 0,94 % PUT. Směs aminů je na tom podobně jako samotný putrescin (116,62 %). Kinetické křivky jednotlivých substrátů jsou znázorněny na grafech uvedených níže (Obr. 12 a 13).



Obr. 12: Kinetické křivky pro substráty putrescin, spermidin, kadaverin, agmatin a směs aminů.



Obr. 13: Kinetické křivky pro substráty tyramin, fenylethylamin, tryptamin, histamin a spermin.



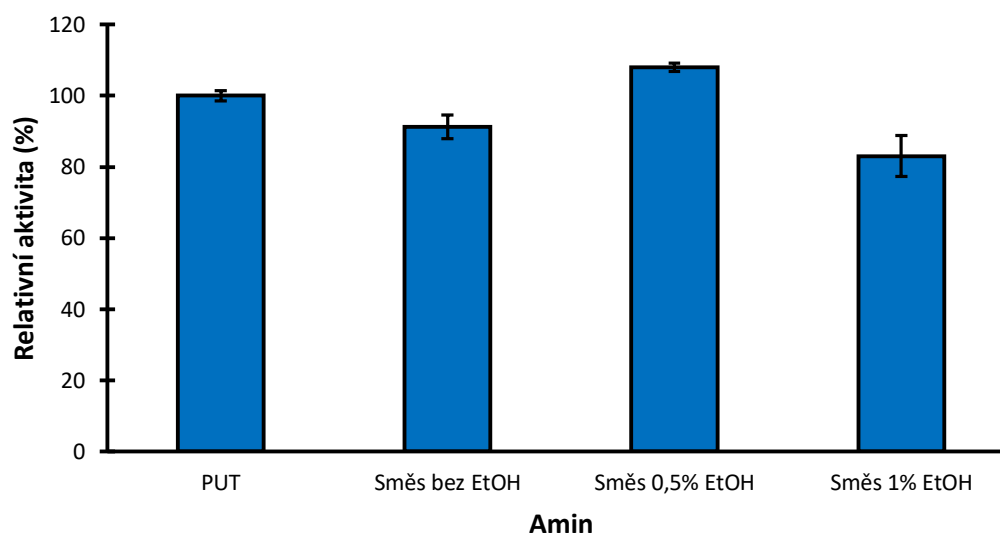
Tab. 9 Základní kinetické parametry PsAO pro jednotlivé substráty.

Amin	$K_m$	$V$	$V/K_m$
	$\mu\text{M}$	nkat/mg	Relativní
PUT	220,4 ± 13,77	276,3 ± 5,514	100,00
CAD	68,27 ± 5,67	267,1 ± 6,38	321,14
SPD	726,5 ± 59,9	206,9 ± 7,185	22,72
SPM	350,9 ± 35,63	5,02 ± 0,243	1,14
AGM	227,6 ± 12,85	76,88 ± 1,469	26,94
PHET	419,7 ± 16,01	12,61 ± 0,1723	2,40
TYR	2746 ± 176	32,21 ± 0,8859	0,94
TRYPT	390,6 ± 25,9	7,168 ± 0,1504	1,46
HIST	511 ± 32,36	16,05 ± 0,3388	2,51
SMĚS	162,8 ± 11,51	238 ± 5,426	116,62

#### 4.4. Vliv ethanolu na PsAO

Z grafu ovlivnění substrátové specifity ethanolem (Obr. 14) je patrné, že substrátová specifita není obsahem ethanolu do 1 % (v/v) výrazně ovlivněna. Oproti tomu poměr  $V/K_m$  s přidávkem alkoholu klesá (Tab. 10), přičemž u směsi v 1% ethanolu byl poloviční oproti směsi bez ethanolu, což značí denaturaci aminoxidasy ethanolem.

#### Ovlivnění Substrátové specifity ethanolem

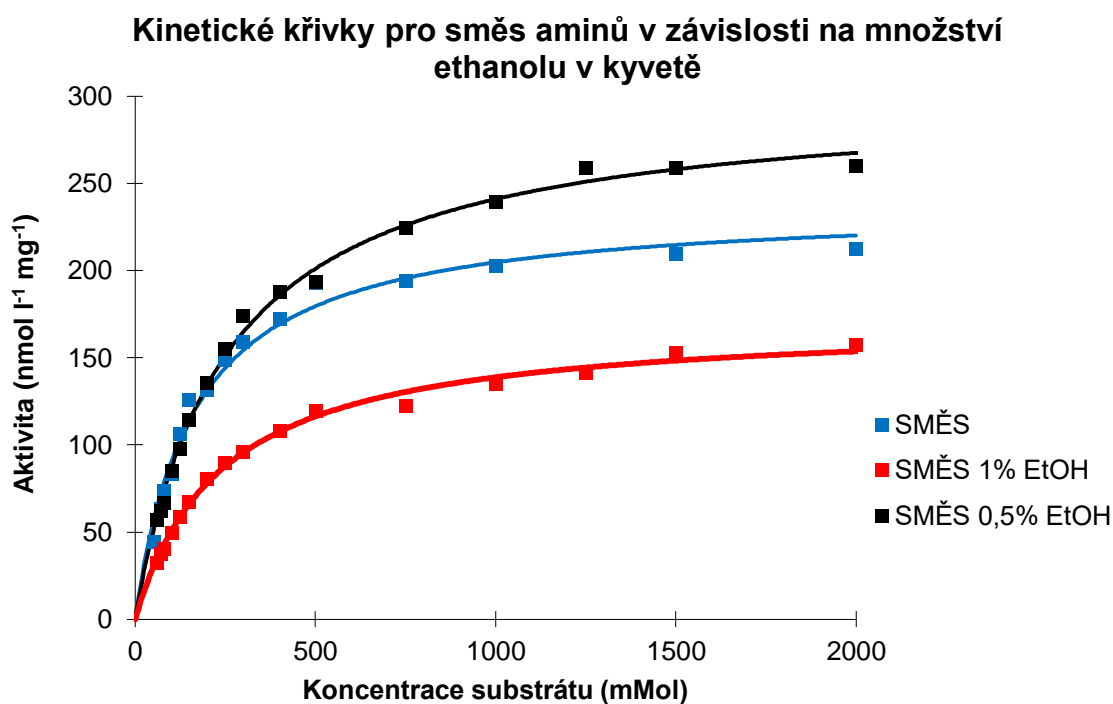


Obr. 14: Závislost substrátové specifity na množství ethanolu.

Tab. 10 Základní kinetické parametry PsAO pro směs aminů v závislosti na množství ethanolu.

Směs aminů	$K_m$	$V$	$V/K_m$
	$\mu\text{M}$	nkat/mg	Relativní
bez EtOH	$162,8 \pm 11,51$	$238 \pm 5,426$	116,62
0,5% EtOH	$247,6 \pm 10,11$	$300,6 \pm 4,149$	96,85
1% EtOH	$240 \pm 10,72$	$172,1 \pm 2,576$	57,20

Z grafu kinetických křivek podle množství ethanolu v reakční směsi (Obr. 15) je taktéž viditelná mírná degradace enzymu u směsi s 1 % ethanolu. Pro relevantnější výsledky vlivu ethanolu na chování PsAO by muselo být provedeno větší množství měření s různými objemovými procenty ethanolu v kyvetě.

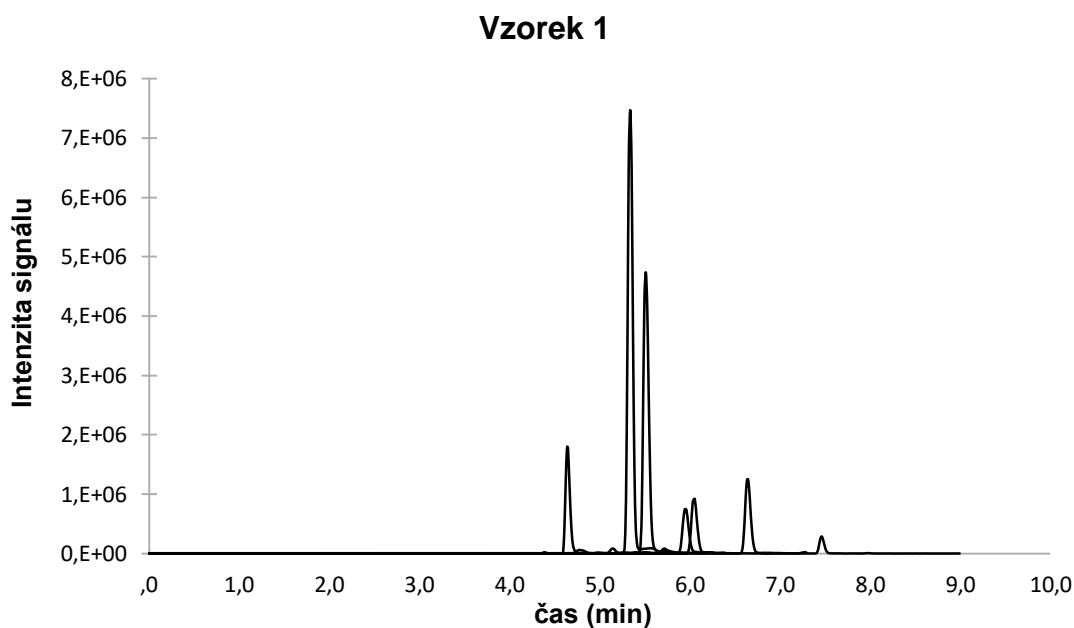


Obr. 15: Kinetické křivky pro směs aminů a směsi aminů s 0,5 a 1 % ethanolu v kyvetě.

#### 4.5. Množství biogenních aminů ve vzorcích piv stanovených pomocí UHPLC-MS/MS

Vyhodnocení koncentrace biogenních aminů bylo provedeno z odečtu intenzity signálů jednotlivých aminů a jejich standardů (Obr. 16). Koncentrace jednotlivých biogenních aminů se u vzorků piv značně lišila (Tab. 12). Naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí  $0,24\text{-}201,78 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Rozdílné koncentrace jsou způsobeny především

odlišnými technologickými postupy při výrobě piva (délka kvašení, teplota, způsob kvašení piva) a druhem použitých surovin.



Obr. 16: Chromatogram vzorku č. 1 ukazující eluční čas a intenzitu signálu UHPLC-MS/MS

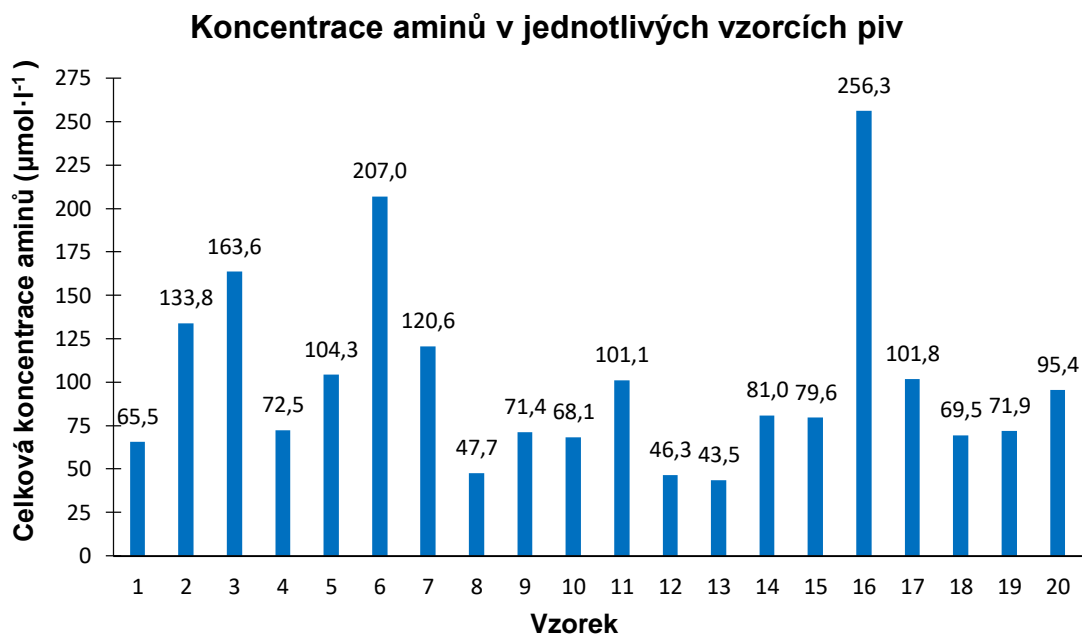
Největší rozdíly v koncentracích byly pozorovány u tyraminu ( $3,58\text{--}201,78 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Výrazně zvýšená koncentrace tyraminu ve vzorku značí jeho mikrobiální kontaminaci. Tato kontaminace mohla vzniknout během výroby piva (kvašení, plnění lahví, nedostatečná pasterizace), v průběhu skladování, ale také znečištěním odebraného vzorku či jinými chybami při analýze. Toxická dávka tyraminu se pohybuje v závislosti na citlivosti jedince mezi  $100\text{--}800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Santos, 1996). Pro osoby užívající inhibitory MAO může být nebezpečný celkový příjem  $6 \text{ mg}$  tyraminu (Shalaby, 1997). Nejvyšší naměřená koncentrace tyraminu  $201,78 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  odpovídá  $27,68 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a tudíž může těmto jedincům způsobit zdravotní potíže.

U alkoholických nápojů, z důvodu inhibice aminoxidas, se doporučuje limit pro histamin  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (Maintz a Novak, 2007). Nejvyšší zaznamenaná koncentrace histaminu ( $6,80 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) odpovídá  $0,756 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , což je výrazně méně, než doporučená maximální hodnota. U čtyřech vzorků byla koncentrace histaminu pod detekčním limitem.

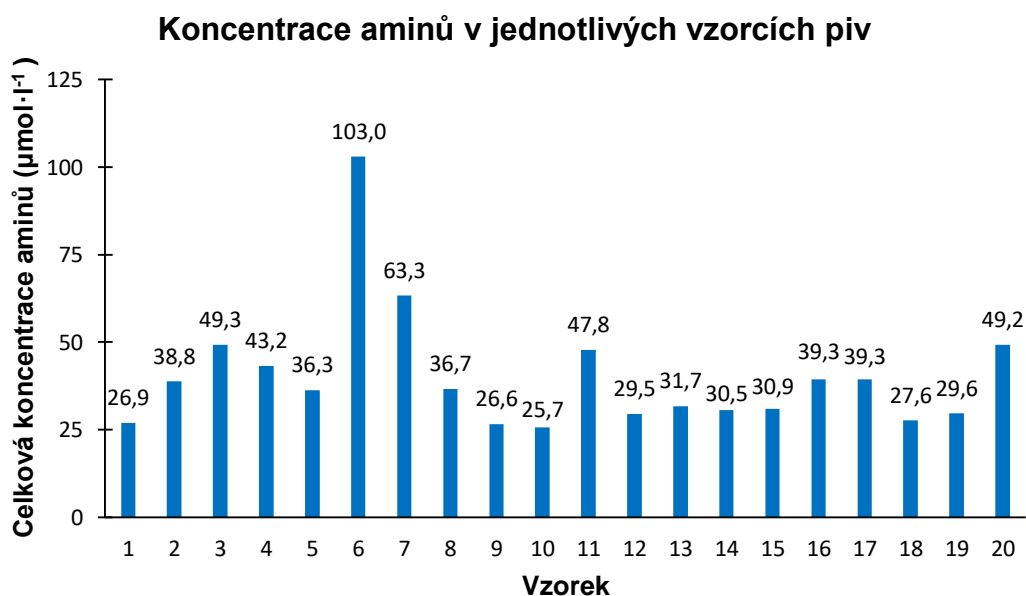
Tab. 12 Množství jednotlivých aminů obsažených v jednotlivých vzorcích pív. Koncentrace jednotlivých aminů je uvedena v  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Vzorek	Amin ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )								
	PUT	CAD	SPD	SPM	AGM	PHET	TYR	TRYPT	HIST
1	9,94	4,40	0,93	1,18	8,22	3,30	27,50	5,05	4,98
2	44,19	19,48	0,59	0,72	39,69	2,88	16,26	5,03	4,98
3	16,6	9,4	1,5	1,76	16,02	7,34	100,68	4,99	5,28
4	21,72	7,92	0,86	0,49	9,89	2,62	18,14	5,01	5,82
5	22,11	35,82	0,84	0,34	7,3	2,78	23,35	4,97	6,80
6	44,4	18,2	3,43	0,98	56,8	3,48	69,52	5,03	5,14
7	41,8	12,3	5,83	10,15	21,13	2,70	16,57	5,16	4,94
8	11,08	1,53	0,67	0,37	11,25	2,34	10,46	5,06	4,95
9	20,09	7,99	1,81	0,91	13,74	2,58	14,24	5,04	4,95
10	16,5	5,6	1,24	0,70	19,7	2,51	11,61	4,99	5,20
11	18,67	5,75	3,00	1,07	29,05	2,58	36,02	4,98	n. d.
12	12,85	3,36	2,44	0,74	10,48	2,45	9,00	5,02	n. d.
13	12,91	3,69	0,84	0,57	10,92	2,37	7,15	5,01	n. d.
14	19,21	12,92	2,47	0,37	19,39	2,55	14,07	5,02	4,96
15	20,62	11,07	0,48	0,40	16,27	2,55	17,23	5,09	5,89
16	15,39	6,85	1,91	1,23	15,26	3,70	201,78	5,12	5,03
17	46,9	35,3	0,24	0,37	3,17	2,27	3,58	5,01	5,05
18	25,85	4,99	0,94	0,26	13,13	2,79	11,58	4,97	4,95
19	23,25	7,14	2,36	1,03	14,69	2,51	10,64	5,12	5,19
20	25,3	44,9	1,4	0,35	10,8	2,56	5,08	4,99	n. d.
Průměr	23,47	12,93	1,69	1,20	17,35	2,94	31,22	5,03	5,26
Min	9,94	1,53	0,24	0,26	3,17	2,27	3,58	4,97	4,94
Max	46,87	44,89	5,83	10,15	56,81	7,34	201,78	5,16	6,80

Celková suma aminů ve vzorcích se pohybovala mezi 43,5 a 256  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  přičemž většina vzorků byla v rozmezí koncentrací 43,5-105  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  což je patrné z níže uvedeného grafu (Obr. 17). Obsah aminů získaný pomocí měření s PsAO (Obr. 18) je menší, než je tomu u stanovení pomocí UHPLC-MS/MS. Toto zkreslení sumy aminů je způsobeno rozdílnou kinetikou jednotlivých aminů vůči PsAO.



Obr. 17: Celková koncentrace aminů v jednotlivých vzorcích piv stanovená pomocí UHPLC-MS/MS.

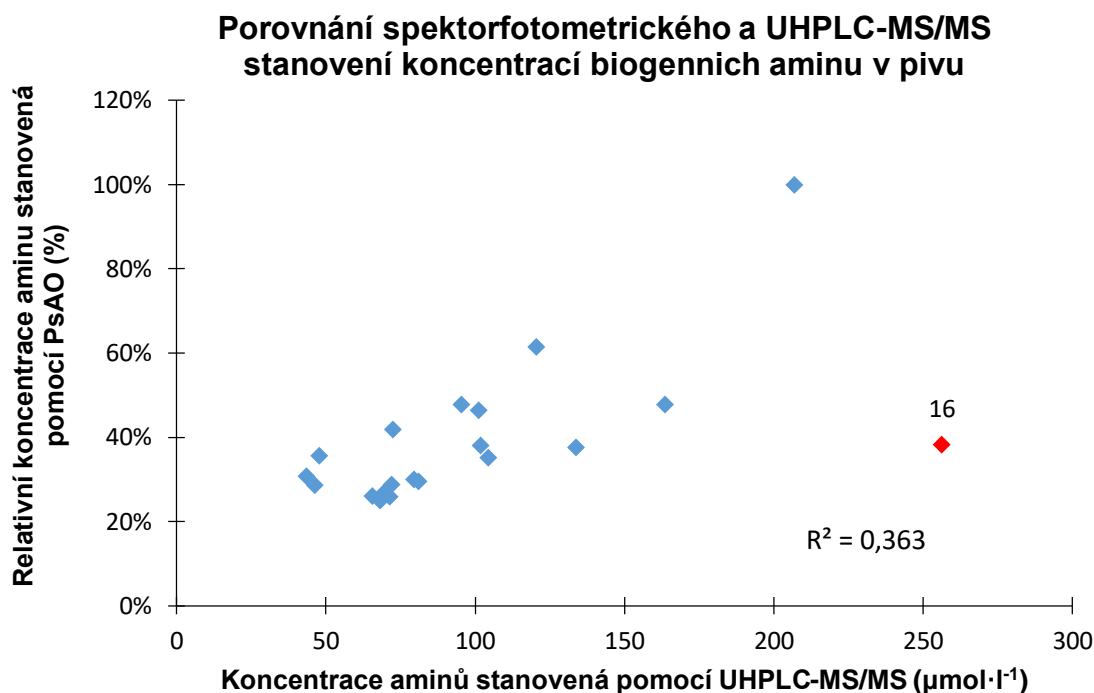


Obr. 18: Celková koncentrace aminů v jednotlivých vzorcích piv stanovená pomocí PsAO.

#### 4.6. Porovnání spektrofotometrického stanovení koncentrace aminů ve vzorcích s referenční metodou UHPLC-MS/MS

Koncentrace celkových aminů ve vzorku stanovená pomocí UHPLC-MS/MS byla porovnána s relativním množstvím aminů ve vzorku stanoveným spřaženou peroxidasovou reakcí detekující peroxid vodíku, který je vytvářený oxidativní

deaminací aminů pomocí PsAO. Při porovnání obou metod jsou sumy koncentrací všech devíti aminů vyskytujících se v pivu (PUT, CAD, AGM, SPM, SPD, HIST, PHEA, TYR, TRYPT) rozdílné. Z grafu (Obr. 19) je patrná vcelku nízká hodnota spolehlivosti ( $R^2=0,363$ ).

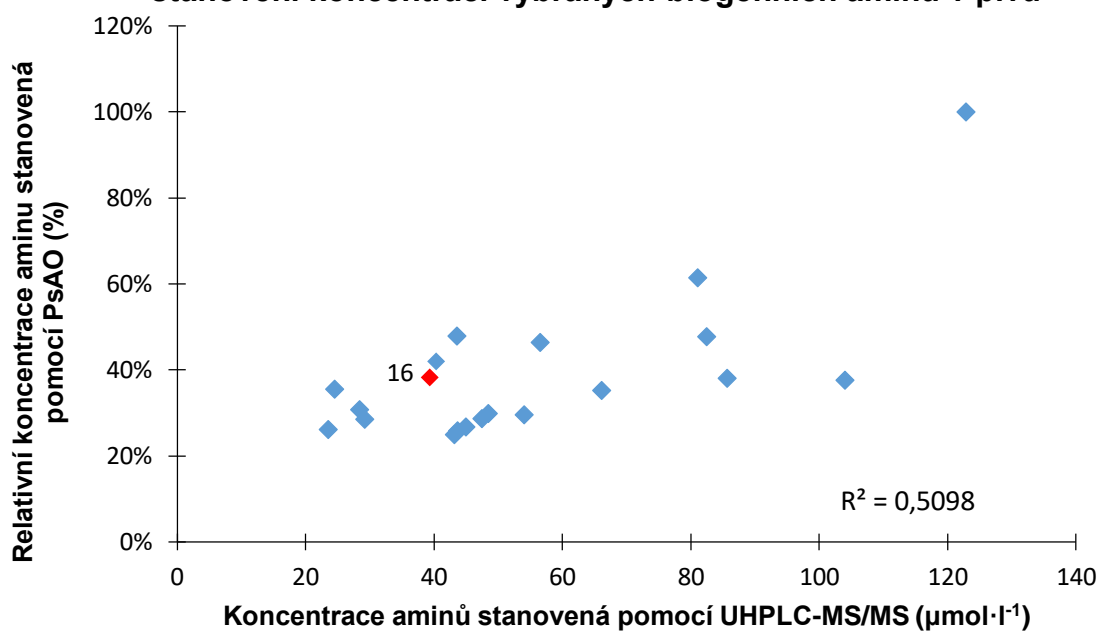


Obr. 19: Porovnání spektrofotometrického a UHPLC-MS/MS stanovení celkového množství biogenních aminů ve vzorcích. Nejvyšší koncentrace aminů stanovená pomocí PsAO je znázorněna jako 100 %.

Tento fakt je způsoben rozdílnou koncentrací jednotlivých aminů ve vzorcích, neboť PsAO aminů má vůči každému z nich jinou substrátovou specifitu. Nejvíce je patrný u vzorku č. 16 (vyznačen červeně), který má nejvyšší koncentraci aminů stanovenou pomocí UHPLC-MS/MS ( $256,27 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), avšak stanovení pomocí PsAO odpovídá pouze 38 % maximální koncentrace. Je to způsobeno tím, že ve vzorku je oproti jiným pivům vysoká koncentrace TYR, který má oproti PUT jen 0,94 % rychlost přeměny na odpovídající aldehyd.

Pro věrohodnější porovnání obou metod, byl graf (Obr. 20) upraven, aby byly zobrazeny jen čtyři nejlepší substráty PsAO (PUT, CAD, AGM, SPM). Hodnota spolehlivosti  $R^2$  se zvýšila na 0,5098. Patrný je i posun vzorku č. 16 (vyznačen červeně) doleva. V upraveném grafu odpovídá naměřená hodnota  $39,41 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  odpovídá 38 % maximální koncentrace stanovené pomocí PsAO a není tudíž příliš odchýlena.

**Porovnání spektrofotometrického a UHPLC-MS/MS stanovení koncentrací vybraných biogenních aminů v pivu**



Obr. 20: Porovnání spektrofotometrického a UHPLC-MS/MS stanovení celkového množství vybraných biogenních aminů (putrescin, kadaverin, agmatin, spermin) ve vzorcích. Nejvyšší koncentrace aminů stanovená pomocí PsAO je znázorněna jako 100 %.

Pro přesnější spektrofotometrické stanovení koncentrace aminů ve vzorcích by musela být použita směs několika různých druhů aminoxidasa: monaminoxidasa (TYR a TRYPT), diaminoxidasa - PsAO (PUT, CAD, AGM a SPM), polyaminoxidasa (SPM a SPD) a mikrobiální aminoxidasa, která preferuje substráty jako TYR, HIST, PHEA.

## 5. ZÁVĚR

Hlavním cílem bylo studium použitelnosti hrachové aminoxidasy (PsAO) při detekci biogenních aminů a polyaminů v pivu.

Z výsledků práce je patrné, že metoda je použitelná k detekci výskytu aminů v pivu, s možnou aplikací i u jiných potravin. Metoda má své výhody i nevýhody a bude předmětem další práce její nedostatky omezit.

K hlavním výhodám patří její jednoduchost a rychlost, kdy odpadá přechodí příprava a úprava samotných vzorků před analýzou, jak tomu bývá u HPLC (derivatizace s následnou extrakcí aminů, odpaření extrakčního rozpouštědla a rozpuštění v mobilní fázi). V neposlední řadě je taktéž nutno zmínit její finanční dostupnost. Tyto nepochybné výhody jsou zneváženy faktem, že enzymatické stanovení dává informaci pouze o sumě celkových aminů, nikoliv konkrétním množství jednotlivých složek. Získaná data jsou z důvodu rozdílné substrátové specifity jednotlivých aminů vůči PsAO zkreslené.

Možnost jak docílit lepších a přesnějších výsledků celkové koncentrace biogenních aminů ve vzorku, by bylo použití směsi několika druhů aminoxidas lišících se svou specifikou tak, aby byly v dostatečné míře oxidovány jak primární, tak sekundární, aromatické a heterocyklické aminy a polyaminy.



## 6. LITERATURA

- Angelini R., Federico R., Bonfante P. (1994): Maize Polyamine Oxidase: Antibody Production and Ultrastructural Localization. *Journal of Plant Physiology* **145**, 686-692.
- Ascenzi P., Fasano M., Marino M., Venturini G., Federico R. (2002): Agmatine oxidation by copper amine oxidase, Biosynthesis and biochemical characterization of *N*-amidino-2-hydroxypyrrolidine. *European Journal of Biochemistry* **269**, 884-892.
- Binda C., Mattevi A., Edmonson D. E. (2002): Structure-Function Relationships in Flavoenzyme-dependent Amine Oxidations. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 23973-23976.
- Bouchereau A., Guénot P., Larher F. (2000): Analysis of amines in plants materials. *Journal of Chromatography B* **747**, 49-67.
- BRENDA The Comprehensive Enzyme Information System (16.4.2018), [https://www.brenda-enzymes.org/search\\_result.php?quicksearch=1&noOfResults=10&a=9&W\[2\]=EC+1.4.3.6&T\[2\]=2&V\[8\]=1](https://www.brenda-enzymes.org/search_result.php?quicksearch=1&noOfResults=10&a=9&W[2]=EC+1.4.3.6&T[2]=2&V[8]=1)
- Buffoni F., Ignesti G. (2000): The Copper-Containing Amine Oxidases: Biochemical Aspects and Functional Role. *Molecular Genetics and Metabolism* **71**, 559-564.
- Buňka F., Budinský P., Čechová M., Drienovský V., Pachlová V., Matoušková D., Kubáň V., Buňková L. (2012): Content of biogenic amines and polyamines in beers from Czech Republic. *The Institute of Brewing & Distilling* **118**, 213-216.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavliadoraki P. (2006): Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* **11**, 80-88.
- Eisenreichová E., Haladová M., Bučková A., Tomko J., Uhrín D., Ubik K. (1992): A pyrroline-pyrrolidine alkaloid from *Lilium candidum* bulbs. *Phytochemistry* **31**, 1084-1085.
- EUR-Lex Access to European Union Law (25.4.2018), <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A32013R1019>
- Fossati P., Prencipe L., Berti G. (1980): Use of 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic Acid/4-Aminophenazone Chromogenic System in Direct Enzymic Assay of Uric Acid in Serum and Urine. *Clinical Chemistry*. **26**, 227-231
- Frébort I., Adachi O. (1995): Copper/Quinone-Containing Amine Oxidases, an Exciting Class of Ubiquitous Enzymes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 625-632.
- Glória M. B. A., Izquierdo-Pulido M. (1999): Levels and Significance of Biogenic Amines in Brazilian Beers. *Journal of Food Composition and Analysis* **12**, 129-136.
- Gómez-Alonso S., Hermosín-Gutiérrez I., García-Romero E. (2007): Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivates in Wine and Beer Samples. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 608-613.
- Handa A. K., Fatima T., Mattoo A. K. (2018): Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. *Frontiers in Chemistry* **6**, 1-17,
- Jiménez-Bremont J. F., Marina M., Guerrero-González M. L., Rossi F. R., Sánchez-Rangel D., Rodríguez-Kessler M., Ruiz O. A., Garriz A. (2014): Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interaction. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1-13.
- Kalač P., Křížek M. (2003): A Review of biogenic amines and Polyamines in Beer. *The Institute & Guild of Brewing* **109**, 123-128.
- Kalač P., Šavel J., Křížek M., Pelikánová T., Prokopová M. (2002): Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry* **79**, 431-434.
- Kirschbaum J., Rebscher K., Brückner H. (2000): Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. *Journal of chromatography A* **881**, 517-530.
- Kivirand K. a Rincken T. (2007): Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry* **56**, 164-171.
- Kumar V., Dooley D. M., Freeman C. H., Guss J. M., Harvy L., McGuirl M. A., Wilce M. C. J., Zubak V. M. (1996): Crystal structure of eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure* **4**, 943-955.

- Maintz L., Novak N. (2007): Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition* **85**, 1185-1196.
- Medda R., Padiglia A., Floris G. (1995): Plant Copper-Amine Oxidases. *Phytochemistry* **39**, 1-9.
- Mukherjee A., Smirnov V. V., Lanci M. P., Brown D. E., Shepard E. M., Dooley D. M., Roth J. P. (2008): An Inner-Sphere Mechanism for Molecular Oxygen Reduction Catalyzed by Copper Amine Oxidases. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 9459-9473.
- Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Doležal K., Strnad M. (2008): Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-2224.
- Pegg A. E. (2009): Mammalian Polyamine Metabolism and Function. *IUBMB Life* **9**, 880-894.
- Pegg A. E. (2016): Functions of Polyamines in Mammals. *The Journal of Biological Chemistry* **291**, 14904-14912.
- Pietrangeli P., Federico R., Mondovi B., Morpurgo L. (2007): Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry* **101**, 997-1004.
- Prabhakar R., Siegbahn P. E. M. (2001): A Theoretical Study of the Mechanism for the Reductive Half-reaction of Pea Seedling Amine Oxidase (PSAO). *The Journal of Physical Chemistry B* **105**, 4400-4408.
- Rangan P., Subramani R., Kumar R., Singh A. K., Singh R. (2014): Recent Advances in Polyamine Metabolism and Abiotic Stress Tolerance. *Hindawi Publishing Corporation* **239621**, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/239621>
- Rielander A. (1908): Einige neue Bestandteile des Extractum secalis cornuti. *Sitzungsberichte der Gesellschaft zur Beförderung der gesammten Naturwissenschaften zu Marburg* **7**, 173.
- Rittenberg D., Foster G. L. (1940): A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution with application to the determination of amino acids and fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **133**, 737-744.
- Santos M. H. S. (1996): Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology* **29**, 213-231.
- Seiler N. (2004): Catabolism of polyamines. *Amino Acids* **26**, 217-233.
- Shalaby A. R. (1997): Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* **29**, 675-690.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985): Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85.
- Son S. Y., Ma J., Kondou Y., Yoshimura M., Yamashita E., Tsukihara T. (2008): Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5739-5744, [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0710626105](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0710626105)
- Šebela M., Luhová L., Frébort I., Faulhammer H. G., Hirota S., Zajoncová L., Stružka V., Peč P. (1998): Analysis of the Active Sites of Copper/Topa Quinone-containing Amine Oxidases From *Lathyrus odoratus* and *L. sativus* Seedlings. *Phytochemical Analysis* **9**, 211-222.
- Taibi G., Schiavo M. R., Gueli M. C., Calanni Rindina P., Muratore R., Nicotra C. M. A. (2000): Rapid and simultaneous high-performance liquid chromatography assays of polyamines and monoacetylpolyamines in biological specimens. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **745**, 431-437.
- Telsnig D., Kassarnig V., Zapf C., Leitinger G., Kalcher K., Ortner A. (2012): Characterization of an Amperometric Biosensor for the Determination of Biogenic Amines in Flow Injection Analysis. *International Journal of Electrochemical Science* **7**, 10476-10486.
- Telsnig D., Terzic A., Krenn T., Kassarnig V., Kalcher K., Ortner A. (2012): Development of a Voltammetric Amine Oxidase-Modified Biosensor for the Determination of Biogenic Amines in Food. *International Journal of Electrochemical Science* **7**, 6893-6903.
- Til H. P., Falke H. E., Prinsen M. K., Willems M. I. (1997): Acute and Substrate Toxicity of Tyramine, Spermidine, Spermine, Putrescine and Cadaverine in Rats. *Food and Chemical Toxicology* **35**, 337-348.

- Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M. (2007): Aminoaldehyde dehydrogenases: has the time now come for new interesting discoveres. *Curent topics in Plant Biology* **8**, 45-70.
- Vianello F., Malek-Mirzayans A., Di Paolo M. L., Stevanato R., Rigo A. (1999): Purification and Characterization of Amine Oxidase from Pea Seedlings. *Protein Expression and Purification* **15**, 196-201.
- Vujcic S., Liang P., Diegelman P., Kramer D. L., Porter C. W. (2003): Genomic identification and biochemical characterization of the mammalian polyamine oxidase involved in polyamine back-conversion. *Biochemical Journal* **370**, 19-28.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAP	4-aminoantipyrin
AGM	agmatin
AMPA receptor	receptor kys. $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové
AO	aminoxidasa
APS	peroxodisíran amonný
BCA	bicinchinonová kyselina
BSA	sérový hovězí albumin
CAD	kadaverin
CNS	centrální nervový systém
DAO	diaminoxidasa
dcSAM	dekarboxylovaný <i>S</i> -adenosylmethionin
DCHBS	3,5-dichloro-2-hydroxibenzensulfonát sodný
FAD	flavinadenindinukleotid
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
GPC	gelová permeační chromatografie
HIST	histamin
HNMT	histamin- <i>N</i> -metyltransferasa
MAO	monoaminoxidasa
NMDA receptor	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartátový receptor
PAO	polyaminoxidasa
PHEA	fenylethylamin
PsAO	hrachová aminoxidasa
PUT	putrescin
SDS	docecylsíran sodný
SPD	spermidin
SPM	spermin
TEMED	tetramethylethylendiamin
TRYPT	tryptamin
TYR	tyramin