

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Imobilizace hrachové aminoxidasy

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Smolková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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

..... *podpis diplomanta*

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce Mgr. Janu Frömmelovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a rady při zpracování této práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Smolková
Název práce	Imobilizace hrachové aminoxidasy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Biogenní aminy vznikají především dekarboxylací příslušných aminokyselin a jsou dále oxidovány aminoxidasami 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.

Pro širší využití enzymů je limitujícím faktorem jejich teplotní stabilita, proto jsou vyhledávány metody pro zvýšení termostability. Jedním z řešení je navázání enzymu na vhodný polymerní nosič.

V rámci experimentální části práce byly vypěstovány hrachové klíčky, z nichž byla s následně izolována a purifikována hrachová aminoxidasa (PsAO). Získaná aminoxidasa byla imobilizována na vybraný nosič. Dále byla změřena pomocí spřažené peroxidasové reakce substrátová specifita a kinetika reakcí vybraných aminů imobilizované PsAO. Optimální pH imobilizované PsAO a její stabilita v čase byly porovnány s neimobilizovaným enzymem.

Klíčová slova	Hrachová aminoxidasa, imobilizace enzymu, zvýšená stabilita enzymu
Počet stran	64
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Tereza Smolková
Title	Immobilization of Pea aminooxidase
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Biogenic amines are formed primarily by decarboxylation of the respective amino acids and are further oxidized by the amine oxidases 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.

For the wider use of enzymes, the limiting factor is their temperature stability, therefore methods for increasing thermostability are being sought. One solution is to bind the enzyme to a suitable polymeric carrier.

In the experimental part of the work pea seedlings were grown and pea amine oxidase (PsAO) subsequently isolated and purified. The obtained amine oxidase was immobilized on a selected support. The substrate specificity of immobilized PsAO as well as the kinetics of the reaction of selected amines were measured by using a coupled peroxidase reaction. The optimal pH of immobilized PsAO and its stability over time were compared with non-immobilized enzyme.

Keywords	Pea diamine oxidase, immobilization of enzyme, increased stability of the enzyme
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1. Význam aminoxidas	10
2.2. Aminoxidasy	10
2.3. Aminoxidasy u mikroorganismů	11
2.4. Aminoxidasy u rostlin	12
2.5. Živočišné aminoxidasy	14
2.5.1. Detoxifikace	16
2.5.2. Proliferace buněk	17
2.6. Inhibice aminoxidas	19
2.7. Úpravy enzymů	21
2.7.1. Fixace	21
2.8. Biosensory	27
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1. Biologické materiály	30
3.2. Chemikálie	30
3.3. Přístroje	31
3.4. Metody	31
3.4.1. Fixace enzymu	31
3.4.2. Stanovení koncentrace proteinů	32
3.4.3. Stanovení aktivity, stability, substrátové specifity a základních kinetických parametrů imobilizované hrachové aminoxidasy	32
3.4.4. SDS PAGE elektroforéza	32
3.5. Pracovní postupy	32
3.5.1. Izolace a purifikace hrachové aminoxidasy	32
3.5.2. Příprava imobilizovaného enzymu	34
3.5.3. Kontrola imobilizace enzymu pomocí SDS PAGE elektroforézy	35
3.5.4. Stanovení koncentrace proteinů imobilizovaného enzymu	36
3.5.5. Stanovení počáteční aktivity imobilizovaného enzymu a měření stability	36

3.5.6. Měření substrátové specifity imobilizovaného enzymu a stanovení kinetických parametrů čtyř nejlepších substrátů	37
3.6. Stanovení pH optima imobilizovaného enzymu	37
4. VÝSLEDKY	39
4.1. Kontrola imobilizace enzymu pomocí SDS PAGE elektroforézy	39
4.2. Stanovení koncentrace proteinů a specifické aktivity imobilizovaného enzymu	40
4.3. Měření stability imobilizovaného enzymu	41
4.4. Substrátové specifity imobilizovaných hrachových aminoxidas	44
4.5. Základní kinetické parametry čtyř nejlepších substrátů hrachové aminoxidasy	46
4.6. Stanovení pH optima hrachové aminoxidasy a jejích imobilizací	48
5. DISKUZE	53
6. ZÁVĚR	56
7. LITERATURA	57
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	64

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Literární rešerše na téma aminoxidas a jejich praktického využití.

Praktická část:

- Imobilizace hrachové aminoxidasy polyaldehydy vybraných oligosacharidů a polysacharidů.
- Studium vybraných vlastností imobilizované hrachové aminoxidasy.

1. ÚVOD

Aminoxidasy odbourávají příslušné aminy na jim odpovídající aldehydy, H_2O_2 a NH_3 . Tyto enzymy jsou široce distribuovány v přírodě. U mikroorganismů hrají aminoxidas významnou nutriční roli. U savců a rostlin jsou důležité např. při hojení ran, detoxifikaci, růstu buněk, signalizaci a apoptóze. Jejich působení může být inhibováno některými léky (antidepresivy), které obsazují inhibitory monoaminoxidas, ale i acetaldehydem vzniklým při odbourávání alkoholu.

Zvýšený příjem aminů společně se sníženým odbouráváním může vést ke vzniku řady zdravotních problémů, jako jsou bolesti hlavy, zvracení a průjemy. Aminoxidas mohou být spolu s katalasami využity k léčebným účelům (odbourávání nadbytku aminů, nedostatek vlastních aminoxidas) či jako biosenzor k stanovení množství aminů ve vzorcích.

Pro širší využití enzymů je limitujícím faktorem jejich teplotní stabilita, a tudíž jsou vyhledávány metody pro zvýšení termostability. Jedním z řešení je navázání enzymu na vhodný polymerní nosič. Vzniklý komplex enzym-polymer je posléze obvykle odolnější vůči teplotní degradaci. Zvýšená termostabilita komplexu však může být vykoupena sníženou aktivitou enzymu v důsledku vazby polymery do blízkosti aktivního místa.

Hrachová aminoxidasa vykazuje vcelku vysokou termostabilitu, čehož je využito i při purifikaci aminoxidasy zařazením řízené tepelné denaturace při $60\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut. Delším působením vyšších teplot na enzym dochází k jeho denuraci a tím snížení jeho aktivity. Imobilizací enzymu na vhodném oligo-či polysacharidu lze zvýšit jeho dlouhodobou termostabilitu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Význam aminosidas

Aminy a polyaminy jsou dusíkaté organické látky, skládající se z uhlovodíkového řetězce s jednou nebo více aminovými skupinami (Gevrekci, 2017), které se vyskytují ve všech živých organismech kromě dvou rodů prokaryotických organismů domény Archea – *Methanobacteriales* a *Halobacteriales* (Hamana a Matsuzaki, 1992). Nejběžnějšími polyaminy jsou putrescin, spermidin a spermin, které se v organismech nacházejí v různých koncentracích. Jsou zapojeny do řady buněčných procesů, jako je buněčný růst, proliferace odpověď na stresové reakce, genová exprese a interakce s DNA a s RNA. Při fyziologickém pH jsou polyaminy kladně nabitě, což umožňuje jejich interakci s polyaniontovými molekulami jako DNA a RNA, buněčnou membránou nebo s komponenty buněčné stěny (Gevrekci, 2017).

Stabilizace nukleové kyseliny polyaminy jsou zvláště důležité u termofilních mikroorganismů (teplotní optimum 50–60 °C) a hypertermofilů, které rostou při teplotě 80 °C nebo vyšší. Polyaminy přispívají k jejich tepelné odolnosti. Termofilní mikroorganismy mají, kromě běžných polyaminů sperminu a spermidinu, neobvykle dlouhé řetězce rozvětvených aminů (homocaldopentamin, caldohexamin, termopentamin, tris-(3-aminopropyl)amin, tetrakis-(3-aminopropyl)ammonium, N(4)-bis(aminopropyl)spermidin nebo N4-aminopropylspermidin (Fukuda *et al.*, 2015).

Proto se vyvinuly regulační dráhy, aby měly organismy přímou kontrolu nad jejich hladinou. K těmto účelům slouží jednak inhibice či naopak aktivace biosyntetických drah, buněčná absorpce řízená specifickými transportéry a v poslední řadě katabolická degradační kaskáda, jejichž hlavní složkou jsou různě specifické aminosidas (Gevrekci, 2017).

2.2. Aminosidas

Aminosidas jsou enzymy, které katalyzují oxidaci aminů, diaminů a polyaminů za vzniku odpovídajícího aldehydu, amoniaku a peroxidu vodíku. Jednotlivé aminosidas lze dle typu kofaktoru rozdělit na měď obsahující aminosidas: primární aminosidas (EC 1.4.3.21) a diaminoxidas (EC 1.4.3.22) a na flavinadenindinukleotid (FAD) obsahující aminosidas: monoaminoxidasy (EC 1.4.3.4) a polyaminoxidasy, které byly dříve označovány jako (1.5.3.11), zatímco nyní jsou zastoupeny N1-acetylpolyaminoxidasou (EC 1.5.3.13), polyaminoxidasou (propan-1,3-diamin-formující; EC 1.5.3.14), N8-acetylspermidinoxidasou (propan-1,3-diamin-formující;

EC 1.5.3.15), sperminoxidasou (EC 1.5.3.16) a nescifickou polyamineoxidasou (EC 1.5.3.17). Aminoxidasová aktivita se vyskytuje jak u rostlin a živočichů, tak u bakterií, hub i kvasinek (Frébort a Adachi, 1995; Angelini *et al.*, 2010, Kivirand *et al.*, 2016; <https://www.brenda-enzymes.org>, duben 2020).

2.3. Aminoxidas y u mikroorganismů

Již v roce 1926 L.E. den Dooren de Jong zjistil, že určitá skupina bakterií (*E. Coli*, *Pantoea agglomerans*, *mycobacterium phlei*, ...) je schopna využívat aminy jako náhradní zdroje uhlíku a dusíku k růstu, pokud nejsou v médiu obsaženy amonné ionty a glukosa. Avšak růst těchto organismů je výrazně pomalejší než na plnohodnotném médiu (Gale, 1942). V pozdějších letech byla objevena schopnost odbourat putrescin a kadaverin i u mořských bakterií nacházejících se v pobřežních oblastech průlivu Vineyard Sound (Massachusetts; USA). Tato směs bakterií byla schopna odbourat 500 µg putrescinu z mořské vody do 28 hodin (Höfle, 1984). Využití dusíku a uhlíkové kostry aminů bylo objeveno také u některých druhů planktonu (*Prymnesium carterae* a *Prymnesium parvum*) (Palenik a Morel, 1991).

U *Arthrobacter P 1* hraje monoaminoxidasa společně s katalasou důležitou nutriční roli. Oba enzymy se v nejvyšší míře nachází ve vchlípeninách buněčné membrány a umožňují bakterii rychlý růst na médiu, které neobsahuje jiný zdroj uhlíku a dusíku než amin (Levering *et al.*, 1981).

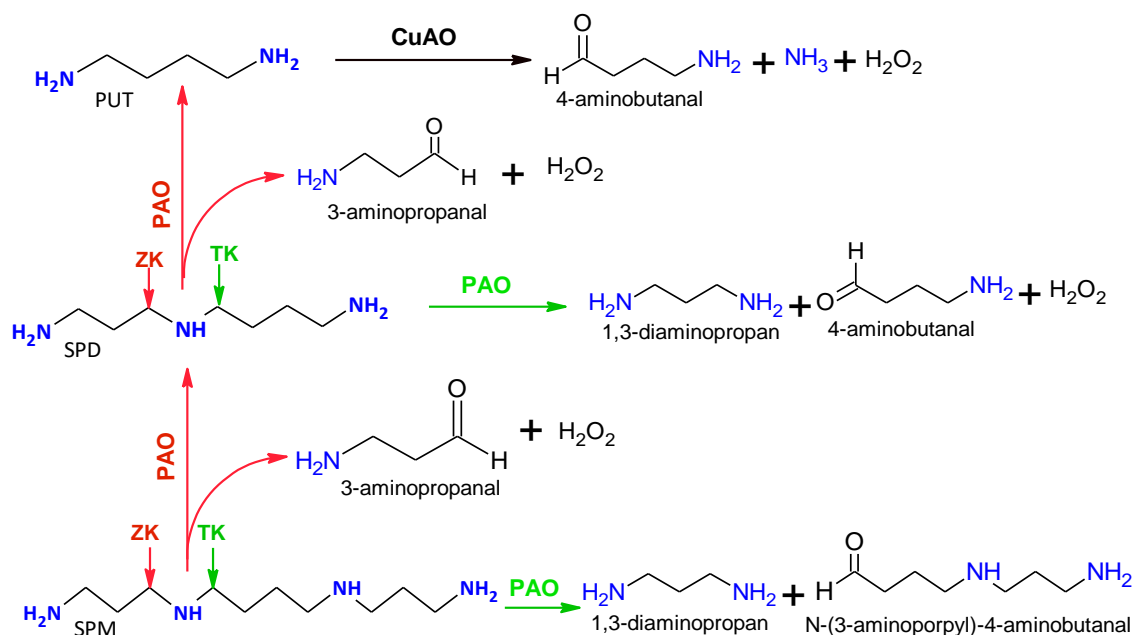
Další funkcí aminoxidas v mikroorganismech je biologická inaktivace přirozeně se vyskytujícího nebo syntetického aminu, který může být pro organismus toxický. Druhy jako *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella aerogenes* obsahují monoaminoxidas y vysoce specifické pro tyramin. Bakterie *Enterobacter aerogenes* mimo jiné aminy vykazuje výraznou oxidaci histaminu a *Brevibacterium ammoniagenes* oxidaci tryptaminu (Murooka *et al.* 1979).

Do regulace hladiny aminu je u mikroorganismů zapojen také transport polyaminů pomocí polyaminových transportérů, které se mohou vyskytovat v plazmatické membráně nebo v membránách organel. A regulují tak přítok nebo odtok polyaminů načež přispívají k polyaminové homeostáze. Například, delece kvasinkového polyaminového exportního proteinu Tpo1 zvýšila citlivost na nadměrné hladiny polyaminu, zatímco jeho nadexprese zvyšuje toleranci k nadměrnému množství polyaminu (Albertsen *et al.*, 2003).

2.4. Aminoxidasy u rostlin

U rostlin se vyskytuje dvojitý typ aminoxidas: měď obsahující aminoxidasy (CuAO; původně EC 1.4.3.6, nově EC 1.4.3.21 a EC 1.4.3.22) a polyaminoxidasy (PAO; EC 1.5.3.14). CuAO jsou homodimery, u kterých každá z podjednotek (70 až 90 kDa) obsahuje měďnatý kationt a 2,4,5-trihydroxyfenylalanin chinon (TOPA chinon) jako kofaktor. Přičemž TOPA chinon je tvořený postranslační autokatalytickou modifikací z tyrosinu (Medda *et al.*, 1995; Angelini *et al.*, 2010; <https://www.brenda-enzymes.org>, duben 2020). CuAO jsou typické pro dvouděložné rostliny a ve velkém množství se nacházejí u klíčících sazenic čeledi bobovitých (sója, hrách, cizrna, hrachor). PAO jsou monomerní a nesou jako kofaktor nekovalentně vázanou molekulu FAD a jsou typické zejména pro jednoděložné rostliny (Cona *et al.*, 2006; Angelini *et al.*, 2010).

Aminoxidasy se u rostlin primárně vyskytují slabě vázané na buněčnou stěnu (Šebela *et al.*, 2000). Mají řadu fyziologických a biochemických funkcí propojených s katabolismem aminů a polyaminů (Angelini *et al.*, 2010). V dřívější době výzkumy ukazovaly, že u rostlin probíhá pouze terminální katabolismus polyaminů, v nedávné době však byly objeveny i PAO, které degradují polyaminy zpětnou konverzí (Obr. 1) typickou pro živočišnou říši (Tavladoraki *et al.*, 2006; Kusano *et al.*, 2014). Nicméně neexistují důkazy o jejím fyziologickém významu (Agostinelli *et al.*, 2010).



Obr. 1: Schéma znázorňující odbourávání polyaminů pomocí polyaminoxidasy terminálním katabolismem (TK; znázorněno červeně) a zpětnou konverzí (ZK; znázorněno zeleně) u rostlin. Překresleno podle (Kusano *et al.*, 2014).

CuAO a PAO jsou důležité při vzniku u peroxidu vodíku (z oxidace polyaminů), který je důležitý při zranění pletiv, lignifikaci a zesílení buněčných stěn, hojení či při obraně u napadení patogeny. Produkovaný peroxid vodíku dále slouží jako signální molekula. Zprostředkovává expresi obranných genů a buněčnou smrt (Cona *et al.*, 2006). Přičemž byl zaznamenán účinek polyaminového katabolismu v apoplastu proti patogenům s různými patogenními strategiemi. Jednak příznivý účinek u obranných reakcích rostlin proti biotrofním patogenům, kteří jsou závislí na živé tkáni pro úspěšnou kolonizaci hostitele. A naopak škodlivý účinek na rostliny v případě obranné reakce proti patogenům, které se živí nekrotickými tkáněmi (Marina *et al.* 2008).

Aminoaldehydy z oxidace polyaminů slouží při syntéze sekundárních metabolitů například: 2-fenylacetaldehyd produkovaný oxidací 2-fenyletylaminu může být transformován na 2-fenyletanol (těkavá sloučenina), který je hlavním přispěvatelem ovocné chuti a vůně květin. Dále 4-hydroxyfenylacetaldehyd vzniklý oxidací tyraminu se účastní biosyntézy benzylizochinolinových alkaloidů v rostlinách (Zarei *et al.*, 2015).

Další aminoaldehydy a 1,3-diaminopropan zvyšují toleranci k abiotickému stresu (Cona *et al.*, 2006). Nejvýznamnějším produktem polyaminového katabolismu, který pomáhá rostlinám vyrovnat se s abiotickým stresem (zasolení, sucho,...) je kyselina γ -aminomáselná (GABA). Ačkoliv je tato sloučenina syntetizována primárně z glutamátu nevratnou reakcí cytosolické glutamátdekarboxylasy (GAD; EC 4.1.1.15), vzniká v případě potřeby alternativní cestou z polyaminů (Yang *et al.*, 2015; Ramos-Ruiz *et al.*, 2019). Ze 4-aminobutanalu, pocházejícího z oxidace Put i Spd zprostředkovaného CuAO nebo PAO, může být působením aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH; EC 1.2.1.19) vytvořena GABA (Angelini *et al.*, 2010). Při zvýšené salinitě dochází k poklesu koncentrací putrescinu, kadaverinu a spermidinu, přičemž naopak narůstá aktivita aminoxidas a dochází k akumulaci GABA. Akumulace GABA je přitom vyšší a hladiny polyaminů nižší s rostoucí koncentrací solí (Xing *et al.*, 2007).

Důležitost aminoxidas u rostlin v případě hojení značí rychlá akumulace aminoxidasové mRNA v místě poranění, přičemž následně dochází k nárůstu syntézy aminoxidas (indukovaný kys. jasmonovou). V důsledku toho dochází k 2,5 násobnému zvýšení aktivity aminoxidas v místě poranění. Zvýšené hladiny aminoxidas jsou pozorovány již po 3 hodinách po zranění i v jiných částech rostliny (stonek, listy), což značí systémovou odpověď. Toto zvýšení aktivity však není tak markantní (1,2 x) jako v místě zranění. V případě použití inhibitorů AO dochází k zpomalení či úplnému zastavení hojení ran (Rea *et al.*, 2002).

2.5. Živočišné aminoxidasy

Kromě oxidace aminů se CuAO u živočichů, konkrétně tedy SSAO (Semikarbazid-citlivé aminoxidasy), podílejí na adhezi leukocytů, absorpci glukosy a jejich aktivita má spojení také se zánětlivým onemocněním střev, chronickým onemocněním jater a diabetem (O'Sullivan *et al.*, 2004). Aktivita CuAO v séru stoupá během těhotenství nebo za určitých patologických stavů, jako je rakovina (Agostinelli *et al.* 2010).

U živočichů jsou měď obsahující aminoxidasy uloženy ve čtyřech genech (AOC1-4). Gen AOC1 má pět exonů a není spojen s dalšími AOC geny. AOC2, AOC3 a AOC4 geny se skládají ze čtyř exonů a jsou tandemově uspořádány na stejném chromozomu. Orthology všech čtyř AOC genů byly nalezeny u např. krav, koní, psů, šimpanzů, makaků či lidí (Schwelberger, 2006; Schwelberger, 2010). AOC1 kóduje diaminoxidasu (DAO) známá jako histaminoxidasu (EC 1.4.3.22), která je hlavní enzym zodpovědný za metabolismus požitého histaminu a dalších diaminů. Je to rozpustný sekreční enzym exprimovaný hlavně ve střevě, ledvinách, brzlíku, placentě a semenných vácích (Maintz *et al.*, 2007; Schwelberger, 2010; Finney *et al.*, 2014).

Nejhojněji je AOC1 zastoupen v placentě během těhotenství (až 1000krát vyšší, než v jiných orgánech), přičemž jeho snížená aktivita během těhotenství je spojena s vysoce rizikovým těhotenstvím (Maintz *et al.*, 2008). Studie na myších ukázala, že AOC1 hraje rozhodující roli při homeostáze histaminu a hladiny putrescinu, což je zásadní pro decidualizaci (přestavba děložní sliznice) a uhníždění embrya (příprava na implantaci embrya) a samotné implantace embrya. Přičemž bylo prokázáno, že exprese AOC1 je pod kontrolou estrogenu prostřednictvím CCAAT/enhancer-binding protein (Liang *et al.*, 2010).

Gen AOC2 kóduje sítnicově specifickou aminoxidasu (retina-specific amino oxidase; RAO; EC 1.4.3.21), membránový protein původně identifikovaný ve vrstvě gangliových buněk sítnice, ve velmi nízkých koncentracích (Imamura *et al.*, 1997). Později byla detekována v tukové tkáni, přičemž se účastní regulace diferenciaci adipocytů (Heniquez *et al.*, 2003; Bour *et al.*, 2007). Kromě toho byl AOC2 detekován na úrovni mRNA v mnoha tkáních (plíce, mozek, ledviny, chrupavka, mandle a srdce). AOC2 na rozdíl od AOC1 neoxiduje histamin či spermidin, ale preferuje substráty jako tyramin, fenylethylamin a tryptamin, avšak oxidační aktivita k tyraminu byla detekována pouze v sítnici (Airenne *et al.*, 2005; Kaitaniemi *et al.*, 2009).

AOC3 kóduje primární aminoxidasu (EC 1.4.3.21). Existuje mnoho alternativních názvů, např. vaskulární adhezivní protein-1 (VAP-1), plazmatická aminoxidasa či semikarbazid-senzitivní aminoxidasa (SSAO). Jedná se o protein vázaný k plazmatické membráně, v rozpustné formě se uvolňuje po proteolytickém štěpení C-konce metaloproteasou. AOC3 exprimován v buňkách endotelu, hladké svaloviny a adipocytů. Ve vysokých koncentracích se nachází hlavně v plicích, aortě, játrech a tenkém střevu (Kurkijarvi et al., 1998). Kvůli struktuře aktivního místa preferuje AOC3 malé substráty jako methylamin a aminoaceton (Shen *et al.*, 2012), dále je zapojen do adheze leukocytů a absorpce glukosy (Salmi a Jalkanen, 2001).

Zapojení AOC3 do adheze leukocytů má potenciál jako terapeutický cíl pro zánětlivé onemocnění (fibróza jater, revmatoidní artritida, lupénka, chronické obstrukční plicní onemocnění, ...). Proto byly vyvinuty deriváty alkylhydrazinu, guanidinu a imidazolu jako inhibitory AOC3. Alternativní strategií je využití monoklonálních protilátek, blokujících vazebné místo AOC3 pro leukocyty. (Kirton *et al.*, 2005; Yraola *et al.*, 2007). Zdraví lidé mají v séru nízkou hladinu rozpustné AOC3, zatímco zvýšená hladina AOC3 byla pozorována v séru pacientů trpících cukrovkou, srdečním selháním a poruchou jater. Kdy postižené orgány jsou považovány za zdroj rozpustného AOC3 (Jaakkola *et al.*, 2000; Boomsma *et al.*, 2005).

AOC4 kóduje rozpustný VAP-1 paralog exprimovaný primárně v játrech, kde se vylučuje do krevního řečiště a tvoří hlavní část plazmatické nebo sérové aminoxidázy u většiny savců. Ovšem u člověka AOC4 gen kóduje nefunkční protein kvůli internímu stop kodonu (Schwelberger, 2006; Schwelberger, 2010).

V živočišných tkáních se nachází také FAD obsahující aminoxidasy, konkrétně monoaminoxidasa A (MAO A; EC 1.4.3.4) a monoaminoxidasa B (MAO B; EC 1.4.3.4). Substráty jsou především endogenní primární aminy – neurotransmitery (serotonin, dopamin a norepinefrin), dochází však také k oxidaci podobných substrátů jako tyramin a fenylethylamin z potravy. Obě formy vykazují různou substrátovou specifitu, přičemž MAO A oxiduje především serotonin a norepinefrin. Naproti tomu MAO B má vyšší specifitu k fenylethylaminu (Edmondson, 2014; <https://www.brenda-enzymes.org>, duben 2020).

Genové sekvence obou monoaminoxidas jsou umístěny na chromozomu X (Lan *et al.* 1989). Je známo, že lidské placentální mitochondrie obsahují převážně MAO A, zatímco u mitochondrií lidských krevních destiček se nachází hlavně MAO B. Jiné tkáně obsahují různé hladiny obou enzymů, jejichž exprese je závislá na vývojových faktorech.

U novorozenců je nejdříve exprimována MAO A, a až následně dochází k tvorbě MAO B (Wang et al., 2011). Při stárnutí se hladiny MAO B v neuronální tkáni zvyšují nejméně 2-3krát a hladiny MAO A v srdeční tkáni jsou zvýšeny přibližně 9krát. Předpokládá se, že s rostoucím věkem vede zvýšená exprese k neuro a kardio-degenerativním onemocněním vyplývajícím ze zvýšeného množství reaktivních forem kyslíku pocházejících z vytvořeného H₂O₂ (Hauptman *et al.*, 1998).

2.5.1. Detoxifikace

Důležitou funkcí aminoxidas, především diaminoxidasy, je u živočichů degradace přijatých biogenních aminů potravou. Zvýšený příjem aminů či naopak snížené odbourávání může vést ke vzniku různých zdravotních problémů (Shalaby 1997; Manzotti *et al.*, 2016).

2.5.1.1. Poruchy odbourávání aminů, diaminů a polyaminů

Nejčastější poruchou odbourávání aminů je tzv. histaminová intolerance napodobující alergickou reakci. Tato pseudoalergie je definována jako stav, kdy požití potravin obsahujících vysoké množství histaminu u lidí s nízkou (geneticky podmíněnou) degradací histaminu ve střevě nebo inhibicí jeho inaktivace jinými potravinovými složkami, léčivými, alkoholem či drogami. Snížená degradace histaminu vede k absorpci histaminu v množství, které vyvolává nežádoucí účinky jako bolesti hlavy, bolesti břicha, průjemy, nevolnost či zvracení (Manzotti *et al.*, 2016).

Degradace histaminu je závislá hlavně na diaminoxidase (DAO; AOC 1) a v malé míře na histamin-N-methyltransferase (HNMT). Intolerance histaminu je proto vysoce pravděpodobná u pacientů s aktivitou DAO menší než 3 IU·ml⁻¹, velmi pravděpodobná u pacientů s DAO aktivita nižší než 10 IU·ml⁻¹, a nepravděpodobná u pacientů s aktivitou DAO větší 10 IU·ml⁻¹ (Klocker et al., 2005; Maintz a Novak, 2007).

Odhaduje se, že přibližně 1% obecné populace má příznaky intolerance histaminu způsobené deficitem DAO (Kacik *et al.*, 2017). Případná dieta s omezeným množstvím histaminu, ukládá složitá nestandardizovaná omezení, která mohou mít vážný dopad na kvalitu života pacientů (Manzotti *et al.*, 2016). Proto byly vyvinuty komerčně dostupné potravinové doplňky obsahující DAO z ledvin prasat, sloužící jako léčba histaminové intolerance (Smolinska *et al.*, 2014).

V současné době jsou diaminoxidasy orálně podávány jako monolitické tablety tvořené karboxymetylškorbem a chitosanem pro transport DAO do tlustého střeva, kde dojde k jejímu uvolnění. Ačkoli jsou DAO je známé tím, že mají určitou rezistenci vůči proteolýze, je tato rezistence omezena na dobu přibližně 8 hodin. Účinnější ochrany enzymu lze docílit použitím karboxymetylškorbu s alginátem, kdy enzym zůstává uvězněn v mikrokapslích a je ochráněn před účinky proteáz. Přičemž póry mikrokapslí dovolují vstupu substrátů k enzymu (Calinescu *et al.*, 2012; Blemur *et al.*, 2015).

Kinetické studie ukázaly lepší stabilitu a vyšší rychlost oxidace alifatických diaminů a histaminu u rostlinných DAO ve srovnání se zvířecími aminoxidasami. Navíc z důvodu zvýšené tvorby peroxidu vodíku může docházet k poškození tkáně reaktivními formami kyslíku (Masini *et al.*, 2007; Pietrangeli *et al.*, 2007). Což lze odbourat kombinací DAO s katalasou, která přemění škodlivý peroxid vodíku na kyslík a vodu. (Jumarie *et al.*, 2017). Přičemž užívání DAO doplňků má příznivý vliv střevních zánětlivých onemocnění jako jsou Cronova choroba a ulcerativní kolitida (Blemur *et al.*, 2015; Schnedl *et al.*, 2019).

2.5.2. Proliferace buněk

Koncentrace intracelulárních polyaminů jsou udržovány na určité hodnotě, specifické pro jednotlivé typy buněk, prostřednictvím koordinované a vysoce regulované souhry mezi biosyntézou, transportem a katabolismem (Agostinelli *et al.*, 2010; Angelini *et al.*, 2010). Polyaminy jsou často přítomny ve zvýšené koncentraci u kultur nádorových buněk a u nádorových tkání například: rakoviny prsu a rakoviny tlustého střeva (Heby a Persson, 1990), zatímco vyčerpání polyaminu vede k inhibici růstu nádorových buněk (Averill-Bates *et al.*, 2005).

Některé nádory obsahují vyšší hladiny polyaminů ve srovnání s normálními tkáněmi. Zvýšený obsah polyaminu je často spojen se zvýšenou syntézou putrescinu ornithin dekarboxylasou, jakož i se zvýšenou absorpcí polyaminu (Heby a Persson, 1990).

Klinické studie prokázaly významný nárůst ornithindekarboxylasy (ODC) a S-adenosylmethioninkarboxylasy (SAMDC) u lidské rakoviny prostaty v porovnání s benigními hyperplasiemi (Kee *et al.*, 2004). Zvýšené hladiny polyaminu byly pozorovány u chemicky a virově indukovaných nádorů (Bachrach, 2004). Také pacienti s různými typy rakoviny vylučují acetylované polyaminy v moči. Proto bylo navrženo, že měření acetylovaných polyaminů v moči nebo buněčných extraktech může být použité při diagnostice rakoviny (Seiler, 2000).

Přítomnost zvýšených hladin acetylovaných polyaminů je obvykle spolehlivým markerem zvýšené aktivity Spd/Spm-N¹-acetyltransferasy (SSAT), ale jejich akumulace závisí také na rychlosti katabolické degradace. Bylo prokázáno u nádoru prsu, že snížení hladiny N¹-acetylpolyaminoxidasy (APAO), a zvýšení hladiny SSAT přispělo k akumulaci acetylovaných polyaminů (Wallace *et al.*, 2000). V tkáních rakoviny prsu byla nalezena také snížená exprese sperminoxidasy (SMO) ve srovnání se zdravými tkáněmi (Cervelli *et al.* 2010). Pozorovaný pokles hladin APAO a SMO může přispívat k růstu nádoru buď prostřednictvím zvýšení hladiny polyaminů nebo prostřednictvím snížené produkce H₂O₂ a tím snížené rychlosti endogenní apoptózy (Goodwin *et al.* 2008).

Naopak zvýšení úrovně exprese SMO bylo nalezeno u pacientů s diagnózou rakoviny prostaty (prostatická intraepiteliální neoplazie nebo proliferativní zánětlivá atrofie) ve srovnání se zdravými jedinci. Má se za to, že zánětem předstojné žlázy indukovaná exprese SMO a její produkce H₂O₂ má za následek oxidační poškození DNA a karcinogenezi, což dává v souvislost chronického zánětu s karcinogenezi (Goodwin *et al.* 2008).

V současné době se vyvíjejí různé strategie pro léčbu rakoviny s využitím:

- a) inhibitorů syntézy polyaminu: specifický inhibitor ornithin dekarboxylasy; inhibitor S-adenosylmetionin dekarboxylasy, který snižuje hladinu spermidinu a sperminu, ale zvyšuje hladinu putrescinu (Nowotarski *et al.*, 2013; Coni *et al.*, 2019).
- b) analogů polyaminů, které mohou vyčerpávat obsah polyaminů a narušovat metabolismus nebo funkci polyaminů (Wallace a Fraser, 2003).
- c) inhibitorů transportu polyaminu, které mohou zabránit absorpci exogenních polyaminů blokováním membránových transportérů (Weeks *et al.*, 2000).
- d) enzymů degradujících polyaminy, jako je aminoxidasa hovězího séra (BSAO; EC 1.4.3.22). Bylo pozorováno, že oxidační deaminace sperminu pomocí BSAO generuje amoniak a cytotoxické metabolity (peroxid vodíku a aldehydy). Tvorba cytotoxických aldehydů z polyaminů nebo reaktivních druhů kyslíku (ROS) může mít potenciál v léčbě rakoviny, protože tyto molekuly jsou schopné indukovat stresem aktivované signální transdukční dráhy, což vede buněčné smrti (Agostinelli *et al.*, 1996; Lindsay a Wallace, 1999; Agostinelli a Seiler, 2006).

Dříve bylo prokázáno, že peroxid vodíku a aldehydy generované enzymatickým systémem BSAO byly také schopny překonat rezistenci vůči více lékům (MDR)

v rakovinných buňkách. Proto jsou toxické polyaminové metabolity v současnosti zkoumány jako pravděpodobné kandidáty na novou strategii v nádorové terapii (Agostinelli a Seiler, 2006; Agostinelli *et al.*, 2014).

2.6. Inhibice aminoxidas

Původně byly inhibitory enzymu monoamin oxidasa (MAO) hojně využívány pro léčbu afektivních poruch (deprese, mánie, bipolární porucha), ale jejich použití kleslo na nízkou úroveň po zjištění závažných hypertenzních reakcí u pacientů v důsledku konzumace potravin s vysokým obsahem tyraminu (Blackwell and Mabbitt, 1965). Přičemž (Hasan *et al.*, 1988; Finberg a Gillman, 2011) uvádí, že inhibice MAO může potenciální účinky tyraminu zesílit několika mechanismy:

- a) zvýšená absorpce tyraminu přes střevní bariéru
- b) snížený metabolismus v játrech a následné zvýšení koncentrace tyraminu v krvi
- c) prodloužená doba účinku tyraminu v sympatických neuronech
- d) zvýšení množství rozpustného noradrenalinu, který je k dispozici pro uvolnění
- e) zesílení uvolňování noradrenalinu a adrenalinu z buněk nadledvin

Lidská MAO se vyskytuje ve 2 formách MAO-A a MAO-B. Tyramin je substrátem pro oba podtypy, což dává příležitost selektivní inhibice pouze jednoho podtypu, kdy selektivní inhibice MAO-A způsobuje mnohem větší potenciaci účinků tyraminu než selektivní inhibice MAO-B. To je důležitá vlastnost inhibitorů MAO-B (např: selegilin a rasagilin), kdy je možné zvýšení účinku dopaminu bez potenciace tyraminu a umožňuje jejich rozsáhlé použití při léčbě Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby (Naoi a Maruyama, 2010; Finberg a Gillman, 2011). Oproti tomu je selektivní inhibice MAO-A využívána pro léčbu depresí (Emanuela *et al.*, 2011).

Další možností, jak zabránit tvorbě nežádoucích účinků tyraminu, je vývoj kompetitivních reverzibilních inhibitorů (brofaromin, moclobemid), kdy dochází v přítomnosti zvýšené hladiny tyraminu k vytěsnění inhibitoru vazebného místa enzymu, takže MAO je schopná metabolizovat tyramin (Finberg a Gillman, 2011).

Při léčbě plicní fibrózy může být využita inhibice AOC3 (inhibitor LJP 1586), kdy studie na myších s deficitem AOC3 vykázaly 30-50% snížení fibrózy, syntézy kolagenu a počtu myofibroblastů ve srovnání s kontrolními myši divokého typu. Myši, které exprimují katalyticky neaktivní formu AOC3, byly také chráněny před plicní fibrózou. U myši divokého typu léčba inhibitorem AOC3 snížila infiltraci leukocytů,

diferenciaci myofibroblastů a fibrotické poškození jak v profylaktickém, tak v časném terapeutickém prostředí asi o 50 %, ale nebyla schopna zvrátit vzniklou fibrózu. AOC3 byl také nalezen v myofibroblastech u lidské idiopatické plicní fibrózy. Oxidasová aktivita AOC3 tedy přispívá k rozvoji plicní fibrózy, a to hlavně regulováním akumulace patogenních podtypů leukocytů (Marttila-Ichihara *et al.*, 2017).

V souvislosti s léčbou psychických poruch pomocí MAOI (monoaminoxidasové inhibitory), byla objevena vazba mezi inhibicí aminoxidas a tělesnou hmotností. Je známo, že významným regulátorem v bílé tukové tkáni je AOC3, kdy jeho inhibice u myši mění pronikání leukocytů a ukládání glukosy do tukové tkáně. (Tab. 1) znázorňuje efekty vlivu inhibicí jednodílných aminoxidas na tělesnou hmotnost (Yang *et al.*, 2018; Carpena *et al.*, 2019).

Tab. 1 Souhrn znázorňující přirozené substráty jednotlivých savčích aminoxidas, jejich inhibitory a efekt inhibice enzymu na tukovou tkáň. Převzato a upraveno (Carpena *et al.*, 2019).

Aminoxidasa	Substrát	Inhibitor	Efekt na tělesnou hmotnost (BW) nebo akumulaci tuku
MOA-A	norepinefrin noradrenalin dopamin serotonin tyramin tryptamin	pargylin phenelzin tranylcypromin moclobemid clorgylin toloxaton	↓ příjem potravy ↓ podkožní tukové tkáně u myši ↓ BW obézních myši ↑ adipogenese
MAO-B	dopamin benzylamin	pargylin tranylcypromin phenelzin deprenyl	↑ efekt na semikarbazid pro snížení množství bílé tukové tkáně u kryš ↓ adipogenese ↓ bílé tukové tkáně u potkanů
AOC1	histamin putrescin kadaverin	semikarbazidy	↓ BW
AOC2	tyramin tryptamin	semikarbazidy	↓ BW
AOC3	benzylamin methylamin aminoaceton	semikarbazidy phenelzin aminoguanidin tranylcypromin phenylhydrazin hydralazin	↓ BW obézních myši ↓ podkožní tukové tkáně potkanů ↓ BW králíků ↓ bílé tukové tkáně u myši

2.7. Úpravy enzymů

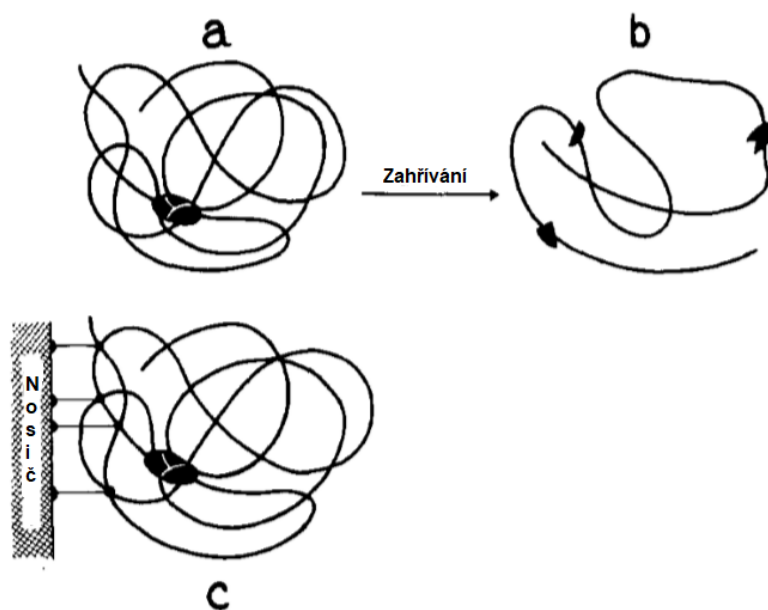
Enzymy byly již od pradávna nevědomky využívány v potravinářství (výroba sýrů, piva, vína), Tyto enzymy však nebyly využívány v čisté formě, ale spoléhalo se na jejich spontánní produkci mikroorganismy a rostlinami. S postupným rozvojem technologií docházelo k postupně k izolaci enzymů v čisté formě a následně i jejich produkci ve velkém měřítku, potřebné pro průmyslové aplikace (Krik *et al.*, 2002).

Dnes jsou enzymy využívány v různých oborech – medicíně, biotechnologiích či průmyslu. Využívají se v přípravě detergentů a pracích prostředků (proteasa, lipasa, amylasa), pekárenský průmysl (amylasa, xylanasa, lipasa, fosfolipasa, glukosaoxidas, proteasa, transglutaminasa), výroba mléčných produktů (proteasa, lipasa, laktasa, pektin), úprava škrobu (Cyclodextrin-glykosyltransferasa, amylasa, amyloglukosidas, glukosa-isomerasa), koželužnictví (lipasa, proteasa). Využívány jsou taktéž v textilním průmyslu (celulasa, peroxidasa, katalasa) (Krik *et al.*, 2002, Spahn a Minter, 2008).

Takto rozsáhlé využívání enzymů, které mají krátkou životnost skladování, nízkou stabilitu a nesnadné znovupoužití není ekonomicky přínosné, a proto jsou hledány metody, jak enzymy lépe stabilizovat a využívat opakovaně (Datta *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2018). Existují tři směry, kterými se můžeme vydat, pokud chceme zvýšit stabilitu, reaktivitu, substrátovou specifitu a aktivitu enzymu. Prvním způsobem je využití enzymů z organismů žijících v extrémních podmínkách - termofilní bakterie z horkých pramenů, psychotropní organismy z chladných oblastí či organismy přivyklé na vysokou salinitu např. Mrtvého moře. Druhou možností je modifikace několika aminokyselin aktivního místa či struktury enzymu, aby byl enzym teplotně stabilnější nebo aby struktura enzymu dovovala lepší průchod substrátu do aktivního místa. (Singh *et al.*, 2018). Poslední možností je imobilizace enzymu, kdy vazba enzymu k nosiči zajistí stabilizaci enzymové struktury i v měnících se podmínkách, a navíc umožní snadné oddělení enzymu od reakční směsi. (Martinek *et al.*, 1977; Datta *et al.*, 2012).

2.7.1. Fixace

Teplotní stabilita enzymů má přímou spojitost se strukturou enzymu a jeho rigiditou. Přičemž čím rigidnější je daný protein, tím hůře podléhá tepelné denaturaci (Vihinen, 1987).

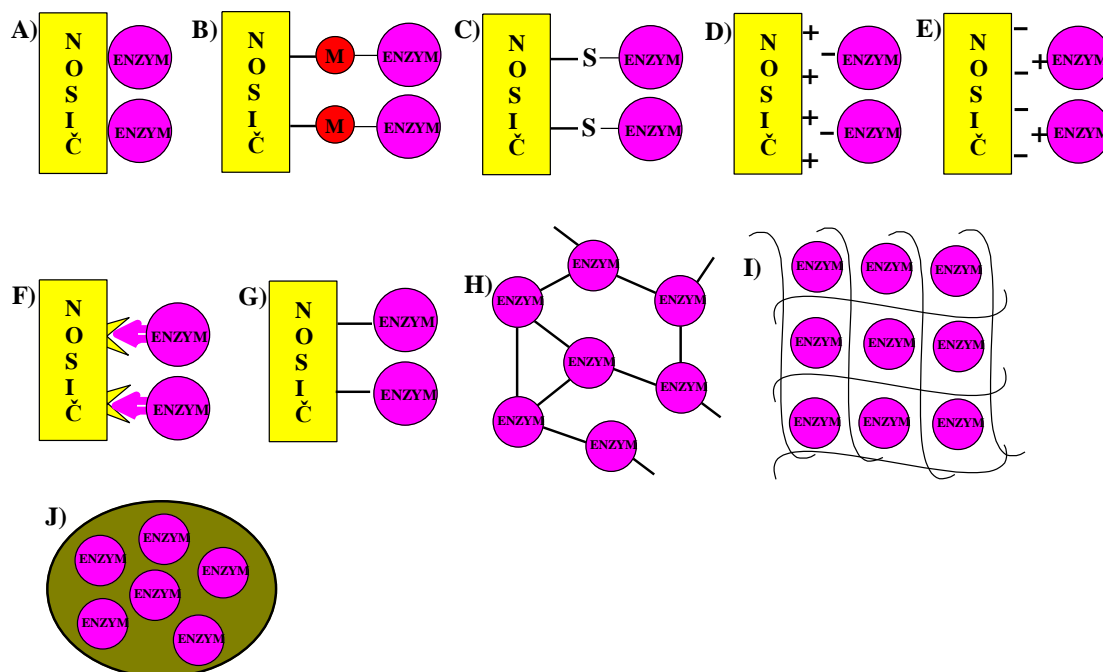


Obr. 2: Schéma ukazující rozklad enzymu a aktivního místa způsobeného zvýšením teploty a enzym ochráněný fixací na nosič. Převzato a upraveno (Martinek *et al.*, 1977).

Při navázání proteinu na určitý nosič pomocí pevné vazby či jiných ne vazebných interakcí dochází taktéž ke zvýšení rigidity. Takto upravený protein nebo enzym následně získá vyšší odolnost vůči zvýšené teplotě, kolísání pH, či změně iontové síly. (Martinek *et al.*, 1977; Singh *et al.*, 2018).

Imobilizace enzymu může způsobit změny v jejich aktivitě, specifitě a selektivitě. V mnoha případech je tato změna způsobena interakcí s nosičem negativní a dochází k snížení aktivity enzymu z důvodu zakrytí aktivního místa či změny struktury enzymu. V menší míře dochází naopak ke zlepšení enzymatických vlastností, a to nejčastěji z důvodu stabilizace aktivované formy enzymu. V jiných případech půjde pouze o náhodné modifikace a následné zlepšení kinetických parametrů. Z těchto důvodů může být velmi obtížné najít vhodný nosič ke stabilizaci enzymu se zlepšenými vlastnostmi oproti neimobilizované formě (Rodriguez *et al.*, 2013).

Existuje mnoho způsobů, jak imobilizovat enzym, přičemž je můžeme rozdělit podle podstaty spojení na fyzikální a chemické. Přičemž chemické metody imobilizace mohou být reverzibilní a ireverzibilní. Nejčastěji rozlišujeme devět základních typů fixace enzymu (Obr. 3), u kterých může či nemusí být přítomen nosič (Krishnamoorthi *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2018).



Obr. 3: Typy imobilizací enzymů. A) adsorpce, B) chelatace, C) disulfidová vazba, D) a E) iontová vazba, F) afinitní vazba, G) kovalentní vazba, H) crosslinking (chemická agregace), I) entrapment (inkluze do gelu), J) enkapsulace (opouzdření). Překresleno podle (Krishnamoorthi *et al.*, 2015).

2.7.1.1. Adsorpce

Adsorpce je nejstarší a nejspíš také nejjednodušší imobilizační technika, kterou si osvojili již roku 1916 J. M. Nelson a Edwald C. Griffin, kterým se podařilo adsorbovat invertasu na živočišné uhlí bez zjevné ztráty na aktivitě (Powell, 1984; Krishnamoorthi *et al.*, 2015). Principem adsorpční techniky je adheze enzymu na povrch inertního materiálu (nosiče) pomocí velkého množství slabých nekovalentních interakcí jako jsou Van der Waalsovy síly, vodíková vazba či hydrofobní interakce (Krishnamoorthi *et al.*, 2015). Takto zachycený enzym je následně chráněn před agregací, proteolýzou a případně interakcí s hydrofobním rozhraním (Spahn a Minteer, 2008). Často využívanými nosiči pro adsorpci jsou například sklo, hydroxid hlinitý, aktivní uhlí, kaolinit, celulóza či v posledních letech nanočástice. Lze využít i materiálů šetrných k životnímu prostředí jako jsou kokosová vlákna, která mají značnou schopnost zadržovat vodu a velkou kapacitu pro výměnu náboje (Datta *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2018).

Hlavní výhodami adsorpce je její snadné provedení, nízká cena – (levné nosiče, absence přístrojového vybavení, obejde se bez reakčních činidel) a možné znovuvyužití jak enzymu, tak nosiče díky slabým interakcím mezi nimi. Tyto interakce jsou poměrně citlivé na změny pH, teploty a iontové síly, proto jsou hlavní příčinou ztráty enzymu

v reakčním roztoku a enzym může následně kontaminovat výsledný produkt. Taková kontaminace poté může ztížit purifikační proces. (Krishnamoorthi *et al.*, 2015).

2.7.1.2. Chelatace

Chelatace je metoda využívající schopnosti polárních aminokyselin (histidin, lysin, fenylalanin, cystein a tyrosin) vytvářet koordinační vazbu s kovovými ionty. Kovové ionty jsou pevně vázány k nosiči. Ligand (enzym) je následně slabě vázán ke kovovému iontu nosiče, a může být uvolněn jiným ligandem se silnější vazbou ke kovovému iontu tzv. chelatonem (např. EDTA). Chemikálie použité při této metodě nemusí být bezpečné pro potravinářský průmysl, a proto je chelatace využívána spíše jako chromatografická metoda. Nejčastěji využívané nosiče jsou organické materiály jako chitin a celulosa nebo nosiče na bázi oxidu křemičitého (Krishnamoorthi *et al.*, 2015).

2.7.1.3. Disulfidová vazba

Imobilizaci enzymu pomocí disulfidové vazby lze považovat za variantu kovalentní vazby, neboť charakter vazby mezi nosičem a volnou thiolovou skupinou enzymu (cystein) je kovalentní. Tuto vazbu je ale snadné rozrušit přidáním vhodného činidla (dithiothreitol, 2-merkptoethanol), což tuto metodu činí reversibilní.

Další výhodou této imobilizační techniky je možnost ovlivnit reaktivitu thiolových skupin změnou pH. Nosiče, nejčastěji materiály na bázi oxidu křemičitého bývají chemicky aktivovány pomocí činidel (maleimid nebo jodacetát) nebo fotonickou indukcí (Górecka a Jastrzebska, 2011).

2.7.1.4. Iontová vazba

Pomocí této metody jsou enzymy připojeny k nosnému materiálu pomocí solných mostů. Metoda je snadná, avšak je velmi obtížné uhlídat podmínky tak, aby byl enzym dostatečně silně vázaný a zároveň zůstal aktivní. Enzym je možné z nosiče uvolnit změnou iontové síly nebo teploty. Často používaným nosičem pro tyto účely je polyethylenimin (Singh *et al.* 2018).

2.7.1.5. Afinitní vazba

Technika imobilizace enzymu pomocí afinitní vazby je založena na interakci antigen-protilátka. Jedná se o vysoce specifickou vazbu, kdy je reakční místo nosiče

syntetizováno pro konkrétní enzym. Díky tomu, že se jedná o takto specifickou vazbu, můžeme ovlivnit místo, kde bude enzym navázán a nezakrývat tak aktivní místo. Mezi často využívané interakce pro vazbu k enzymu patří vazba avidin-biotin, chitin vazebná doména, nebo His-tag vazebná doména. Tato technika může být mimo jiné použita i pro purifikaci enzymu. Hlavní nevýhodou této metody je většinou velmi drahá příprava specifických protilátek (Krishnamoorthi *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2018).

2.7.1.6. Kovalentní vazba

Kovalentní vazba je jedna z nejpoužívanějších metod imobilizace enzymů a spadá do kategorie ireverzibilní imobilizace. Popularita souvisí hlavně s vysokou stabilitou vazeb vytvořených mezi enzymem a nosičem, což zabraňuje uvolňování enzymu, a navíc substráty nepotřebují k enzymu procházet přes bariéru. Enzym je k nosiči vázán nejčastěji pomocí adice, přičemž dochází k využití $-NH_2$ skupin (koncové AMK nebo lyzinového zbytku), $-COOH$ skupin (koncové AMK nebo kys. asparagové či kys. glutamové), $-SH$ skupinu cysteinu, $-OH$ skupin (serinu nebo tyrosinu) nebo cyklického systému tyrozinu a histidinu. Nosič hraje při reakci roli elektrofilu. Pokud není nosič přirozeným elektrofilem, musí být předem modifikován (přidání reaktivní skupiny na nosič nebo úprava samotného nosiče). K těmto účelům je využívána řada metod (bromkyanová, karbodiimidová, azidová, izothiokyanátová, triazinová, aldehydová, epoxidová, anhydridová), které aktivují dříve inertní nosič jako je například celulóza, dextran, Sephadex či Sepharosa (Górecka a Jastrzebska, 2011; Singh *et al.*, 2018).

Nevýhoda této metody skví v riziku vzniku kovalentní vazby k nosiči v aktivním místě enzymu nebo jeho blízkém okolí, což má později za následek výrazný úbytek aktivity enzymu či jeho úplnou blokaci. Navíc je tato technika ireverzibilní, a proto je nemožné takto postižený enzym recyklovat (Krishnamoorthi *et al.*, 2015).

2.7.1.7. Crosslinking

Crosslinking (chemická agregace či kopolymerace), je ireverzibilní imobilizační technika, která nevyžaduje nosič. Jednotlivé enzymy jsou spojovány do trojrozměrných sítí pomocí činidel (glutaraldehyd, diazotovaný benzidin, imidoestery dikarboxylových kyselin, BSA, dextran), které reagují s volnými aminoskupinami (nejčastěji lyzinu) či postranním řetězcem tyrosinu. Vzniklé agregáty mají velikost 1-100 μm a rozlišujeme

dvě techniky jejich tvorby: CLEC (cross-linked enzyme crystals) a CLEA (cross-linked enzyme aggregates) (Krishnamoorthi *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2018).

CLEC je starší metoda, při které je využíván k zesíťování do formy krystalu glutaraldehyd. CLEC jsou velmi stabilní, nepodléhají tak snadno tepelné denaturaci jako volné enzymy a jsou odolnější vůči působení organických rozpouštědel. Změnou podmínek při tvorbě krystalu můžeme ovlivnit jeho velikost. Tvorba takovýchto enzymatických krystalů je časově a finančně velmi nákladná, navíc s rostoucí velikostí krystalu dochází k snížení aktivity v důsledku limitované difuze substrátu a produktu krystalem. Nevhodný může být pro některé aplikace také jejich rosolovitý charakter (Krishnamoorthi *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2018).

Na základě těchto nevýhod byla vyvinuta vylepšená verze enzymových agregátů – CLEA. Příprava probíhá ve vodném roztoku precipitací přidávkem solí, organických rozpouštědel nebo neiontových polymerů. Tato metoda je levná a snadno uskutečnitelná, přičemž můžeme agregovat i více enzymů najednou. Menší velikost precipitovaných agregátů má vliv na jejich sníženou stabilitu v míchaných fermentorech a může působit obtíže při purifikaci produktu (Krishnamoorthi *et al.*, 2015).

2.7.1.8. Entrapment

Entrapment (inkluze do gelu) je metoda zachycující enzym pomocí kovalentních vazeb a ne vazebných interakcí na vlákna gelu. Zachycení enzymu do gelu probíhá více způsoby např: termální reverzní polymerace nebo ionotropní gelace. První způsob se používá u želatiny, agaru či agarosy, kdy dojde po jejich zahřátí k rozpuštění a následně při ochlazování se těsně před začátkem tuhnutí gelu přidá enzym pro entrapment. Druhá varianta se využívá u látek jako karagenan a alginát. Pro zachycení enzymu do gelu se využívá i řada dalších látek jako polyakrlamid, tetramethylsilan, kolagen či polyuretan (Singh *et al.*, 2018).

Výhodou entrapmentu je snadná a rychlá příprava, příznivá cena a ochrana enzymu před proteasami a mikroorganismy. Velmi důležitým faktorem, který limituje metodu, je velikost pórů gelu, kdy příliš malé póry zpomalují difuzi substrátu a produktu gelem. Naopak příliš velké póry způsobují unikání enzymu z gelu. Někdy nastává inaktivace enzymu během inkluze do gelu, tomu lze zabránit přidáním substrátu nebo albuminu k enzymu (Krishnamoorthi *et al.*, 2015).

2.7.1.9. Enkapsulace

Enkapsulace neboli opouzdření je metoda velmi podobná entrapmentu. Enzymy jsou zachyceny ve vnitřním prostoru kapsle s polopropustnou membránou. Výhodou tohoto uskupení je ochrana enzymu před vnějším prostředím, navíc odpadá nutnost úpravy vnitřního prostředí kapsle a nedochází k nežádoucí inaktivaci enzymu. Póry polopropustné membrány přitom zabezpečují průnik substrátů a produktů, přičemž jejich velikost je omezená velikostí samotného enzymu. Proto není tato technika vhodná, pokud je produkt nebo substrát podobné velikosti jako samotný enzym (dochází k úniku enzymu nebo prasknutí kapsle).

Pro tvorbu kapslí jsou využívány různé polymery jako alginát, chitosan, celuloza, maltodextrin, karagen, polyvinylacetát a další. Kapsle mohou být vytvořeny i z dvou vrstev různých polymerů (Górecka a Jastrzebska, 2011).

2.8. Biosensory

Vysoké hladiny biogenních aminů (BA) lze nalézt ve zpracovaných potravinách jako důkaz počínající hniloby, což představuje důležitý marker pro čerstvost potravin. Vysoká koncentrace BA v potravinách je nebezpečná nejen pro účinky jednotlivých aminů na organismus, ale také mohou produkovat karcinogenní sloučeniny, zejména pokud jsou přítomny také dusitany (Boffi *et al.*, 2015).

V poslední době se ukázalo, že polyaminy mohou být také užitečné při lékařských aplikacích. Protože za normálních podmínek jsou hladiny polyaminů ve fyziologických tekutinách nízké, zatímco v přítomnosti některých nádorových onemocnění se mohou výrazně zvýšit. V této souvislosti jsou považovány za markery růstu nádoru koncentrace putrescinu a nekontrolovaně se dělících buněk koncentrace spermidinu (Russel 1977; Cohen *et al.*, 1976; Bachrach 2004;).

Problémem analýzy je, že skutečné vzorky jsou komplexní matice charakterizované přítomností potenciálně interferujících sloučenin, které mohou bránit detekci specifických BA. Kvantitativní analýza BA je obvykle založena na metodách plynové chromatografie, chromatografii na tenké vrstvě a vysokoúčinné kapalinové chromatografii s předkolonovou nebo postkolonovou derivatizací nebo kapilární elektroforézou. Tyto metody vyžadují specializované přístroje a většinou zdlouhavý extrakční postup nebo jiné předúpravy vzorků (Boffi *et al.*, 2015).

V posledních letech se do čela pozornosti dostaly elektrochemické biosenzory pro jejich jednoduchost, krátkou dobu analýzy, reprodukovatelnost, nízké náklady a nízký limit detekce, a protože není nutná předchozí příprava vzorku (Henaó-Escobar *et al.*, 2013).

Aminoxidasy katalyzují v přítomnosti molekulárního kyslíku jako akceptoru elektronů oxidační deaminaci primárních aminů, diaminů a substituovaných aminů za vzniku aldehydů amoniaku a peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je vhodným elektrochemickým analytem, protože nabízí vysokou odezvu, přesnost a vysokou reprodukovatelnost (Di Fusco *et al.*, 2011; Henaó-Escobar *et al.*, 2013).

Použití aminoxidas (diaminoxidas, polyaminoxidas, sperminoxidas, putrescinoxidas) s různými amperometrickými měniči bylo v literatuře popsáno v posledních letech mnohokrát, přičemž byly vyvinuty specifické biosenzory pro analýzu putrescinu, sperminu, spermidinu či histaminu (Aigner *et al.*, 2017; Boffi *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2017; Karim *et al.*, 2018).

Řada těchto biosenzorů již byla použita na klinických vzorcích při detekci aminů jako rakovinných markerů. Například selektivní detekce sperminu díky zvláštním vlastnostem sperminoxidas, zatímco enzym polyaminoxidas je schopen detekovat celkové množství dvou polyaminů sperminu a spermidinu, aniž by interferovaly další přítomné biogenní aminy. Naměřené množství aminů bylo v souladu s analýzou GC-MS (Boffi *et al.*, 2015).

Jiný tým vědců vyvinul biosenzor na bázi putrescinoxidas, který je schopný detekovat putrescin v klinických vzorcích. Přičemž díky vysoké citlivosti je vhodný jako diagnostický nástroj pro pacienty s rakovinou, neboť je známo, že koncentrace putrescinu v séru je v rozmezí 13–45 μM u pacientů s rakovinou, ale 2 μM u zdravých osob (Xia *et al.*, 2017)

Biosenzory s diaminoxidasou jako je například PsAO, jsou pro svou širokou substrátovou specifitu vhodné pro stanovení kvality potravin. Nicméně v přítomnosti spermidinu nebo jeho metabolitu 1,3-diaminopropanu, se aktivita PsAO a tudíž i citlivost biosenzoru důsledku inhibice snižuje. Tento fakt může způsobit falešně negativní výsledky detekce biogenních aminů v jejich směsích. Z tohoto důvodu jsou tyto biosenzory vhodné pro analýzu biogenních aminů především v počátečních fázích kažení potravin (Kivirand *et al.*, 2016).



Obr. 4: Barevný produkt vzniklý oxidací 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonatu sodného a aminoantipyrinu pomocí křenové peroxidasy.

Standardní spektrofotometrické detektory nelze použít, protože polyaminy nevykazují zřetelné absorpční pásmo v oblasti UV-Vis (Boffi *et al.*, 2015). K spektrofotometrickému stanovení BA se proto často využívá spřažené reakce s křenovou peroxidasou, kdy křenová peroxidasa redukuje vzniklý H_2O_2 na H_2O a O_2 a oxiduje příslušný chromofor na barevný produkt (Obr. 4) (Ascenzi *et al.*, 2002, Fossati *et al.*, 1980). Nevýhodou takovéto aplikace je neustálé spotřebování drahých enzymů. Proto je lepší využití jejich imobilizovaných forem (Datta *et al.*, 2012).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Biologické materiály

Osivo hrachu setého (*Pisum sativum*) odrůda Abarth

3.2. Chemikálie

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)
Coomassie Brilliant blue R250	(VWR, kat. č. 443283M)
Dihydrogenfosforečnan draselný	(Lach:Ner, ČR, kat. č. 30016-APO)
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 barnatý	(Lach:Ner, ČR, kat. č. 30072)
Chlorid sodný	(Lach:Ner, kat. č. 30093-APO)
Jodistan sodný	(Sigma-Aldrich, kat. č. U05695-143)
Kadaverin dihydrochlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. C8561)
Karboxymethylcelulosa	(Sigma-Aldrich, kat. č. 419273)
Křenová peroxidasa	(Sigma-Aldrich, kat. č. 77322)
Kyselina trichloroctová	(Sigma-Aldrich, kat. č. T4885)
Laemmliho pufr	(BIO-RAD, kat. č. 161-0747)
Maltodextrin 17-35 j (dextr. ekvivalent 4.0-7.0)	(Sigma-Aldrich, kat. č. 419672)
Maltodextrin 6-7 j (dextr. ekvivalent 16.5-19.5)	(Sigma-Aldrich, kat. č. 419699)
Maltodextrin 7-9 j (dextr. ekvivalent 13.0-17.0)	(Sigma-Aldrich, kat. č. 419680)
Methanol	(Lach:Ner, kat. č. 20038-ATO)
Pentahydrát síranu měďnatého	(Lach:Ner, kat. č. 30625 0502)
Perlit	(Perlit s.r.o. Šenov u Nového Jičína)
Peroxodisíran amonný	(BIO-RAD, kat. č. 161-0700)
Polybren (hexadimethrin bromid)	(Sigma-Aldrich, kat. č. 107689)
Síran amonný	(Lach:Ner, ČR, kat. č. 30165-CPO)
Spermidin trihydrochlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. 85578)
Spermin tetrahydrochlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. 85610)
Škrob na prádlo rozpustný za studena	(Unipret, ČR)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	(BIO-RAD, kat. č. 161-0800)
Trishydroximetyletylaminoetan	(Sigma-Aldrich, kat. č. 154563)
Tryptamin hydrochlorid	(Sigma-Aldrich, kat. č. 246557)
Tyramin hydrochlorid	(INC Biomedicals, kat. č. 103173)
Unstained Protein Standard (10-200 kDa)	(Biolabs, Japonsko, kat. č. P7704)
α -cyklodextrin	(TCI, kat. č. C0776)
β -cyklodextrin	(TCI, kat. č. C0777)
γ -cyklodextrin	(TCI, kat. č. C0869)

3.3. Přístroje

Accublock™ digital dry bath	(Labnet)
Centrifuga 5430R	(Ependorf)
Centrifuga Bench top 4-16k s	(Sigma)
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)
Vortex M53 Basic	(IKA)
Hydroxiapatitová kolona	(BIO-RAD – High Que)
Kolona Mono Q	(Pharmacia Biotech)
BioLogic QuadTec UV-Vis Detector	(BIO-RAD)
Pumpa BioLogic DuoFlow	(BIO-RAD)

3.4. Metody

3.4.1. Fixace enzymu

Hrachovou aminoxidasu se již dříve podařilo stabilizovat imobilizací na β -cyklodextrin (Šebela *et al.*, 2004), jiné enzymy se naopak podařilo stabilizovat polykationtem polybrenem (Efremenko *et al.*, 2002; Shipovskov a Levashov, 2003). Jako další nosiče byly vybrány látky podobné (α -cyklodextrin a γ -cyklodextrin), a cenově dostupné nosiče, které se pro imobilizaci taktéž využívají (škrob, maltodextriny) a karboxymethylcelulosa jako rozpustná varianta levné celulosy (Krishnamoorthi *et al.*, 2015).

Pro účely diplomové práce byla využita metoda glykosilace enzymu podle Moranda a Biellmanna. Polysacharid nebo oligosacharid je oxidován jodistanem sodným na příslušný polyaldehyd, jež je v chladu a tmě stabilní po dobu dvou dnů. Po odstranění nadbytečného jodistanu a vzniklého jodičnanu za využití chloridu barnatého je roztok vzniklého polysacharidu inkubován s enzymem určeným k imobilizaci (Morand a Biellman, 1991).

Druhou využitou metodou byla inkubace polykationtu s enzymem, kdy polykationt vytvoří ve vodném roztoku v enzymem nekovalentní komplex a stabilizuje enzym, přičemž enzymy si zpravidla zachovávají svoji katalyticky aktivní konformaci. K tomuto účelu byl využit polykationt polybren (1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylen polymethobromid) v hmotnostním poměru (w/w) vůči enzymu 20:1 (Sergeeva *et al.*, 1999; Efremenko *et al.*, 2002).

3.4.2. Stanovení koncentrace proteinů

Pro zjištění koncentrace proteinů bylo využito Bradfordova činidla (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% ethanol, 8,5% kyselina fosforečná v destilované vodě). Metoda Bradfordové je založena na schopnosti barviva Brilliant Blue G-250 vyskytovat se ve 2 barevných formách (červená a modrá). Kdy červená forma je převedena na modrou formu po vazbě barviva na protein. Reakce proběhne přibližně do dvou minut a produkt je stálý po dobu 1 hodiny s absorpčním maximem 595 nm. (Bradford, 1976). Použití bicinchoninové metody bylo znemožněno z důvodu výskytu interagujících látek (oxidační činidla, redukující látky), které byly využity při modifikaci.

3.4.3. Stanovení aktivity, stability, substrátové specifity a základních kinetických parametrů imobilizované hrachové aminoxidasy

Pro účely stanovení aktivity, stability, substrátové specifity a kinetických parametrů (K_m , V) jednotlivých modifikací PsAO byla využita spřažená reakce s křenovou peroxidasou, kdy je vzniklý peroxid vodíku detekován pomocí oxidace aminoantipyrinu a 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonátu sodného. Výsledný růžovofialový produkt je detekovatelný při 515 nm (Ascenzi *et al.*, 2002, Fossati *et al.*, 1980).

3.4.4. SDS PAGE elektroforéza

SDS-PAGE je typ elektroforézy, která probíhá na polyakrylamidovém gelu s přídavkem dodecylsírany sodného (SDS), kdy dochází k rozdělení proteinů na základě jejich velikosti. SDS je detergent, který denaturuje po zahřátí sekundární a terciární struktury proteinů spojené disulfidovou vazbou a potahuje je negativním nábojem, který odpovídá délce proteinu. Malé proteiny se tudíž pohybují rozlišovacím gelem rychleji než velké proteiny (Laemmli, 1970; Brunelle a Green, 2014).

3.5. Pracovní postupy

3.5.1. Izolace a purifikace hrachové aminoxidasy

Byly vypěstovány etiolované sedmidenní sazenice hrachu setého, kdy semena byla nejprve po dobu 24 hodin namočená ve vodě a následně vyseta na navlhčený perlit. Po dobu klíčení byly sazenice umístěny ve fytotronu ve tmě, 50% vlhkosti a 25°C.

Ze vzniklých sazenic bylo odstraněno semeno a lístky, přičemž zbytek byl využit pro izolaci hrachové aminoxidasy.

Samotná izolace a purifikace enzymu proběhla obdobně, jako během bakalářské práce (Šebela *et al.*, 1998; Smolková, 2018). Purifikační protokol se skládal z homogenizace hrachových klíčků v draselno-fosforečném (KPi) pufru o pH 7,0 a koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bez přídavku měďnatých kationů. Zfiltrovaný homogenát byl centrifugován po dobu 20 min a teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ při 10500 g (centrifuga Sigma, Bench top 4-16k s). Obsah proteinů byl snížen dvojnásobným vysolením pomocí síranu amonného do 30% a 70% nasycení přičemž po každém kroku byl centrifugován dobu 30 min a teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ při 10500g.

Získaný precipitát byl rozpuštěn v KPi pufru o pH 7,0 a koncentraci $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a dialyzován po dobu 24 hodin ve stejném pufru. Po dialýze byla provedena řízená tepelná denaturace po dobu 5 minut při $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Následovalo zchlazení a zbavení zdenaturovaných proteinů centrifugací po dobu 2 hodin (10500 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$), supernatant byl opět dialyzován po dobu 24 hodin v KPi pufru o koncentraci $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 7,0 a se přídavkem $1 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CuSO}_4$.

K přečištění enzymu sloužila iontoměničová chromatografie za použití kolony s hydroxyapatitem (Bio RAD – High Que). Jako mobilní fáze byl využit KPi pufr o koncentraci $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 7,0 se síranem měďnatým o koncentraci $1 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s průtokem 2 ml za minutu. K následnému uvolnění aminoxidasy z kolony došlo použitím KPi pufru 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.

Rozdílným krokem byla následná dialýza po dobu 24h v K-Pi pufru o koncentraci $20 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ o pH 5,8 s přídavkem $1 \text{ } \mu\text{mol} \text{ CuSO}_4$. Dialyzát byl zakoncentrován a byla provedena FPLC (rychlá proteinová kapalinová chromatografie) s využitím kolony monoQ (Pharmacia Biotech).

Jako mobilní fáze byly využity K-Pi pufrы o koncentraci $20 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ o pH 5,8 obsahující $1 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ (mobilní fáze A) s přídavkem $1 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ a $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$ (mobilní fáze B). Mobilní fáze (Tab. 2) byly míseny pomocí pumpy (BioLogic DuoFlow) s průtokem 1 ml za minutu. Nástřik $500 \text{ } \mu\text{l}$ koncentrátu probíhal od 2. minuty po dobu 30 sekund (zvýrazněno červeně). Přečištěný enzym byl využit pro imobilizaci.

Tab. 2 Dávkování mobilní fáze A a mobilní fáze B v čase s vyznačenou dobou nástřiku enzymu k přečištění (červeně).

Čas (s)	0	120	150	240	360	720	900	1080	1380	1680
A:	100 %	100 %	100 %	100 %	85 %	70 %	0 %	0 %	100 %	100 %
B:	0 %	0 %	0 %	0 %	15 %	30 %	100 %	100 %	0 %	0 %

3.5.2. Příprava imobilizovaného enzymu

K imobilizaci enzymu, jako nosičů, bylo využito kationtového polymeru polybrenu (hexadimethrin bromid, 1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylen polymethobromid), 8 oligosacharidů a polysacharidů: karboxymethylcelulosa, škrob, α -cyklodextrin (CDA), β -cyklodextrin (CDB), γ -cyklodextrin (CDG), maltodextrin (6-7 j; M6), maltodextrin (7-9 j; M9) a maltodextrin (17-35 j; M35), kdy první hodnota v závorce u maltodextrinů odpovídá ekvivalentu dextrosových jednotek.

Bylo naváženo 0,5 g jednotlivých sacharidů a rozpuštěno v 40 ml destilované vody s výjimkou karboxymethylcelulosy a škrobu, které byly rozpuštěny ve 120 ml destilované vody. Následně byl připraven roztok perjodistanu sodného pro modifikaci reaktivních míst nosiče na aldehydovou skupinu. Perjodistan byl postupně přidáván k rozpuštěným sacharidům a oligosacharidům tak, aby jeho výsledné množství odpovídalo nadbytku 0,6 g perjodistanu na 0,5 g sacharidu.

Reakce probíhala za stálého míchání elektromagnetické míchačky 24 hodin při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku chloridu barnatého v množství 0,35 g chloridu barnatého na 0,5 g sacharidu. Došlo k vyloučení přebytečného jodistanu a vzniklého jodidu ve formě bílé sraženiny. V této fázi byla vyřazena karboxymethylcelulosa, neboť ani při opakované přípravě nedošlo k vyloučení sraženiny. Vzniklé sraženiny byly z roztoků modifikovaných sacharidů odstraněny pomocí filtrace na skládaném filtračním papíru.

Následně byly připraveny dva roztoky polybrenu tak, aby vůči koncentraci enzymu nadbytku v poměru 20:1 (P20) a 100:1 (P100). Roztoky polybrenu společně s filtráty byly umístěny do chladové místnosti, kde bylo k jednotlivým nosičům přidáno 700 μ l hrachové aminoxidasy (o koncentraci 3,55 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a specifické aktivitě 890 $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$). Enzym byl imobilizován za stálého míchání v chladové místnosti při 4 °C po dobu 24 hodin.

Imobilizovaný enzym byl následně zahuštěn na objem přibližně 2 ml v plastových zkumavkách s filtrem (30 kDa) pomocí centrifugace (centrifuga Sigma, Bench top 4-16k s) při 5000 g a 4 °C v 5 min intervalech. Imobilizáty enzymu s polysacharidy a oligosacharidy byly promyty 3x 1ml fosforečnanovým pufrům o koncentraci 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 7,0 s přídatkem 2 ml glycerolu na 100 ml pufru. U všech imobilizátů byla změřena počáteční aktivita, bylo odebráno 2x 100 μ l od každého imobilizátu pro měření stability

při pokojové teplotě (22 °C) a v chladu 4 °C. Zbylé imobilizáty byly zamraženy pro další použití.

3.5.3. Kontrola imobilizace enzymu pomocí SDS PAGE elektroforézy

Kontrola imobilizace enzymu byla provedena pomocí SDS PAGE elektroforézy na akrylamidovém gelu. Gely se skládaly z 4% zaostřovacího a 10% respektive 12% rozdělovacího akrylamidového gelu. Rozdělovací gel (12%) byl vytvořen z 2500 µl Tris-HCl pufru (1,5 mol·l⁻¹; pH 8,8), 3200 µl vody, 4000 µl roztoku akrylamidu (30 % monomer; 0,8 % dimer), 100 µl roztoku SDS (10% dodecylsírán sodný) a 15 µl roztoku TEMED (tetramethylethylendiamin). Pro 10% gel bylo použito 3800 µl vody a 3400 µl roztoku akrylamidu (30 % monomer; 0,8 % dimer), ostatních komponent bylo napipetováno stejné množství jako v případě 12% gelu.

Polymerace akrylamidu v gelu byla odstartována přidáním 50 µl roztoku APS (10% peroxodisíran amonný). Zaostřovací gel se skládal z 1250 µl Tris-HCl pufru (0,5 mol·l⁻¹; pH 6,8), 650 µl roztoku akrylamidu (30 % monomer; 0,8 % dimer), 100 µl roztoku SDS (10%) a 15 µl roztoku TEMED. Polymerace akrylamidu byla započata přidáním 60 µl roztoku APS (10% peroxodisíran amonný).

K vzorkům určeným na elektroforézu byl přidán vzorkovací pufr 1:1. Vzorky byly na 5 minut umístěny do thermobloku (Heating-cooling dry block CH-100 od firmy BioSan) vyhřátého na 100 °C. Takto připravené vzorky byly společně s markerem napipetovány do jamek dle tabulky (Tab. 3). Marker byl použit s rozsahem 10-200 kDa, konkrétně Unstained Protein Standard P7704 Brecison od firmy New England Biolabs.

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

Číslo jamky	Gel 10% Vzorek	Množství vzorku v µl	Číslo jamky	Gel 12% Vzorek	Množství vzorku v µl
1	Marker	3	1	Marker	2
2	Kontrola	3	2	P100	2
3	CDA	3	3	P20	2
4	CDB	10	4	M35	2
5	CDG	3	5	M9	1,5
6	Škrob	10	6	M6	3
7	Marker	3	7	Marker	5

Elektroforéza byla spuštěna s počátečním napětím zdroje 110 V a po vstupu čela vzorků do dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 140 V. Elektroforéza byla ukončena (přibližně po 2 hodinách), když čelo vzorků (Bromfenolová modř) doputovalo na konec gelu. Akrylamidový gel byl následně do druhého dne ponořen v barvicím roztoku na třepačce. Barvicí roztok se skládal ze 40% methanolu, 7% kyseliny octové a 0,025% barviva Coomassie Brilliant blue R250.

K odstranění přebytečného barviva byl gel 3x po dobu jedné hodiny za stálého promíchávání na třepačce ponořen v odbarvovacím roztoku obsahující 7% kyseliny octové a 5% methanolu v destilované vodě. Odbarvený gel byl opláchnut v destilované vodě a vyfocen pomocí Gel Doc™ EZ Imageru (BioRad).

3.5.4. Stanovení koncentrace proteinů imobilizovaného enzymu

Měření obsahu proteinů proběhlo pomocí metody Bradfordové, neboť bicinchoninová metoda nebyla kvůli interferujícím látkám použitelná. Byla vytvořena kalibrační řada BSA standardu ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $7,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Následně byla změřena koncentrace bílkovin ve vzorcích imobilizované PsAO.

Do kyvet byl napipetován 1 ml roztoku činidla, roztok BSA, tak aby koncentrace v kyvetě odpovídala výše vypsánému množství pro kalibrační řadu, nebo 2 či 5 μ vzorku. Všechny byly měřeny ve 3 repeticích pro každou eventualitu. Po 5 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 595 nm.

3.5.5. Stanovení počáteční aktivity imobilizovaného enzymu a měření stability

Pro měření aktivity a stability imobilizované hrachové aminosy (PsAO), byla využita spřažená reakce s křenovou peroxidasou (EC 1.11.1.7). Vzniklý peroxid vodíku byl detekován pomocí oxidace 3,5-dichlor-2-hydroxibenzofulfonylu sodného (DCHBS) a 4-aminoantipyrinu (AAP). Roztok pro přípravu reakční směsi se skládal z $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ křenové peroxidasy, $125 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AAP a $1,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DCHBS rozpuštěné ve KPi pufru pufru ($100 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 7,0). Počáteční aktivita a stabilita imobilizované PsAO byla měřena s roztokem putrescinu o koncentraci $100 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ve fosforečnanovém pufru o stejné koncentraci a pH. Měření probíhalo na UV-VIS spektrofotometru 8453 od firmy Agilent.

Reakční směs tvořilo 1600 μl zásobního roztoku, 2 μl modifikovaného enzymu a 378 μl destilované vody. Po vyblankování byla reakce odstartována přidáním 20 μl roztoku putrescinu ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Konečný objem reakce v kyvetě byl 2000 μl . Měření probíhalo ve 3 opakováních v kinetickém modu při 515 nm a 30 °C po dobu 10 minut za neustálého míchání magnetickým míchadlem. Měření stability probíhalo nejprve 2x týdně, později 1x týdně, 1x za 2 týdny a nakonec přibližně 1x za měsíc.

3.5.6. Měření substrátové specifity imobilizovaného enzymu a stanovení kinetických parametrů čtyř nejlepších substrátů

Pro stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů (K_m , V) modifikovaných enzymů byla využita taktéž spřažená reakce s křenovou peroxidasou, a detekce vzniklého peroxidu vodíku pomocí oxidace AAP a DCHBS. Substrátová specifita jednotlivých modifikací hrachové aminoxidasy byla změřena pro substráty, které byly využity i pro účely bakalářské práce, na jejíž výsledky tato práce navazuje (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, agmatin, tyramin, tryptamin, fenylethylamin, histamin).

K měření bylo využito opět 1600 μl zásobního roztoku, 2 μl enzymu a 378 μl vody, tak aby po přidání substrátu byl celkový objem 2000 μl . Reakce byla odstartována přidáním 20 μl příslušného substrátu, aby jeho koncentrace odpovídala $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měření probíhalo při 515 nm na stejném spektrofotometru jako v případě měření stability. Doba měření byla v rozmezí 3-30 minut v závislosti na použitém substrátu a typu imobilizovaného enzymu.

Následovalo měření s jednotlivými typy imobilizací hrachové aminoxidasy a čtyřmi nejlepšími substráty (putrescin, kadaverin, spermidin a agmatin) pro určení základních kinetických parametrů (K_m , V). Byly použity různé koncentrace substrátů ($20\text{-}4000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) tak, aby pro každou modifikaci a substrát bylo provedeno minimálně 15 měření. Základní kinetické parametry (K_m , V) byly vypočítány pomocí programu GraphPAD Prism 8.

3.6. Stanovení pH optima imobilizovaného enzymu

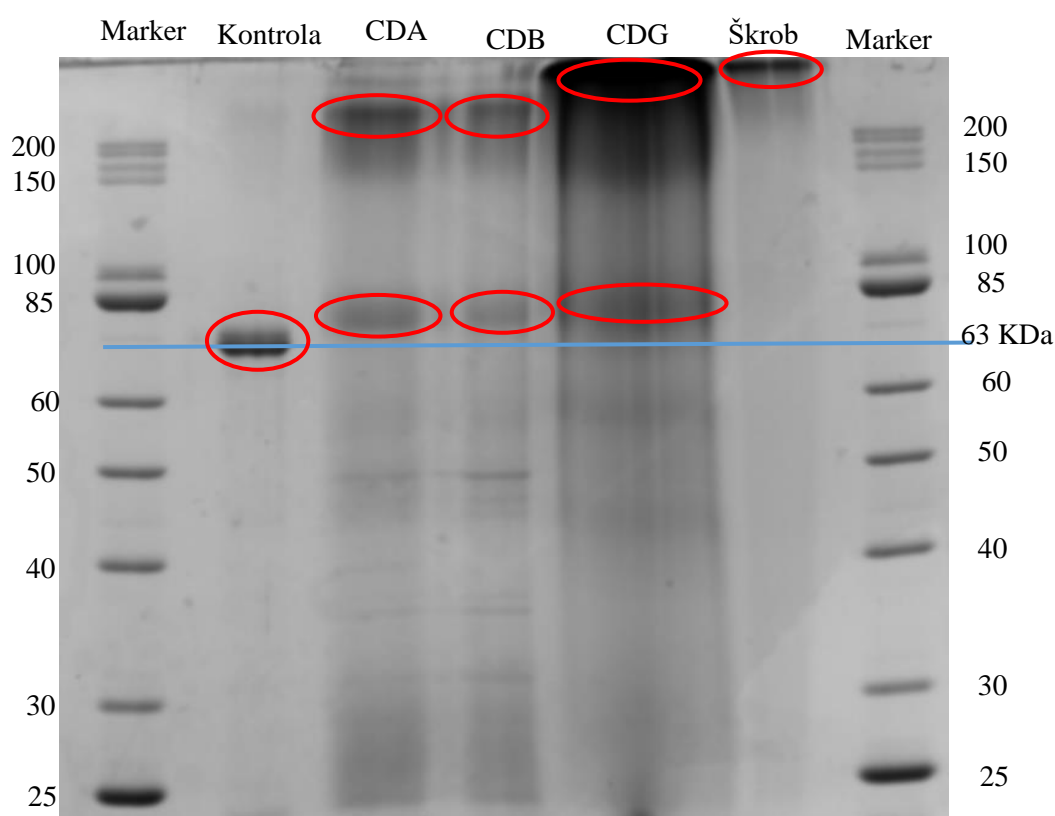
Pro stanovení pH optima imobilizované aminoxidasy byla využita opět spřažená reakce s křenovou peroxidasou, a detekce vzniklého peroxidu vodíku pomocí oxidace AAP a DCHBS. Přičemž byly připraveny zásobní roztoky v KPi pufru ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) o pH 5,8; 6,2; 6,6; 7,0; 7,2; 7,4; 7,8 a v Tris-HCl pufrem ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) o pH 7,8 a 8,5.

Optimální pH bylo měřeno s roztokem putrescinu o koncentraci $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. K měření bylo využito $1600 \mu\text{l}$ zásobního roztoku o příslušném pH, $2 \mu\text{l}$ enzymu a $378 \mu\text{l}$ vody, tak aby po přidání substrátu byl celkový objem $2000 \mu\text{l}$. Reakce byla odstartována přidáním $20 \mu\text{l}$ putrescinu, aby jeho koncentrace odpovídala $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měření probíhalo po dobu 10 minut při 515 nm a teplotě 30° C . Aktivita enzymu naměřená v Tris-HCl pufu byla přepočítána tak, aby odpovídala aktivitě změřené v KPi pufu.

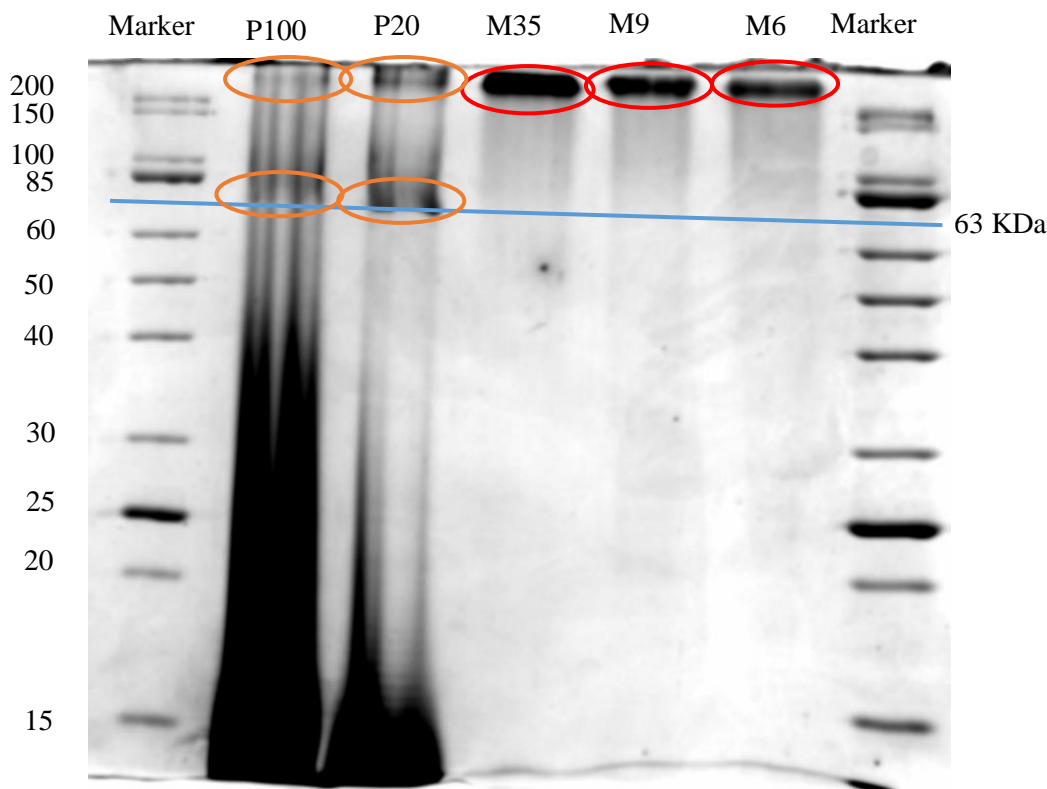
4. VÝSLEDKY

4.1. Kontrola imobilizace enzymu pomocí SDS PAGE elektroforézy

Po zkoncentrování imobilizovaných enzymů a kontrolního vzorku enzymu s vodou je patrné z elektroforegramu (Obr. 5), že došlo k posunu bandů u imobilizovaných enzymů. Band neimobilizovaného enzymu (kontrola) odpovídá molekulové hmotnosti hrachové aminoxidasy – 63 kDa, kdežto u imobilizovaných enzymů α -cyklodextrinem (CDA) a β -cyklodextrinem (CDB) došlo k zpomalení migrace. Vytvořily se 2 bandy, jeden s molekulovou hmotností přibližně 80 kDa a druhý s molekulovou hmotností přes 200 kDa. Obdobnou situaci lze vidět i u enzymu imobilizovaného γ -cyklodextrinem, kdy se vytvořily 2 bandy, jeden s molekulovou hmotností přibližně 85 kDa a druhý s molekulovou hmotností přes 200 kDa avšak vyšší než u zbylých dvoucyklodextrinů. U imobilizace škrobem se vytvořil pouze jeden band s molekulovou hmotností přes 200 kDa v obdobné oblasti jako u γ -cyklodextrinu.



Obr. 5: Elektroforegram imobilizace PsAO na 10% akrylamidovém gelu. V jednotlivých jankách se zleva nachází marker, kontrola, CDA (α -cyklodextrin), CDB (β -cyklodextrin), CDG (γ -cyklodextrin), škrob a marker.



Obr. 6: Elektroforegram imobilizace PsAO na 12% akrylamidovém gelu. V jednotlivých jamkách se zleva nachází marker, P100 (polybren:enzym 100:1 (w/w)), P20 (polybren:enzym 20:1 (w/w)), M35 (maltodextrin 17-35 jednotek), M9 (maltodextrin 7-9 jednotek), M6 (maltodextrin 5-7 jednotek) a marker.

Obdobný posun v migraci je patrný i u imobilizace s polybrenem (Obr. 6), kdy u obou koncentrací polybrenu jsou viditelné bandy v oblasti 63 kDa a v oblasti přes 200 kDa. Naopak u M35 (maltodextrin 17-35j), M9 (maltodextrin 7-9j) a M6 (maltodextrin 5-7j) je viditelný pouze jeden band v oblasti přes 200 kDa.

4.2. Stanovení koncentrace proteinů a specifické aktivity imobilizovaného enzymu

K imobilizaci byl využit enzym o koncentraci $3,55 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a specifické aktivitě $890 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$. Během zkoncentrování enzymu po imobilizaci došlo k značnému snížení obsahu proteinů ve většině vzorků to v rozmezí od $0,09 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $0,53 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tab. 4), nejmenší enzymové ztráty byly u obou imobilizací polybrenem a maltodextrinem 17-35j (P20 = $2,32 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, P100 = $1,98 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a M35 = $1,82 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Tab. 4: Tabulka koncentrací proteinů a aktivity u připravených modifikovaných enzymů a enzymu ve vodě.

Modifikace	Konc.proteinů (mg/ml)	Aktivita (nkat)	Spec. Aktivita (nkat/mg)
Kontrola	0,169	0,312	924,609
CDA	0,213	0,076	178,795
CDB	0,211	0,017	39,880
CDG	0,531	0,633	595,593
M6	0,086	0,874	5108,385
M9	0,168	0,846	2517,943
M35	2,319	1,179	254,309
P20	1,979	1,208	305,127
P100	1,821	1,044	286,543
Škrob	0,444	0,946	1065,489

CDA (α -cyklodextrin), CDB (β -cyklodextrin), CDG (γ -cyklodextrin), M6 (maltodextrin 5-7 jednotek), M9 (maltodextrin 7-9 jednotek), M35 (maltodextrin 17-35 jednotek), P20 (polybren:enzym 20:1 (w/w)), P100 (polybren:enzym 100:1 (w/w)).

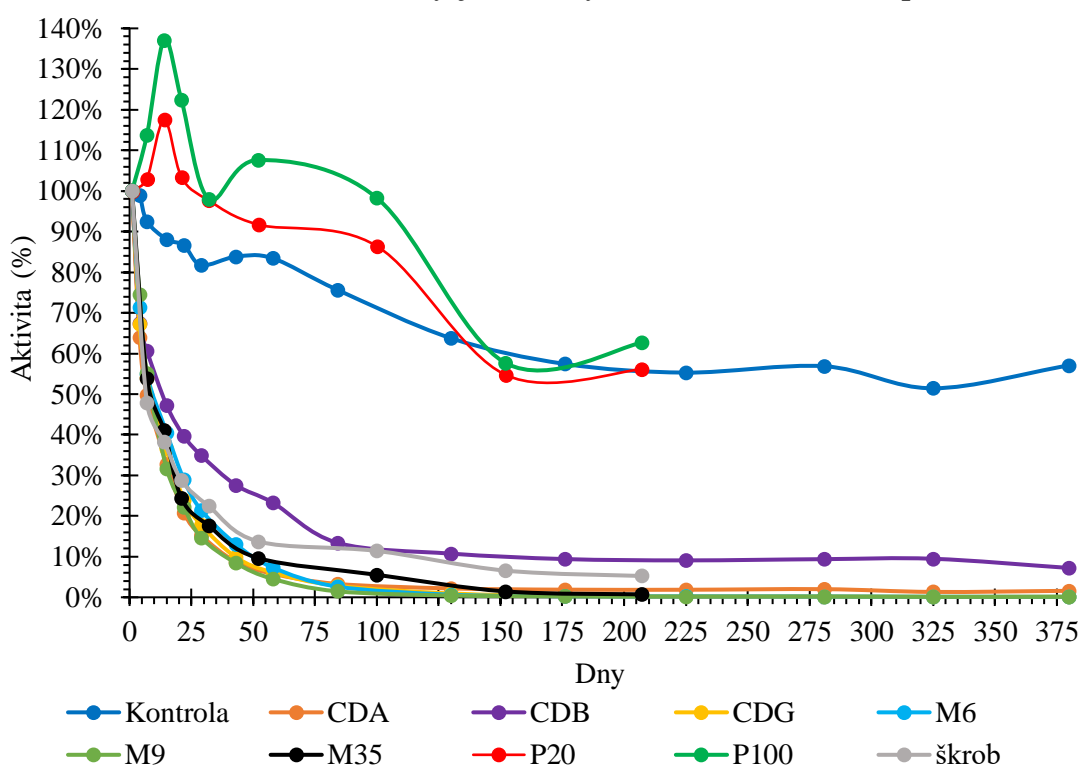
Specifická aktivita (Tab. 4) kontrolního vzorku byla téměř nezměněna ($924,61 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$), avšak u imobilizovaných enzymů došlo k výrazným změnám. U imobilizace cyklodextriny, polybrenem a maltodextrinem 17-35 j byly hodnoty specifické aktivity výrazně sníženy. Pohybovaly se od $39,88 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ do $595,59 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$, přičemž nejnižší specifickou aktivitu měl enzym s β -cyklodextrinem.

U škrobového imobilizátu byla pozorována přibližně stejná specifická aktivita, jako u kontrolního vzorku ($1065,49 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$). Enzym imobilizovaný maltodextrinem 5-7 j a maltodextrin 7-9 j měl naopak velmi vysokou specifickou aktivitu v porovnání s původním enzymem ($5108,38 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ a $2517,94 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$).

4.3. Měření stability imobilizovaného enzymu

Změřená aktivita enzymu a jeho imobilizací vůči putrescinu o koncentraci $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ při $30 \text{ }^\circ\text{C}$, byla přepočítána na relativní hodnotu, kdy jako 100 % je zobrazena počáteční aktivita enzymu nebo jeho imobilizátu. Stabilita byla měřena po dobu 380 dnů u kontroly a enzymu imobilizovaným s α -cyklodextrinem, β -cyklodextrinem, γ -cyklodextrinem, maltodextrinem 5-7j a maltodextrinem 7-9j. Pro enzymy s nosičem maltodextrin 17-35j, polybren:enzym 20:1 (w/w), polybren:enzym 100:1 (w/w) a škrob, které byly připraveny později, probíhalo měření po dobu 207 dnů.

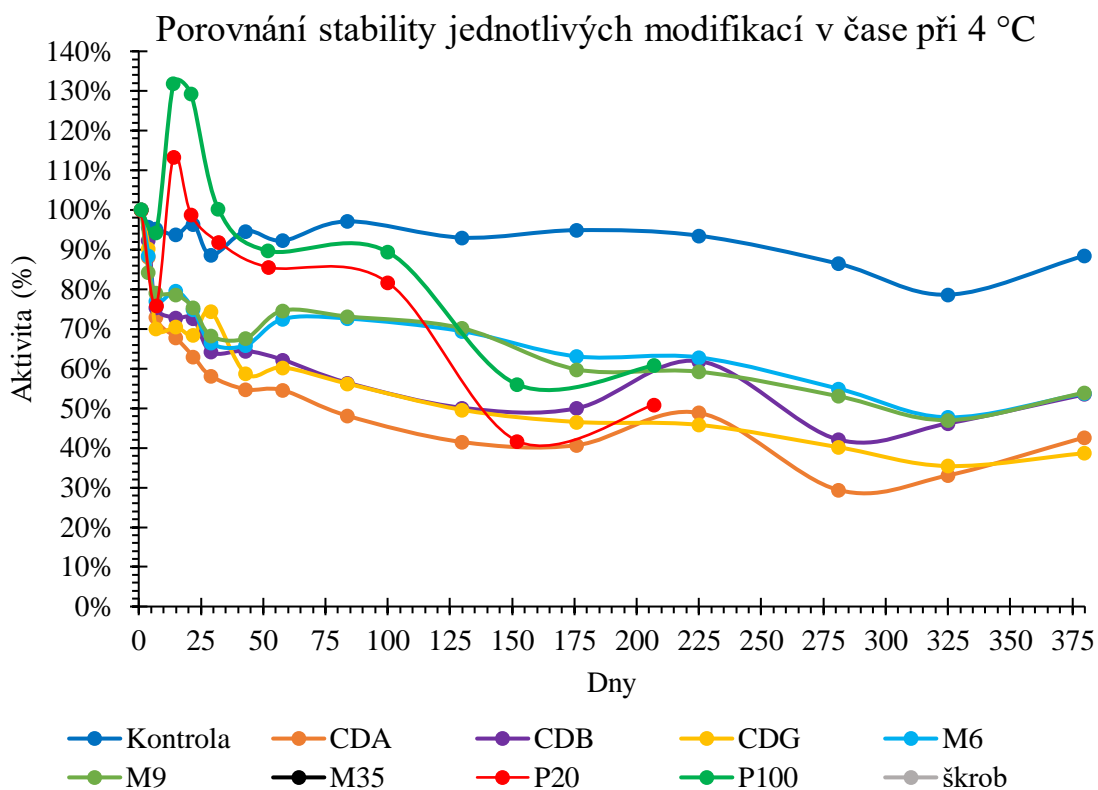
Porovnání stability jednotlivých modifikací v čase při 25 °C



Obr. 7: Porovnání zbytkové aktivity imobilizovaných enzymů s kontrolou skladovaných při 25 °C ve tmě. Pro nosiče imobilizovaného enzymu CDA (α -cyklodextrin), CDB (β -cyklodextrin), CDG (γ -cyklodextrin), M6 (maltodextrin 5-7 jednotek), M9 (maltodextrin 7-9 jednotek) byla aktivita sledována po dobu 380 dnů. Pro nosiče M35 (maltodextrin 17-35 jednotek), P20 (polybren:enzym 20:1 (w/w)), P100 (polybren:enzym 100:1 (w/w)) a škrob po dobu 207 dnů.

Enzymy pro měření stability byly skladovány při 25 °C a při 4 °C. U většiny imobilizátů skladovaných při 25 °C (Obr 7.) došlo během prvních 2-3 týdnů k prudkému poklesu aktivity, kdy reziduální aktivita byla pod 30 %. Výjimkami byly imobilizáty s β -cyklodextrinem kdy po 3 týdnech byla reziduální aktivita 40 %, a obě koncentrace polybrenu, kde se aktivita po dobu prvních 60 dnů nesnižovala. Prudce začala aktivita klesat až po přibližně 100 dnech. Kontrolní vzorek enzymu měl po prvních 3 týdnech přibližně 85 % zbytkové aktivity.

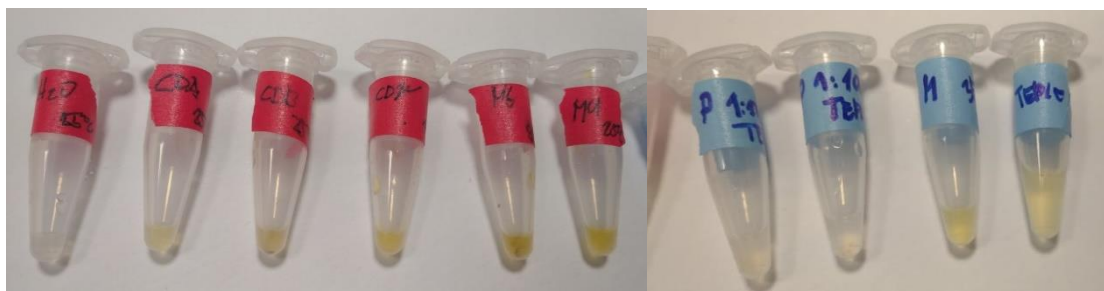
Na konci sledování stability byla reziduální aktivita u kontroly kolem 57 % (380 dnů), u polybrenu v dvacetinásobném nadbytku 56 % (207 dnů), u polybrenu v stonásobném nadbytku 63 % (207 dnů), u β -cyklodextrinu 7 % (380 dnů), u škrobu 5 % (207 dnů). U zbylých imobilizací byla reziduální aktivita nižší než 1 % již po 150 dnech.



Obr. 8: Porovnání zbytkové aktivity imobilizovaných enzymů s kontrolou skladovaných při 4 °C ve tmě. Pro nosiče imobilizovaného enzymu CDA (α -cyklodextrin), CDB (β -cyklodextrin), CDG (γ -cyklodextrin), M6 (maltodextrin 5-7 jednotek), M9 (maltodextrin 7-9 jednotek) byla aktivita sledována po dobu 380 dnů. Pro nosiče M35 (maltodextrin 17-35 jednotek), P20 (polybren:enzym 20:1 (w/w)), P100 (polybren:enzym 100:1 (w/w)) a škrob po dobu 207 dnů.

U imobilizovaných enzymů, které byly skladovány při 4 °C (Obr. 8), nedocházelo k tak výraznému poklesu aktivity jako v případě skladování za pokojové teploty. Nejvýraznější pokles aktivity proběhl v prvních 7 dnech, kdy většina imobilizací ztratila 20-30 % aktivity. Aktivita poté klesala mírně a na konci experimentu (380 dnů) se pohybovala v rozmezí 40-50 % reziduální aktivity.

Roztoky enzymu s polybrenem byly opět po dobu prvních 100 dnů stabilní, až poté došlo k razantnímu poklesu stability, kdy po 207 dnech dosahovaly 50 % (polybren:enzym 20:1 (w/w)) a 60 % reziduální aktivity (polybren:enzym 100:1 (w/w)). Kontrolní vzorek enzymu vykazoval po celou dobu experimentu velmi dobrou stabilitu, načež na konci byla jeho reziduální aktivita 88 %.



Obr. 9: Barevná změna roztoků imobilizovaného enzymu. Zleva H₂O (kontrola), CDA (α -cyklodextrin), CDB (β -cyklodextrin), CDG (γ -cyklodextrin), M6 (maltodextrin 5-7 jednotek), M9 (maltodextrin 7-9 jednotek), P20 (polybren:enzym 20:1 (w/w)), P100 (polybren:enzym 100:1 (w/w)), M35 (maltodextrin 17-35 jednotek) a škrob.

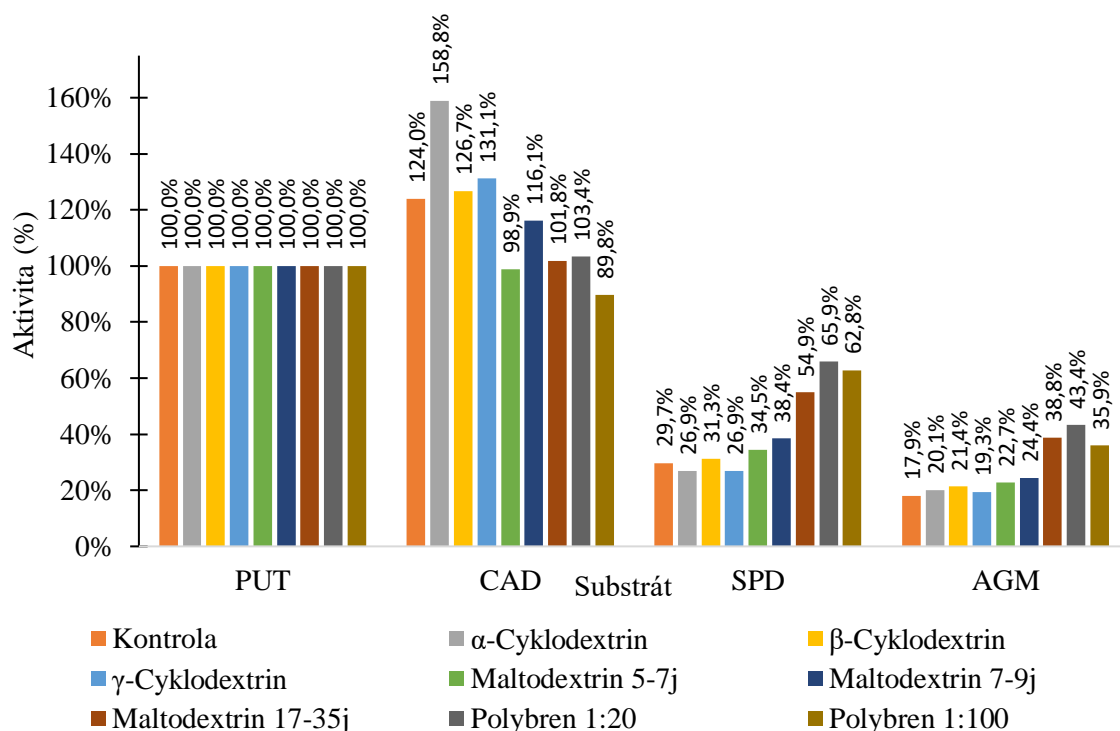
Stabilita při 4 °C nebyla sledována pro enzymy se škrobem a maltodextrinem 17-35 j jako nosičem. Tyto vzorky vytvořily v chladu gel, který se ani během půlhodinové inkubace v pokojové teplotě nerozpustil. Naproti tomu většina vzorků skladovaných při 25 °C prodělala barevnou změnu (zežloutnutí), který byla patrná již po 2-3 týdnech od imobilizace (Obr 8). Výjimku tvořily vzorky s polybrenem, které zůstaly čiré. Kontrolní vzorek taktéž změnám v barvě nepodleh.

4.4. Substrátové specifity imobilizovaných hrachových aminoxidas

Substrátová specifita, která byla změřena pro jednotlivé substráty $[S] = 1,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ při 30 °C, byla vyhodnocena v podobě grafů. Aktivita byla přepočítána na relativní hodnoty, ty jsou uvedeny v % aktivity oxidace daného substrátu vůči aktivitě pro oxidaci putrescinu. Nejlepšími substráty PsAO i jejich imobilizovaných forem (Obr. 10), byli putrescin a kadaverin, o něco horšími substráty pak spermidin a agmatin.

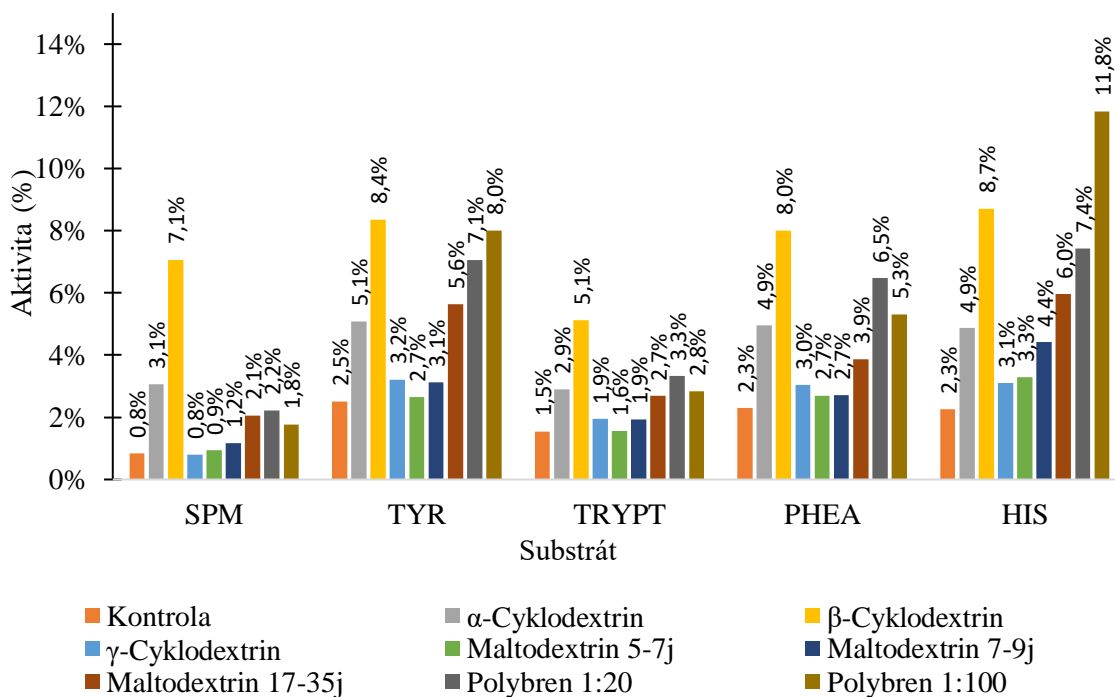
Mezi jednotlivými imobilizačními nosiči byly patrné rozdíly, kdy u α -cyklodextrinu byla aktivita vůči kadaverinu přibližně o 30 % vyšší než v případě kontroly. Naopak u maltodextrinu 5-7 j, maltodextrinu 17-35 j, obou polybrenů a škrobu, byla aktivita s kadaverinem o 20-30 % nižší než v případě kontroly. U spermidinu a agmatinu vykazují nosiče polybren a škrob přibližně dvojnásobnou aktivitu oproti kontrole.

Substrátová specifita PsAO a jejích imobilizací



Obr. 10: Porovnání substrátové specifity čtyř nejlepších substrátů PsAO a jejich jednotlivých imobilizací.

Substrátová specifita PsAO a jejích imobilizací



Obr. 11: Porovnání substrátové specifity dalších substrátů hrachové aminoxidasy a jejich jednotlivých typů imobilizací.

U substrátů spermin, tyramin, tryptamin, fenylethylamin a histamin byla aktivita vůči putrescinu v rozmezí 0,8 a 11,8 % (Obr. 11). Substráty tyramin, tryptamin, fenylethylamin a histamin vykazovaly nejvýraznější rozdíly v substrátové specifitě u α -cyklodextrinu a β -cyklodextrinu, obou polybrenů a škrobu, kdy u těchto nosičů byla aktivita vůči kontrole výrazně vyšší.

4.5. Základní kinetické parametry čtyř nejlepších substrátů hrachové aminoxidasy

Kinetika reakcí měřených při 30 °C potvrzuje, že nejlepším substrátem pro PsAO je kadaverin. Poměr V/K_m se pohybuje v rozmezí 303,58-516,83 % hodnoty pro oxidaci putrescinu (Tab. 5). Výjimku tvoří imobilizace s maltodextrinem 17-35 j, která oxiduje putrescin i kadaverin (100,17 %) přibližně stejnou rychlostí. Nižší poměr V/K_m je pozorovatelný u spermidinu a agmatinu, avšak hodnoty se mezi jednotlivými imobilizacemi liší, a to v rozmezí od 4,74 % do 47,28 % pro spermidin a od 7,91 % do 48,46 % pro agmatin.

Hodnota Michaelisovy konstanty je pro putrescin jsou u kontroly 282,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ u imobilizovaných enzymů v rozmezí 220,9-304,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s výjimkou maltodextrinu 17-35 j, kde je hodnota K_M výrazně snížena na 78,56 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Hodnoty K_M pro kadaverin se od kontroly (62,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) výrazně neliší a pohybují se v rozmezí 42,5-76,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Větší rozdíly hodnot K_M oproti kontrole jsou patrné u spermidinu (1368,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a agmatinu (272,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), kdy se hodnoty Michaelisovy konstanty pro spermidin pohybují v rozmezí 369,6-1854,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (798,4-1854,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bez P20), přičemž pro stabilizaci enzymu polybrenem ve dvacetinásobném hmotnostním nadbytku je hodnota K_M výrazně nižší, než je tomu u jiných imobilizací. Pro agmatin jsou rozdíly vůči kontrole menší a pohybují se v rozmezí 150,3-357,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

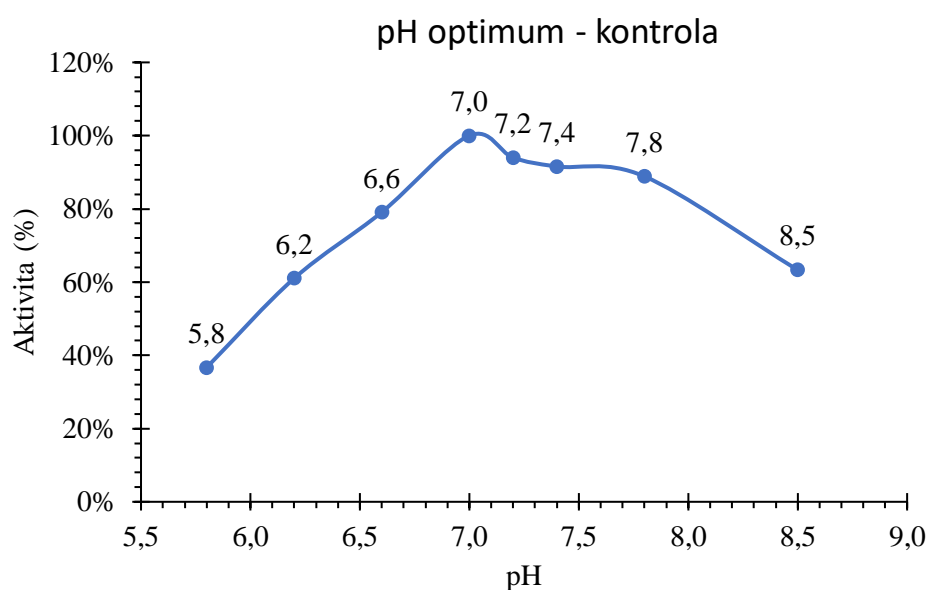
Tab. 5: Základní kinetické parametry PsAO a jejich imobilizací.

Modifikace	Amín	K_m	V	V/K_m
		($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	($\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Relativní
Kontrola	PUT	$282,9 \pm 20,7$	$1206,0 \pm 28,0$	100,00 %
	CAD	$62,6 \pm 8,9$	$1247,0 \pm 36,5$	463,91 %
	SPD	1368 ± 207	$662,3 \pm 50,0$	11,36 %
	AGM	$272,1 \pm 35,3$	$214,4 \pm 7,5$	18,48 %
CDA	PUT	$276,2 \pm 39,1$	$221,7 \pm 9,6$	100,00 %
	CAD	$74,9 \pm 9,5$	$310,6 \pm 7,6$	516,83 %
	SPD	$1854,0 \pm 499,0$	$121,9 \pm 19,9$	8,19 %
	AGM	$322,3 \pm 73,1$	$42,48 \pm 3,1$	16,43 %
CDB	PUT	$220,9 \pm 23,8$	$47,2 \pm 1,5$	100,00 %
	CAD	$52,9 \pm 5,0$	$55,8 \pm 1,0$	493,66 %
	SPD	$1852 \pm 435,0$	$31,8 \pm 4,5$	8,04 %
	AGM	$158,1 \pm 32,6$	$10,0 \pm 0,4$	29,60 %
CDG	PUT	$267,4 \pm 16,3$	$713,7 \pm 13,8$	100,00 %
	CAD	$70,3 \pm 12,9$	$831,7 \pm 32,6$	443,26 %
	SPD	$861,9 \pm 248,9$	$252,5 \pm 34,2$	10,98 %
	AGM	$177,2 \pm 53,4$	$133,5 \pm 5,2$	28,23 %
M6	PUT	$238,0 \pm 21,9$	$6042,0 \pm 166,0$	100,00 %
	CAD	$63,8 \pm 11,5$	$5386,0 \pm 198,0$	332,38 %
	SPD	$798,4 \pm 91,0$	$2970,0 \pm 156,0$	14,65 %
	AGM	$346,2 \pm 37,5$	$1470,0 \pm 56,0$	16,73 %
M9	PUT	$304,0 \pm 19,5$	$3208 \pm 69,5$	100,00 %
	CAD	$76,3 \pm 13,1$	$3276 \pm 121,0$	407,09 %
	SPD	$1604,0 \pm 309,5$	$2211 \pm 248,0$	13,06 %
	AGM	$357,8 \pm 24,5$	$779 \pm 19,0$	20,63 %
M35	PUT	$78,56 \pm 13,2$	$310,3 \pm 11,8$	100,00 %
	CAD	$68,9 \pm 10,5$	$272,4 \pm 9,3$	100,17 %
	SPD	$1064 \pm 181,6$	$243,4 \pm 21,3$	4,74 %
	AGM	$329,5 \pm 41,9$	$125,7 \pm 5,9$	7,91 %
P20	PUT	$252,1 \pm 22,4$	$390,5 \pm 10,5$	100,00 %
	CAD	$42,5 \pm 9,7$	$329,5 \pm 13,7$	500,99 %
	SPD	$369,6 \pm 31,6$	$270,7 \pm 8,0$	47,28 %
	AGM	$299,9 \pm 26,8$	$169,5 \pm 4,9$	36,49 %
P100	PUT	$229,3 \pm 18,5$	$350,4 \pm 8,3$	100,00 %
	CAD	$59,9 \pm 6,4$	$279,1 \pm 12,3$	303,58 %
	SPD	$774,5 \pm 63,4$	$305,1 \pm 11,3$	25,67 %
	AGM	$153,0 \pm 21,9$	$113,8 \pm 4,6$	48,46 %

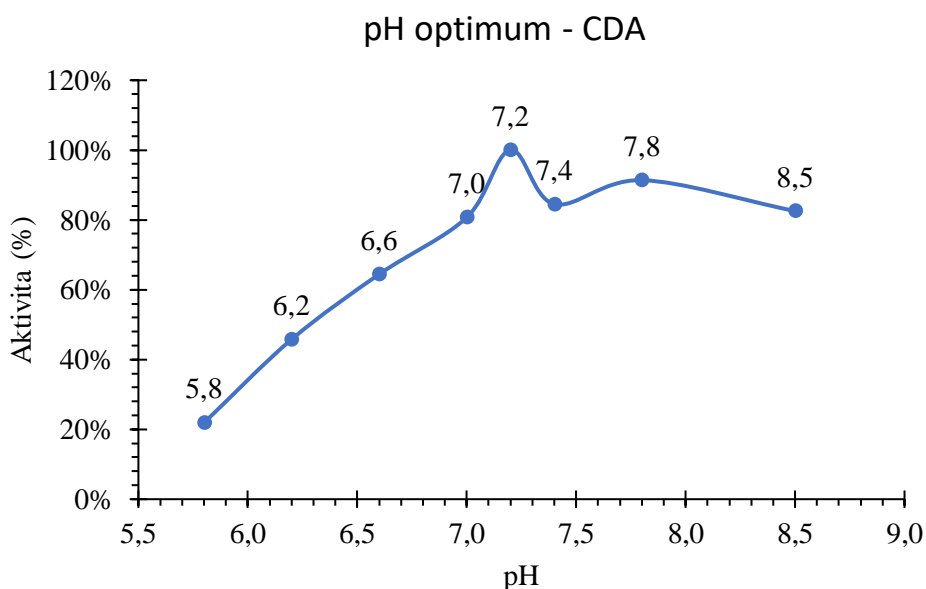
CDA (α -cyklodextrin), CDB (β -cyklodextrin), CDG (γ -cyklodextrin), M6 (maltodextrin 5-7 jednotek), M9 (maltodextrin 7-9 jednotek) M35 (maltodextrin 17-35 jednotek), P20 (polybren:enzym 20:1 (w/w)), P100 (polybren:enzym 100:1 (w/w)).

4.6. Stanovení pH optima hrachové aminoxidasy a jejích imobilizací

Změřené hodnoty aktivity enzymu s koncentrací putrescinu $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly přepočítány na relativní hodnotu, přičemž jako 100 % je uvedena nejvyšší dosažená aktivita u dané imobilizace nebo kontroly. Kontrolní vzorek enzymu (Obr. 12) bez imobilizace vykazoval nejvyšší aktivitu u pH 7,0. Enzym imobilizovaný α -cyklodextrinem vykazoval vyšší aktivitu v alkalické oblasti pH (Obr. 13) s pH optimumm 7,2.

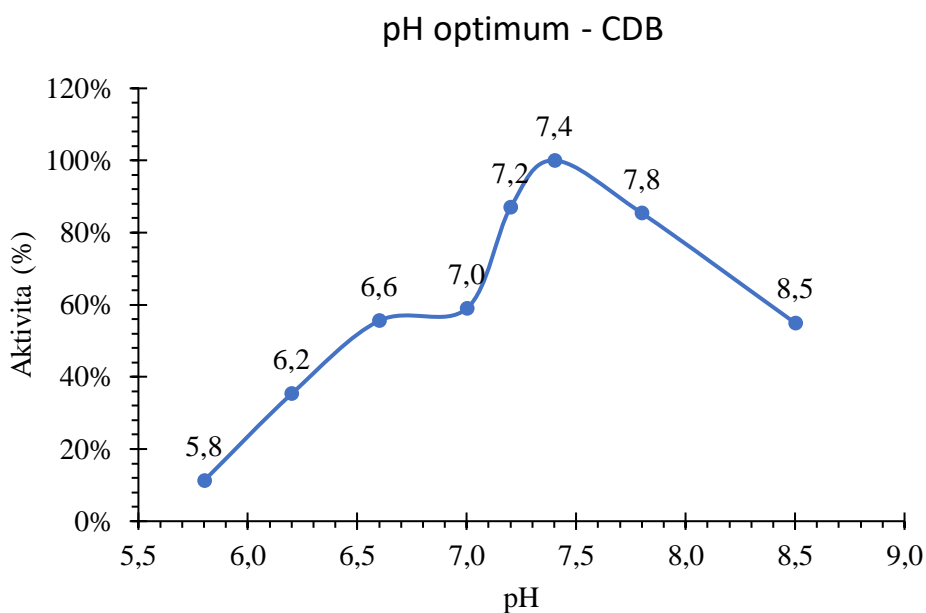


Obr. 12: Graf pH optima hrachové aminoxidasy bez imobilizace.

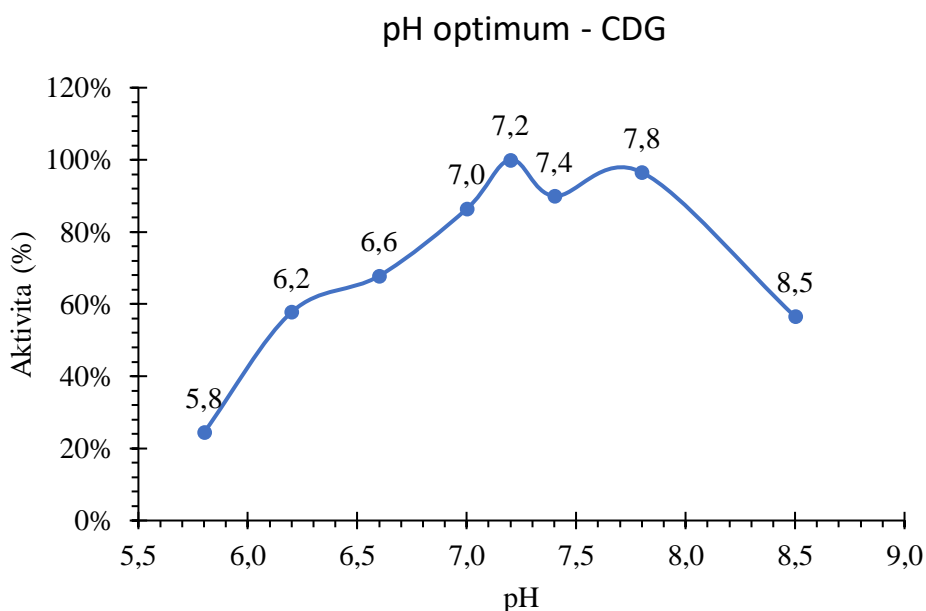


Obr. 13: Graf pH optima hrachové aminoxidasy imobilizované pomocí α -cyklodextrinu.

Enzym imobilizovaný β -cyklodextrinem (Obr. 14) vykazoval nejvyšší aktivitu u pH 7,4, ale na rozdíl od α -cyklodextrinu klesala aktivita intenzivně s rostoucím pH. U γ -cyklodextrinu (Obr. 14) nebyla zaznamenána výrazná změna v aktivitě v okolí pH optima, které bylo pro tuto imobilizaci 7,2.

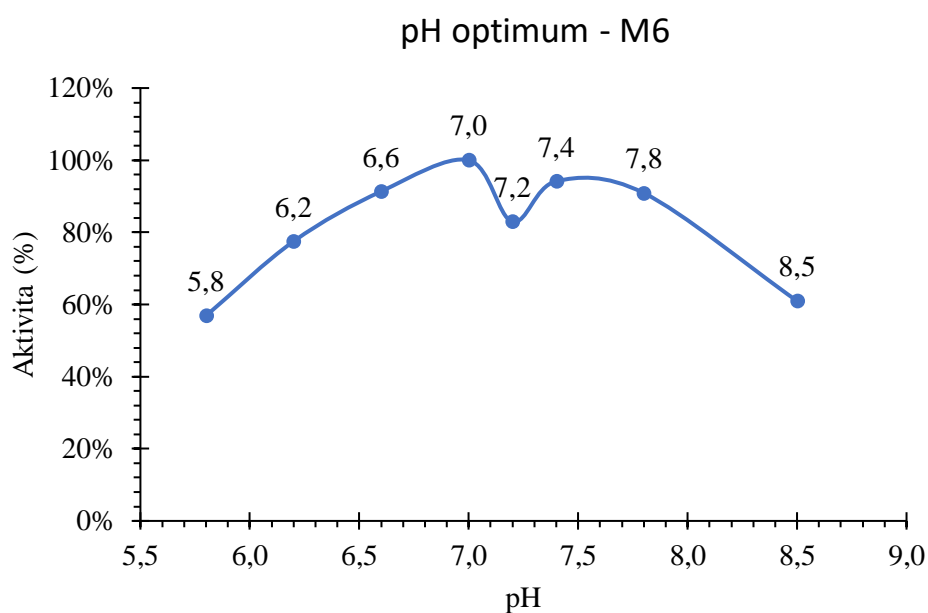


Obr. 14: Graf pH optima hrachové aminoxidasy imobilizované pomocí β -cyklodextrinu.

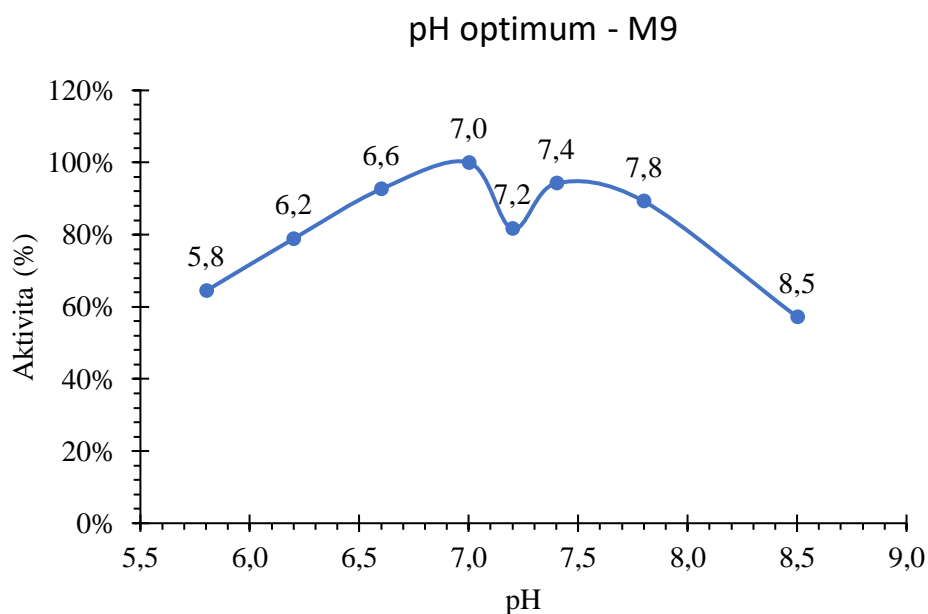


Obr. 15: Graf pH optima hrachové aminoxidasy imobilizované pomocí γ -cyklodextrinu.

Maltodextrin 5-7 j (Obr. 16) a maltodextrin 7-9 j (Obr. 17) měli velmi podobné grafy pH optima. Oba nosiče enzymu vykazovaly pH optimum 7,0 s následným poklesem aktivity u pH 7,2 a opětovným nárustem aktivity u pH 7,4.

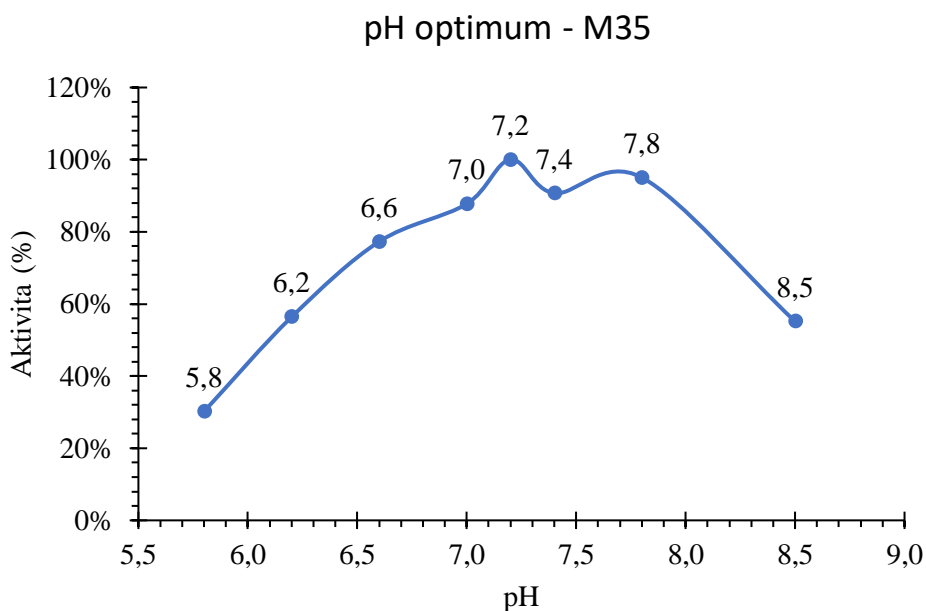


Obr. 16: Graf pH optima hrachové aminoxidasy imobilizované pomocí maltodextrinu 5-7 j.

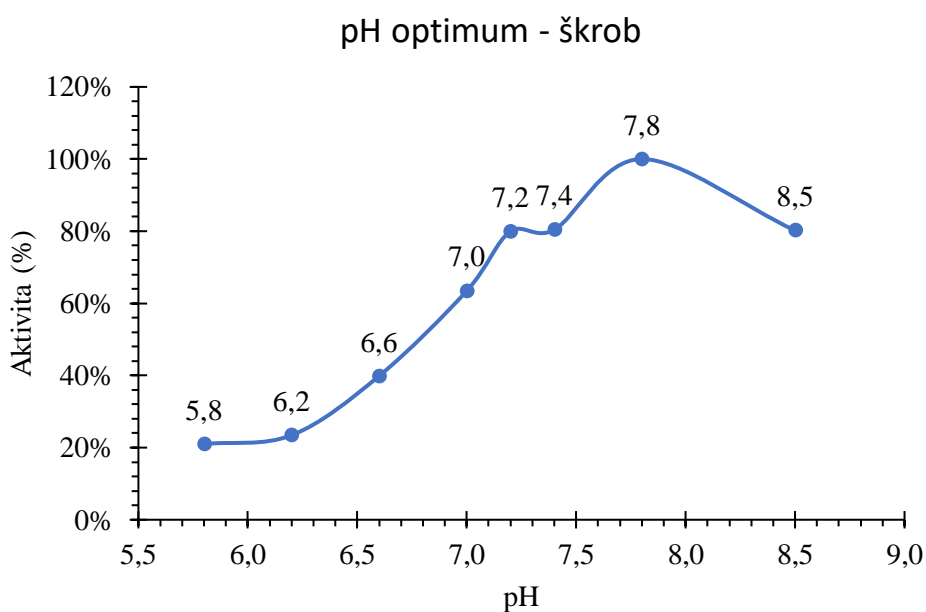


Obr. 17: Graf pH optima hrachové aminoxidasy imobilizované pomocí maltodextrinu 7-9 j.

Optimální pH pro imobilizovaný enzym maltodextrinem 17-35 j (Obr. 18) bylo 7,2. Vysoce aktivní byl enzym i v rozmezí pH 7,0-7,8. Oproti tomu enzym imobilizovaný škrobem (Obr. 19) vykazoval vysokou aktivitu v zásaditém prostředí s výrazným posunem pH optima na hodnotu 7,8. Naopak v kyselějším prostředí byla aktivita enzymu nízká.

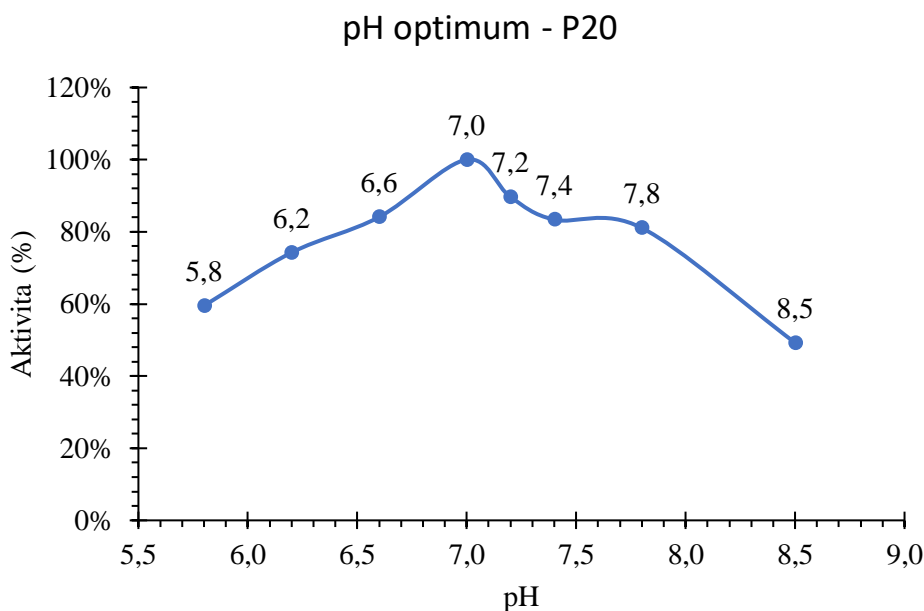


Obr. 18: Graf pH optima hrachové aminoxidasy imobilizované pomocí maltodextrinu 17-35 j.

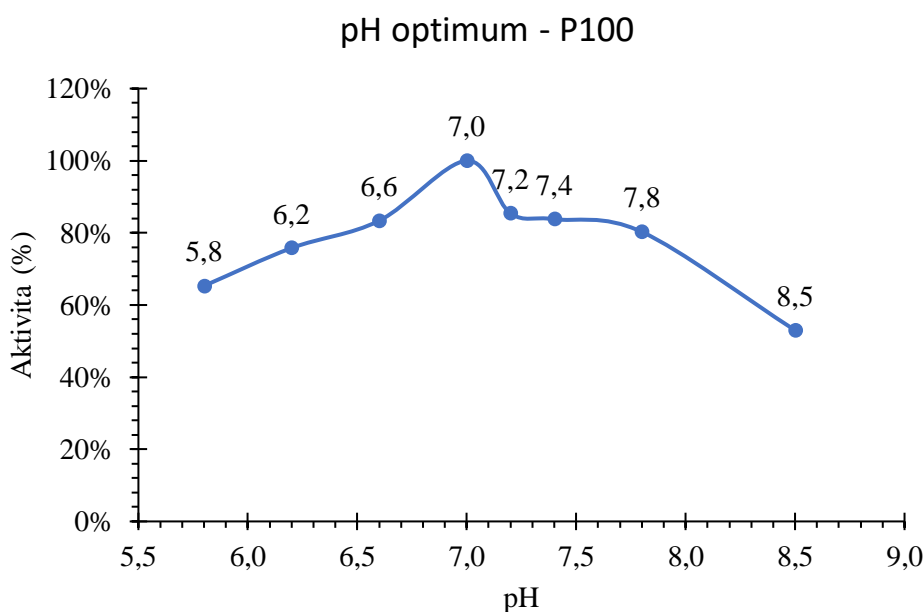


Obr. 19: Graf pH optima hrachové aminoxidasy imobilizované pomocí škrobu.

Grafy stanovení pH optima pro imobilizaci enzymu pobybrenem v hmotnostním poměru ve prospěch polybrenu 20:1 (Obr. 20) a v hmotnostním poměru 100:1 ve prospěch polybrenu (Obr. 21), jsou velmi podobné grafu pH optima hrachové aminoxidasy bez imobilizace (Obr. 12; str. 47). Optimální pH pro obě koncentrace polybrenu je 7.0 s pozvolným poklesem aktivity do pH 7,8.



Obr. 20: Graf pH optima hrachové aminoxidasy imobilizované pomocí polybrenu, kdy je polybren v nadbytku vůči enzymu (polybren:enzym 20:1 (w/w)).



Obr. 21: Graf pH optima hrachové aminoxidasy imobilizované pomocí polybrenu, kdy je polybren v nadbytku vůči enzymu (polybren:enzym 100:1 (w/w)).

5. DISKUZE

Aktivitu hrachové aminoxidasy je velmi obtížné porovnat, neboť se liší i mezi jednotlivými odrůdami hrachu (Luhová *et al.*, 2003). Dle dostupné literatury se specifická aktivita pro PsAO pohybuje v rozmezí od 13,83 nkat·mg⁻¹ (Kivirand a Rincken, 2007) do 1630 nkat·mg⁻¹ (Vianello *et al.*, 1999). Další autoři uvádějí specifickou aktivitu 1170 nkat·mg⁻¹ (Padiglia *et al.*, 1991), 830 nkat·mg⁻¹ (Šebela *et al.*, 2004), 254 nkat·mg⁻¹ (Luhová *et al.*, 1996), 199 nkat·mg⁻¹ (Bílková *et al.*, 2005), 161,6 nkat·mg⁻¹ (Kluetz *et al.*, 1980), 112,5 nkat·mg⁻¹ (Daveci a Güvenilir, 1994). Specifická aktivita 890 nkat·mg⁻¹ získaná izolací enzymu z hrachových klíčků je v souladu s literaturou.

U enzymů, které jsou imobilizované pomocí kovalentní vazby, může docházet k zvýšení specifické aktivity díky vhodné orientaci proteinů (Fu *et al.*, 2011, Mateo *et al.*, 2007) na druhou stranu imobilizované enzymy nejčastěji vykazují značnou ztrátu aktivity a obecně vyšší hodnoty Michaelisovy konstanty kvůli obtížnějšímu přístupu k substrátu (Kress *et al.*, 2002, Mateo *et al.*, 2007). U většiny nosičů použitých pro imobilizaci hrachové aminoxidasy došlo k výraznému snížení specifické aktivity. U imobilizace škrobem došlo k mírnému nárůstu specifické aktivity vůči kontrole, ale kvůli vlastnostem škrobu, kdy dochází k tvorbě gelu i při nízké koncentraci (Homaei *et al.*, 2013), je práce s takovým vzorkem obtížná. U maltodextrinu 5-7 j a maltodextrinu 7-9 j došlo sice k velmi výraznému navýšení specifické aktivity, ale dle množství zobrazených proteinů při elektroforéze, zde došlo k podhodnocení reálné koncentrace proteinů ve vzorku, a tudíž umělému navýšení specifické aktivity.

Tak jako u specifické aktivity, jsou i u substrátové specifity velké rozdíly mezi jednotlivými autory. Substrátová specifita kadaverinu se pohybuje v rozmezí 106-116 % aktivity putrescinu. Konkrétně 111 % (Medda *et al.*, 1995), 116 % (Kivirand a Rincken, 2007) a 106 % (Luhová *et al.*, 1996). Ještě větší rozdíly jsou patrné u histaminu: 30 % (Medda *et al.*, 1995), 11,4 % (Kivirand a Rincken, 2007) a 5 % (Luhová *et al.*, 1996). U dalších substrátů je v literatuře uvedena substrátová specifita pro agmatin 56 %, spermin 8 % a spermidin 56 % (Medda *et al.*, 1995), ale pro spermidin i 20 % aktivity putrescinu (Luhová *et al.*, 1996). Avšak nejlepšími čtyřmi substráty z výše uvedených jsou putrescin, kadaverin, agmatin a spermidin, což odpovídá výsledkům uvedeným v diplomové práci.

Imobilizace enzymu může změnit i selektivitu substrátů (Mateo *et al.*, 2007), proto se liší naměřené hodnoty substrátové specifity mezi jednotlivými variacemi

imobilizované PsAO. Ty jsou navíc nejpatrnější u substrátů, s kterými má PsAO nižší aktivitu.

Taktéž hodnoty Michaelisovy konstanty se pro hrachovou aminoxidasu mezi jednotlivými autory značně liší. Michaelisova konstanta (K_M) pro putrescin je udávána jako $220 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Šebela *et al.*, 2004), $430 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Pietrangeli *et al.*, 2007) a $1150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Kivirand a Rincken, 2007). Pro kadaverinu je hodnota K_M ještě rozdílnější, $1919 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Kivirand a Rincken, 2007) a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Šebela *et al.*, 2004) a pro spermidin $2900 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Pietrangeli *et al.*, 2007). Z těchto důvodů je obtížné porovnat správnost získaných kinetických hodnot pro nativní enzym (PUT = $282,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; CAD $62,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; SPD = $1368 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a AGM = $272,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Jak už bylo uvedeno výše, tak imobilizované enzymy mají obecně vyšší hodnoty Michaelisovy konstanty kvůli obtížnějšímu přístupu k substrátu, ale taktéž může vlivem imobilizace dojít k zpřístupnění aktivního místa pro určitý substrát (Kress *et al.*, 2002, Mateo *et al.*, 2007). Pouze u tří nosičů pro imobilizaci došlo k výrazné změně Michaelisovy konstanty. Prvním je maltodextrin 17-35 j, u kterého byla naměřena velmi nízká hodnota K_M ($78,56 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) pro putrescin, přičemž byla velmi podobná K_M pro kadaverin, který je všeobecně znám jako nejlepší přirozený substrát PsAO. K výrazné změně K_M došlo i u obou variant stabilizace enzymu polybrenem, přičemž došlo k snížení hodnot pro agmatin a spermidin, a tudíž jejich lepší oxidaci.

Hlavním cílem práce bylo porovnání stability nativního enzymu a jeho imobilizovaných forem při pokojové teplotě ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) a v chladu ($4 \text{ }^\circ\text{C}$). Bylo očekáváno, že stabilita některé z imobilizovaných forem hrachové aminoxidasy bude stabilnější než samotná aminoxidasa bez imobilizace. Tento fakt byl očekáván například u imobilizace β -cyklodextrinem, kdy dle literatury by měla mít imobilizovaná forma po dvou týdnech skladování v teple více než 90 % reziduální aktivity a nativní enzym pouhých 50 % zbytkové aktivity (Šebela *et al.*, 2004). Zvýšená stabilita byla očekávána taktéž v případě fixace enzymu polykationtem polybrenem. Kdy Efremenko a kolektiv (2002) uvádí, že polybren je schopný stabilizovat enzym (organofosfáthydrolasu) po dobu 60 dnů a zvýšit také jeho odolnost vůči ethanolu.

Sledování stability nativního a imobilizovaného enzymu bylo úspěšné jen z části, kdy došlo k zvýšení stability oproti kontrole jen u enzymu s polybrenem skladovaném v teple, a to pro obě koncentrace polybrenu jen s minimálními rozdíly. Zlom nastal přibližně po 90-100 dnech, kdy aktivita enzymu s polybrenem začala prudce klesat a dostala se pod hodnoty nativního enzymu. Nativní enzym byl přes očekávání rychlého

poklesu aktivity naopak velmi stabilní a na konci experimentu (po 380 dnech) dosahoval téměř 60 % reziduální aktivity (v teple) a blížil se k 90 % reziduální aktivity v chladu. Toto neobvyklé chování enzymu mohlo být způsobeno například nečistotou, která se do vzorku dostala ze znečištěného skla či během přípravy imobilizovaných forem, a stabilizovala tak enzym před jeho degradací.

U ostatních imobilizací, včetně β -cyklodextrinu, došlo k rychlému snížení aktivity, přičemž mnohé z těchto imobilizací nevykazovaly žádnou aktivitu při skladování v teple již po 150 dnech. Tento fakt mohl být jednak zapříčiněn kontaminací vzorků oxidačním činidlem použitým během modifikace nosičů tak možnou bakteriální kontaminací. Pro kontaminaci oxidačním činidlem nasvědčuje i fakt, že vzorky prodělaly relativně krátké doby barevnou změnu (zežloutnutí). Což se u vzorků, kde nebylo oxidační činidlo použito (polybren, kontrola), nestalo. Na druhou stranu, vzorky uložené v chladu, neprošly barevnou změnou což by vypovídalo spíše o rozkladu enzymu podpořeným bakteriální činností.

Optimální pH pro oxidační deaminaci aminů hrachovou aminoxidasou je udáváno dle literatury 7,0 (Padiglia *et al.*, 1991; Luhová *et al.*, 2003) nebo 7,2 (Daveci a Güvenilir, 1994; Vianello *et al.*, 1999; Pietrangeli *et al.*, 2006). U izolovaného enzymu (kontrola) vyplývá, že změřené pH optimum 7,0 je ve shodě s dostupnými zdroji. Co se týká imobilizované hrachové aminoxidasu, tak u obou koncentrací polybrenu použitých pro fixaci, nedošlo k změně pH optima enzymu, navíc byly grafy s aktivitou při různé hodnotě pH velmi podobné nativnímu enzymu. K stejnému závěru došli i ve studii zabývající se stabilizací tyrosinasy polybrenem (Shipovskov a Levashov; 2003).

U imobilizace β -cyklodextrinem došlo k výraznějšímu posunu pH optima na hodnotu 7,4, přičemž i nosič α -cyklodextrin vykazoval zvýšenou stabilitu v alkalické oblasti oproti neimobilizovanému enzymu. Změna pH optima imobilizovaného enzymu je zaznamenána ve více studiích (Arica *et al.*, 1995; Altun a Cetinus, 2007; Markošová *et al.*, 2016). Nejvýraznější posun byl zaznamenán u imobilizace škrobem, kdy pH optimum bylo stanoveno na hodnotu 7,8. Tento fakt mohl být způsoben i povahou škrobu, který má tendenci tvořit rosol. Nerozpuštěné částičky škrobu s enzymem se tak vlivem pH mohly rozpustit a zpřístupnit tak větší množství enzymu pro reakci. Využití škrobu při imobilizaci skví v schopnosti pomalu uvolňovat látky, a proto je ceněný ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu (Bezerra *et al.*, 2015).

6. ZÁVĚR

Hlavním cílem práce bylo ověření zvýšené stability hrachové aminoxidasy po navázání na nosič (oligosacharid, polysacharid, polyelektrolyt). Očekávané zlepšení stability (pro případnou tvorbu biosenzoru) bylo u fixace enzymu β -cyklodextrinem a polybrenem. Experiment nebyl příliš úspěšný, neboť se enzym podařilo stabilizovat pouze polybrenem. Použitím ostatních nosičů α -cyklodextrin a γ -cyklodextrin, škrob, maltodextrin 5-7 j, maltodextrin 7-9 j a maltodextrin 17-35 j se nepodařilo enzym stabilizovat a došlo k rychlejšímu poklesu aktivity než u nativního enzymu. β -cyklodextrin s enzymem sice vykazoval vyšší stabilitu než ostatní imobilizace, avšak snižování aktivity bylo taktéž rychlejší než v případě neimobilizovaného enzymu.

Pro tvorbu případného biosenzoru pro detekci aminů a polyaminů na bázi hrachové aminoxidasy, případně kombinaci více aminoxidas pro lepší detekci tyraminu a histaminu, by bylo možné využít stabilizaci polybrenem. Případně použít stabilizaci polybrenem v kombinaci s jinou imobilizační technikou (Efremenko *et al.*, 2002)

Alternativou je imobilizace enzymu pomocí různých druhů nanočástic (kovy, oxidy kovů, magnetické, polymerní), či mezoporezních materiálů (Kejten Black, MFC, OMCs,...), které jsou v dnešní době velmi oblíbené (Zhou a Hartmann, 2013; Ahmad a Sardar, 2015; Xia *et al.*, 2017) a využívají se pro stabilizaci aminoxidas a peroxidas při tvorbě elektrochemických biosenzorů biogenních aminů (Verma *et al.*, 2019).

Existuje několik známých aminoxidas specifických pro tyramin například u mikroorganismů (*Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella aerogenes*) nebo aminoxidasa z máku setého (*Papaver somniferum* L.), která vyhazuje dobrou oxidaci tyraminu i tryptaminu. Bakterie *Enterobacter aerogenes* mimo jiné aminy vykazuje výraznou oxidaci histaminu a *Brevibacterium ammoniagenes* oxidaci tryptaminu (Murooka *et al.* 1979; Bilková *et al.*, 2005). Některá z těchto aminoxidas by mohla být využita pro biosenzor na analýzu biogenních aminů v potravinách, kde se ve větším množství nachází putrescin, cadaverin, spermidin, agmatin a v případě mikrobiální kontaminace i nebezpečný tyramin a histamin (Kalač a Křížek, 2003). Naopak v klinických vzorcích se vyskytuje hlavně putrescin, spermin a spermidin (Boffi *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2017).

7. LITERATURA

- Agostinelli E. a Seiler N. (2006) Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer: Therapeutic implications. *Amino Acids* 31, 341–355. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0271-8>
- Agostinelli E., Condello M., Tempera G., Macone A., Bozzuto G., Ohkubo S., Calcabrini A., Arancia G., Molinari A. (2014): The combined treatment with chloroquine and the enzymatic oxidation products of spermine overcomes multidrug resistance of melanoma M14 ADR2 cells: A new therapeutic approach. *International Journal of Oncology* 45, 1109–1122. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2502>
- Agostinelli E., Przybytkowski E., Averill-Bates D. A. (1996): Glucose, glutathione, and cellular response to spermine oxidation products. *Free Radical Biology and Medicin* 20:5, 649–656. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02149-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02149-3)
- Agostinelli E., Tempera G., Viceconte N., Saccoccio S., Battaglia V., Grancara S., Toninello A., Stevanato R. (2010): Potential anticancer application of polyamine oxidation products formed by amine oxidase: a new therapeutic approach. *Amino Acids* 38, 353-368. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0431-8>
- Ahmad R., Sardar M. (2015): Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* 4:2, 1-8. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000178>
- Aigner M., Kalcher K., Macheroux P., Lienhart W. D., Wallner S., Edmondson D., Ortner A. (2017): Determination of Total Monoamines in Rat Brain via Nanotubes Based Human Monoamine Oxidase B Biosensor. *Elektroanalysis* 29, 367-373. <https://doi.org/10.1002/elan.201600326>
- Airenne T. T., Nymalm Y., Kidron H., Smith D. J., Pihlavisto M., Salmi M., Jalkanen S., Johnson M. S., Salminen T. A. (2005): Crystal structure of the human vascular adhesion protein-1: Unique structural features with functional implications. *Protein Science* 14, 1964–1974. <https://doi.org/10.1110/ps.051438105>
- Albertsen M., Bellahn I., Krämer R., Waffenschmidt S. (2003): Localization and function of the yeast multidrug transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 278:15,12820–12825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210715200>
- Altun G. D., Cetinus S. A. (2007): Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry* 100:3, 964-971. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.005>
- Angelini R., Cona A., Federico R., Fincato P., Tavladoraki P., Tisi A. (2010): Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:7, 560-564. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.02.001>
- Arica M. Y., Hasirci V., Alaeddinoğlu N. G. (1995): Covalent immobilization of α -amylase onto pHEMA microspheres: preparation and application to fixed bed reactor. *Biomaterials* 16:10, 761-768. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)99638-3](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)99638-3)
- 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.
- Averill-Bates D. A., Ke Q., Tanel A., Roy J., Fortier G., Agostinelli E. (2008): Mechanism of cell death induced by spermine and amine oxidase in mouse melanoma cells. *International Journal of Oncology* 32,79-88. <https://doi.org/10.3892/ijo.32.1.79>
- Bachrach U. (2004): Polyamines and cancer: minireview article. *Amino Acids* 26, 307-309. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0076-6>
- Bachrach U. (2004): Polyamines and cancer: minireview article. *Amino Acids* 26, 307-309. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0076-6>
- Bezerra C. S., de Farias Lemos C. M. G., de Sousa M., Gonçalves L. R. B. (2015): Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. *Journal of Applied Polymer Science* 132, 42125. <https://doi.org/10.1002/app.42125>
- Bilková A., Bezáková L., Bilka F., Pešenák M. (2005): An amine oxidase in seedlings of *Papaver somniferum* L. *Biologia Plantarum* 49, 389-394.

- Blackwell B. a Mabbitt L. A. (1965): Tyramine in cheese related to hypertensive crises after monoamine-oxidase inhibition. *The Lancet* **1**:1(7392), 938-940. [https://doi.org/10.1016/10.1016/s0140-6736\(65\)91257-2](https://doi.org/10.1016/10.1016/s0140-6736(65)91257-2)
- Blemur L., Le T. C., Marcocci L., Pietrangeli P., Mateescu M. A. (2016): Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. *Biotechnology Applied Biochemistry* **63**:3, 345-353. <https://doi.org/10.1002/bab.1369>
- Boffi A., Favero G., Federico R., Macone A., Antiochia R., Tortolini C., Sanz  G., Mazzei F. (2015): Amine oxidase-based biosensors for spermine and spermidine determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 1131–1137. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8324-4>
- Bour S., Daviaud D., Gres S., Lefort C., Prevot D., Zorzano A., Wabitsch M., Saulnier-Blache J. S., Valet P., Carpenne C. (2007): Adipogenesis-related increase of semicarbazide-sensitive amine oxidase and monoamine oxidase in human adipocytes. *Biochimie* **89**:8, 916-925. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.02.013>
- Bradford M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brunelle J. L. a Green R. (2014): Chapter Twelve - One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology* **541**, 151-159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>.
- Calinesci C., Mondoci B., Federico R., Ispas-Szabo P., Mateescu M. A. (2012): Carboxymethyl starch: Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **428**, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.02.032>
- Cervelli M., Bellavia G., Fratini E., Amendola R., Polticelli F., Barba M., Federico R., Signore F., Gucciardo G., Grillo R., Woster P. M., Casero R. A., Mariottini P. (2010): Spermine oxidase (SMO) activity in breast tumor tissues and biochemical analysis of the anticancer spermine analogues BENSpm and CPENSpm. *BMC Cancer* **10**:555. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-555>
- Cohen L. F., Lundgren D. W., Farrell P. M. (1976): Distribution of spermidine and spermine in blood from cystic fibrosis patients and control subjects. *Blood* **48**, 469–475.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006): Functions of amine oxidases in plant development and defence. *TRENDS in Plant Science* **11**:2, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.009>
- Coni S., Di Magno L., Serrao S. M., Kanamori Y., Agostinelli E., Canettieri G. (2019): Polyamine Metabolism as a Therapeutic Target in Hedgehog-Driven Basal Cell Carcinoma and Medulloblastoma. *Cells* **8**:150. <https://doi.org/10.3390/cells8020150>
- Datta, S., Christena, L.R. & Rajaram, Y.R.S. (2013): Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **3**, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- Deveci N., Güvenilir Y. A. (1995): Purification and Properties of the diamine oxidase of pea seedlings. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **53**, 83-90. <https://doi.org/10.1007/BF02783484>
- Di Fusco M., Federico R., Boffi A., Macone A., Favero G., Mazzei F. (2011): Characterization and application of a diamine oxidase from *Lathyrus sativus* as component of an electrochemical biosensor for the determination of biogenic amines in wine and beer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401**:2, 707–716. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5131-z>
- Efremenko E. N., Lozinsky V. I., Sergeeva V. S., Plieva F. M., Makhlis T. A., Kazanov G. M., Gladilin A. K., Varfolomeyev S. D. (2002): Addition of Polybrene improves stability of organophosphate hydrolase immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel carrier. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **51**, 195-201.
- Emanuela B., Minarini A., Tumiatti V., Milelli A., Lunelli M., Pegoraro M., Rizzoli V., Di Paolo M. L. (2012): Synthetic polyamines as potential amine oxidase inhibitors: a preliminary study. *Amino Acids* **42**, 913-928. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1006-z>

- Finberg J. P. M. a Gillman K. (2011): Selective inhibitors of monoamine oxidase type B and the "cheese effect". *International Review of Neurobiology* **100**, 169-190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386467-3.00009-1>
- 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.
- Frébert I., Adachi O. (1995): Copper/Quinone-Containing Amine Oxidases, an Exciting Class of Ubiquitous Enzymes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 625-632.
- Fu J., Reinhold J., Woodbury N. W. (2011): Peptide-Modified Surfaces for Enzyme Immobilization. *PLoS One* **6**:4, e18692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018692>
- Fukuda W., Hidese R., Fujiwara S. (2015) Long-chain and branched polyamines in thermophilic microbes. *Polyamines: a universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism*, **1**, 15–26. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55212-3_2
- Gale E. F. (1941): The Oxidation of Amines by Bacteria. *Biochemical Journal* **36**, 64-75. <https://doi.org/10.1042/bj0360064>
- Goodwin A. C., Jadallah S., Toubaji A., Lecksell K., Hicks J. L., Kowalski J., Bova G. S., De Marzo A. M., Netto G. J., Casero R. A. (2008): Increased spermine oxidase expression in human prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia tissues. *Prostate* **68**, 766–772.
- Górecka, E. a Jastrzębska M. (2019): Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science* **75(1)**, 65-86. <https://doi.org/10.34658/bfs.2011.75.1.65-86>
- Grvrekil A. O. (2017): The roles of polyamines in microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **33**:204, <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2370-y>.
- Hamana K. a Matsuzaki S. (1992): Polyamines As A Chemotaxonomic Marker in Bacterial Systematics. *Critical Reviews in Microbiology* **18**:4, 261-283. <https://doi.org/10.3109/10408419209113518>
- Hasan F., McCrodden J. M., Kennedy N. P., Tipton K. F. (1988): The involvement of intestinal monoamine oxidase in the transport and metabolism of tyramine. *Journal of Neural Transmission. Supplementa* **26**, 1–9.
- Hauptman N., Grimsby J., Shih J. C., Cadenas E. (1995): The Metabolism of Tyramine by Monoamine Oxidase A/B Causes Oxidative Damage to Mitochondrial DNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **335**, 295-304. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0510>
- Heby O., Persson L. (1990): Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 153–158. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90216-x](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90216-x)
- Henao-Escobar W., Dominguez-Renedo O., Alonso-Lomillo M. A., Arcos-Martinez M. J. (2013): A screen-printed disposable biosensor for selective determination of putrescine. *Microchimica Acta* **180**, 687-693. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-0989-4>
- Heniquez A., Meissonnier G., Visentin V., Prevot D., Carpenne C. (2003): High expression of semicarbazide-sensitive amine oxidase genes AOC2 and AOC3, but not the diamine oxidase gene AOC1 in human adipocytes. *Inflammation Research* **52**, 74–75. <https://doi.org/10.1007/s000110300061>
- Höfle M. G. (1984): Degradation of Putrescine and Cadaverine in Seawater Cultures by Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **47**:4, 843-849.
- Homaei A. A., Sariri R., Vianello F. Stevanato R. (2013): Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology* **6**, 185-205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>
- Imamura Y., Kubota R., Wang Y., Asakawa S., Kudoh J., Mashima Y., Oguchi Y., Shimizu N. (1997): Human retina-specific amine oxidase (RAO): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* **40**:277–283. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.4570>
- Jumarie C., Seide M., Marcocci L., Pietrangeli P., Mateescu M. A. (2017): Diamine Oxidase from White Pea (*Lathyrus sativus*) Combined with Catalase Protects the Human Intestinal Caco-2 Cell Line from Histamine Damage. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **182**:3, 1171-1181. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2390-3>
- Kacik J., Wróblewska B., Lewicki S., Zdanowski R., Kalicki B. (2017): Serum Diamine Oxidase in Pseudoallergy in the Pediatric Population. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1039**. https://doi.org/10.1007/5584_2017_81

- Kaitaniemi S., Elovaara H., Gron K., Kidron H., Liukkonen J., Salminen T., Salmi M., Jalkanen S., Elima K. (2009): The unique substrate specificity of human AOC2, a semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 2743–2757. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0076-5>
- Kalač P., Křížek. M. (2003): A Review of biogenic amines and Polyamines in Beer. *The Institute & Guild of Brewing* **109**, 123-128.
- Karim A., Wahab A. W., Raya I., Natsir H., Arif A. R. (2018): Utilization of Diamine Oxidase Enzyme from Mung Bean Sprouts (*Vigna radiata L*) for Histamine biosensors. *Journal of Physics* **979**. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/979/1/012014>
- Kee K., Foster B. A., Merali S., Kramer D. L., Hensen M. L., Diegelman P., Kisiel N., Vujcic S., Mazurchuk R. V., Porter C. W. (2004): Activated polyamine catabolism depletes acetyl-CoA pools and suppresses prostate tumor growth in TRAMP mice. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 40076-40083. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406002200>
- Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C. (2002): Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:4, 345-351. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2)
- Kirton C. M., Laukkanen M. L., Nieminen A., Merinen M., Stolen C. M., Armour K., Smith D. J., Salmi M., Jalkanen S., Clark M. R. (2005): Function-blocking antibodies to human vascular adhesion protein-1: A potential anti-inflammatory therapy. *European Journal of Immunology* **35**, 3119-3130. <https://doi.org/10.1002/eji.200535300>
- Kivirand K. a Rinken T. (2007): Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry* **56**, 164-171.
- Kivirand K., Sõmerik H., Oldekop M. L., Rebane R., Rinken T. (2016): Effect of spermidine and its metabolites on the activity of pea seedlings diamine oxidase and the problems of biosensing of biogenic amines with this enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* **82**, 133-137. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.09.007>
- Klocker J., Mätzler S. A., Huetz G. N. Drasche A., Kolbitsch C., Schwelberger H. G. (2005): Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflammation Research* **54**, 54-57. <https://doi.org/10.1007/s00011-004-0425-7>
- Kluetz M. D., Adamsons K., Flynn J. E. (1980): Optimized Preparation and Determination of Pea Seedling Diamine Oxidase. *Preparative Biochemistry* **10**:5, 615-631. <https://doi.org/10.1080/00327488008061757>
- Kress J., Zanaletti R., Amour A., Ladlow M., Frey J. G., Bradley M. (2002): Enzyme accessibility and solid supports: which molecular weight enzymes can be used on solid supports? An investigation using confocal Raman microscopy. *Chemistry* **8**:16, 3769-3772. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20020816\)8:16<3769::AID-CHEM3769>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020816)8:16<3769::AID-CHEM3769>3.0.CO;2-V)
- Krishnamoorthi S., Banerjee A., Roychoudhury A. (2015): Immobilized Enzyme Technology: Potentiality and Prospects. *Journal of Enzymology and Metabolism* **1**(1):104.
- Laemmli U. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lan N. C., Heinzmann C., Gal A., Klisak I., Orth U., Lai E., Grimsby J., Sparkes R. S., Mohandas T., Shih J. C. (1989): Human monoamine oxidase A and B genes map to Xp 11.23 and are deleted in a patient with Norrie disease. *Genomics* **4**, 552-559. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(89\)90279-6](https://doi.org/10.1016/0888-7543(89)90279-6)
- Liang X. H., Zhao Z. A., Deng W. B., Tian Z., Lei W., Xu X., Zhang X. H., Su R. W., Yang Z. M. (2010): Estrogen regulates amiloride-binding protein 1 through CCAAT/enhancer-binding protein-beta in mouse uterus during embryo implantation and decidualization. *Endocrinology* **151**:10, 5007–5016. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0170>
- Lindsay G. S. a Wallace H. M. (1999): Changes in polyamine catabolism in HL-60 human promyelogenous leukaemic cells in response to etoposide-induced apoptosis. *Biochemical Journal* **337**:1, 83–87. <https://doi.org/10.1042/bj3370083>
- Luhová L., Lebeda A., Hedererová D., Peč P. (2003): Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum L.* under different light condition. *Plant soil environ* **49**, 151-157.
- Maintz L., Novak N. (2007): Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition* **85**:5, 1185-1196. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185>

- Maintz L., Schwarzer V., Bieber T., van der Ven K., Novak N. (2008): Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: a critical review. *Human Reproduction Update* **14**:5, 485-495. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn014>
- Manzotti G., Breda D., Di Gioacchino M., Burastero S. E. (2016): Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **29**:1, 105-111. <https://doi.org/10.1177/0394632015617170>
- Marina M., Maiale S. J., Rossi F. R., Romero M. F., Rivas E. I., Gárriz A., Ruiz O.A., Pieckenstein F. L. (2008): Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology* **147**, 2164-2178. <https://doi.org/10.1104/pp.108.122614>
- Martinek K., Klibanov A. M., Goldmacher V.S., Berezin I. V. (1977): The principles of enzyme stabilization I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology* **485**:1, 1-12. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(77\)90188-7](https://doi.org/10.1016/0005-2744(77)90188-7)
- Marttila-Ichihara F., Elimä K., Auvinen K., Veres T. Z., Rantakari P., Weston C., Miyasaka M., Adams D., Jalkanen S., Salmi M. (2017): Amine oxidase activity regulates the development of pulmonary fibrosis. *The FASEB Journal* **31**:6, 2477-2491. <https://doi.org/10.1096/fj.201600935R>
- Masini E., Bani D., Marzocca C., Mateescu M. A., Mannaioni P. F., Federico R., Mondovi B. (2007): Pea Seedling Histaminase as a Novel Therapeutic Approach to Anaphylactic and Inflammatory Disorders A Plant Histaminase in Allergic Asthma and Ischemic Shock. *The Scientific World Journal* **7**, 888-902. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.139>
- Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisán J. M., Fernandez-Lafuente R. (2007): Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* **40**:6, 1451-1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Medda R., Padiglia A., Floris G. (1995): Plant Copper-Amine Oxidases. *Phytochemistry* **39**, 1-9. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00756-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00756-J)
- Medda R., Padiglia A., Floris G. (1995): Plant Copper-Amine Oxidases. *Phytochemistry* **39**, 1-9.
- Morand P. a Biellmann J. F. (1991): Modification of α -amylase from *Bucillus licheniformis* by the polyaldehyde derived from γ -cyclodextrine and α -amylase thermostability. *Federation of European Biochemical Societies* **289**, 148-150.
- Murooka Y., Doi N., Harada T. (1979): Distribution of Membrane-Bound Monoamine Oxidase in Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **38**:4, 565-569.
- Naoi M. a Maruyama W. (2010): Monoamine Oxidase Inhibitors as Neuroprotective Agents in Age-Dependent Neurodegenerative Disorders. *Current Pharmaceutical Design* **16**, 2799-2817. <https://doi.org/10.2174/138161210793176527>
- Nowotarski S. L., Woster P. M., Casero R. A. (2013): Polyamines and cancer: Implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **15**:e3, 1-21. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.3>
- O'Sullivan J., Unzeta M., Healy J., O'Sullivan M., Davey G., Tipton K. F. (2004): Semicarbazide-sensitive amine oxidases: enzymes with quite a lot to do. *NeuroToxicology* **25**, 303-315. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00117-7](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00117-7)
- Padiglia A., Cogoni A., Floris G. (1991): Characterization of amine oxidases from *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus* and *Cicer*. *Phytochemistry* **30**, 3895-3897.
- Palenik B. a Morel F. M. M. (1991): Amine Oxidases of Marine Phytoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:8, 2440-2443.
- Pietrangeli P., Federico R., Mondovi B., Morpurgo L. (2007): Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry* **107**:7, 997-1004. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.03.014>
- Powell L.W. (1984): Developments in Immobilized-Enzyme Technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **2**:1, 409-438. <https://doi.org/10.1080/02648725.1984.10647807>

- Ramos-Ruiz R., Martinez F., Knauf-Beiter G. (2019): The effects of GABA in plants. *Cogent Food & Agriculture* **5**:1. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1670553>
- Rea G., Metoui O., Infantino A., Federico R., Angelini R. (2002): Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiology* **128**, 865-875. <https://doi.org/10.1104/pp.010646>
- Rodrigues R. C., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Fernández-Lafuente R. (2013): Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews* **15**. <https://doi.org/10.1039/c2cs35231a>
- Russell D. H., (1977): Clinical relevance of polyamines as biochemical markers of tumor kinetics. *Clinical Chemistry* **23**:1, 22–27. <https://doi.org/10.1093/clinchem/23.1.22>
- Salmi M., Jalkanen S. (2001): VAP-1: an adhesin and an enzyme. *Trends in Immunology* **22**:4, 211–216. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01870-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01870-1)
- Seiler N. (2000): Oxidation of polyamines and brain injury. *Neurochemical Research* **25**:4, 471-490. <https://doi.org/10.1023/a:1007508008731>
- Shalaby A. R. (1997): Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* **29**, 675-690.
- Shen S. H., Wertz D. L., Klinman J. P. (2012): Implication for Functions of the Ectopic Adipocyte Copper Amine Oxidase (AOC3) from Purified Enzyme and Cell-Based Kinetic Studies. *PLOS One* **7**: e29270, 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029270>
- Shipovskov S. a Levashov A. (2003): Tyrosinase: Polybrene Noncovalent Complexes in Water-Ethanol Mixtures. *Biotechnology and Bioengineering* **84**:2, 258-63. <https://doi.org/10.1002/bit.10762>
- Schnedl W. J., Schenk M., Lackner S., Enko D., Mangge H., Forster F. (2019): Diamine oxidase supplementation improves symptoms in patients with histamine intolerance. *Food Science and Biotechnology* **28**:6, 1779-1784. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00627-3>
- Schwelberger H. G. (2006): Origins of plasma amine oxidases in different mammalian species. *Inflammation Research* **55**:1, 57–58. <https://doi.org/10.1007/s00011-005-0041-1>
- Schwelberger H. G. (2010): Structural organization of mammalian copper-containing amine oxidase genes. *Inflammation Research* **59**:2, 223-225. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0135-2>
- Singh A., Negi M.S., Dubey A., Kumar V., Verma A.K. (2018): Methods of Enzyme Immobilization and Its Applications in Food Industry. *Enzymes in Food Technology* 103-124. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4_6
- Smolinska S., Jutel M., Cramer R., O'Mahony L. (2014): Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy* **69**:3, 273-281. <https://doi.org/10.1111/all.12330>
- Smolková T. (2018): *Hrachová aminoxidasa a aminy v pivu*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Spahn C. a Minter S. D. (2008): Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering* **2**:3,195-200. <https://doi.org/10.2174/187221208786306333>
- Šebela M., Kopečný D., Lamplot Z., Havliš J., Thomas H., Shevchenko A. (2004): Thermostable β -cyclodextrin conjugates of two similar plant amine oxidases and their properties. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **40**, 1-8.
- 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.
- Šebela M., Radová A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001): FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**:2, 197-207. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00380-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00380-0)
- Tavladoraki P., Rossi M. N., Saccuti G. Perez-Amador M. A., Poticelli F., Angelini R., Federico R. (2006): Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiology* **141**,1519-1532. <https://doi.org/10.1016/10.1104/pp.106.080911>
- Verma N., Hooda V., Gahlaut A., Gothwal A., Hooda V. (2020): Enzymatic biosensors for the quantification of biogenic amines: a literature update. *Biotechnology* **40**:1, 1-14. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1680600>

- 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.
- Vihinen M. (1987): Relationship of protein flexibility to thermostability. *Protein Engineering, Design and Selection* **1**:6,477-480. <https://doi.org/10.1093/protein/1.6.477>
- Wallace H. M. a Fraser A. V. (2003): Polyamine analogues as anticancer drugs. *Biochemical Society Transactions* **31**, 393–396. <https://doi.org/10.1042/bst0310393>
- Wallace H. M., Duthie J., Evans D. M., Lamond S., Nicoll K. M., Heys S. D. (2000): Alterations in polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue. *Clinical Cancer Research* **6**, 3657–3661.
- Wang C. C., Borchert A., Ugam-Klusek A., Tang L. Y., Lui W. T., Chu C. Y. Billett E., Kuhn H., Ufer C. (2011): Monoamine Oxidase A Expression is Vital for Embryonic Brain Development by Modulating Developmental Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 28322-28330. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241422>
- Weeks R. S., Vanderwerf S. M., Carlson C. L., Burns M. R., O'Day C. L., Cai F., Devens B. H., Webb H. K. (2000): Novel lysine-spermine conjugate inhibits polyamine transport and inhibits cell growth when given with DFMO. *Experimental Cell Research* **261**, 293–302. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5033>
- Xia H., Kitazumi Y., Shirai O., Ohta H., Kurihara S., Kano K. (2017): Putrescine oxidase/peroxidase-co-immobilized and mediator-less mesoporous microelectrode for diffusion-controlled steady-state amperometric detection of putrescine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **804**, 128-132. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.09.056>
- Xing S. G., Jun B. Y., Hau Z. W., Liang L. Y. (2007): Higher accumulation of g-aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 560-566. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.05.007>
- Yang, R., Yin, Y., Gu, Z. (2015): Polyamine degradation pathway regulating growth and GABA accumulation in germinating Fava bean under hypoxia-NaCl stress. *Journal of Agricultural Science and Technology* **17**, 311-320.
- Yraola F., Albericio F., Royo M. (2007): Inhibition of VAP1: Quickly Gaining Ground as an Anti-Inflammatory Therapy, *ChemMedChem* **2**, 173–174. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600245>
- Zarei A., Trobacher C. P., Cooke A. R., Meyers A. J., Hall J. C., and Shelp B. J. (2015): Apple fruit copper amine oxidase isoforms: peroxisomal MdAO1 prefers diamines as substrates, whereas extracellular MdAO2 exclusively utilizes monoamines. *Plant and Cell Physiology* **56**:1, 137-147. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu155>
- Zhou Z., Hartman M. (2013): Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. *Chemical Society Reviews* **42**, 3894-3912. <https://doi.org/10.1039/C3CS60059A>

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAP	4-aminoantipyrin
AGM	agmatin
APAO	N ¹ -acetylpolyaminoxidasa
CAD	kadaverin
CDA	α -cyklodextrin
CDB	β -cyklodextrin
CDG	γ -cyklodextrin
DAO	diaminoxidasa
DCHBS	3,5-dichlor-2-hydroxibenzofulfonát sodný
HIS	histamin
HNMT	histamin-N-methyltransferasa
LJP 1586	Z-3-Fluoro-2-(4-methoxybenzyl)allylaminhydrochlorid
M35	maltodextrin 17-35 j (ekvivalent 4.0-7.0 dextrosových jednotek)
M6	maltodextrin 6-7j (ekvivalent 16.5-19.5 dextrosových jednotek)
M9	maltodextrin 7-9j (ekvivalent 13.0-17.0 dextrosových jednotek)
MOA	monoaminoxidasa
ODC	ornithindekarboxylasy
P100	polybren ve stonásobném hmotnostním nadbytku vůči enzymu
P20	polybren ve dvacetinásobném hmotnostním nadbytku vůči enzymu
PAO	polyaminoxidasa
PHEA	fenylethylamin
PsAO	hrachová aminoxidasa
PUT	putrescin
SAMDC	S-adenosylmethioninkarboxylasa
SMO	sperminoxidasy
SPD	spermidin
SPM	spermin
SSAT	spermidin/spermin-N ¹ -acetyltransferasa
TRYPT	tryptamin
TYR	tyramin