

HUGO TREFFNERI GÜMNAASIUM

ELIIS GRIGOR

12.C KLASS

# **EBATRADITSIOONILISE PÄRMI *BLASTOBOTRYS* ADENINIVORANS MALTAASI AG2 AKTIIVSUSE MÄÄRAMINE JA BIOKEEMILISTE OMADUSTE ISELOOMUSTAMINE**

JUHENDAJA TRIINU VISNAPUU, *PhD*, TARTU ÜLIKOO; SAIMA KAARNA, HUGO TREFFNERI GÜMNAASIUM

## **SISSEJUHATUS**

Seeneriiki kuuluvad pärmid on looduses olulised suhkrute lagundajad ja metaboliseerijad. Pärmid ja nende saadusi kasutatakse laialdaselt toiduainetööstuses ja biotehnoloogias. Evolutsiooni käigus suhteliselt vara lahknunud ja niinimetatud ebatraditsiooniliste ehk pagaripärmist (*Saccharomyces cerevisiae*'st) evolutsiooniliselt kaugemate pärmide ensüüme ei ole palju uuritud, mistõttu on nende valkude omaduste kohta vähe teada. Ebatraditsiooniliste pärmide ensüümidel võib olla biokeemilisi omadusi, mis pagaripärmi vastavatel ensüümidel puuduvad, ning nende uurimine võib anda teadmisi potentsiaalsete eellasensüümide tunnuste kohta ning kuidas on toimunud ensüümide evolutsioon. Eellasensüümid on tänapäevaste ensüümide tekkel esinenud vahevormid, millel võisid olla praegu olemasolevatest ensüümidest mõnevõrra teistsugused substaadieelistused ja töömehhanismid. Erinevate pärmiliikide ensüümide biokeemiliste omaduste kindlakstegemine võib välja tuua nende valkude olulisi eeliseid nende kasutamises biotehnoloogilistes protsessides.

$\alpha$ -Glükosidaasid on ensüümid, mis hüdrolüüsivad  $\alpha$ -glükosiidsidet di- ja oligosahhariidides, näiteks sahharoosis ja tärklise erinevates laguproduktides.  $\alpha$ -Glükosidaasid jagunevad maltaasideks, mis hüdrolüüsivad peamiselt  $\alpha$ -1,4-glükosiidsidet, isomaltaasideks, mis hüdrolüüsivad  $\alpha$ -1,6 sidet, ning maltaas-isomaltaasideks, mille substraadivalik on lai. (Lombard jt, 2014, lk 490–495) Ühes organismis võib olla mitu erineva  $\alpha$ -glükosidaasse aktiivsusega ensüümi. Näiteks *S. cerevisiae* genoomis kodeeritakse 10 erinevat  $\alpha$ -glükosidaasi: 5 maltaasi ja 5

isomaltaasi (Alamäe jt, 2019, lk 3; Teste jt, 2010, lk 26822). Lisaks päritolule mõjutavad  $\alpha$ -glükosidaaside aktiivsust ja omadusi füüsikalised ja keemilised parameetrid, näiteks pH ja temperatuur, aga ka metalliioonide ja orgaaniliste ainete sisaldus keskkonnas.

Uurimistöö eesmärk oli uurida pärmi *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*  $\alpha$ -glükosidaasi AG2 (*BaAG2*) biokeemilisi omadusi, mis on olulised ensüümi biotehnoloogiliste kasutusvõimaluste hindamisel, näiteks metalliioonide ja puhvrikomponentide mõju kindlakstegemine. Kuna kirjanduse andmetel on mitmed  $\alpha$ -glükosidaasid võimelised substraadilt glükoosijääke vastuvõtvale molekulile üle kandma ehk transglükosüülida, siis on vajalik testida *BaAG2* transglükosüülimisvõimet ja seda, milliseid uusi sidemeid sünteesiti. Eesmärkidest lähtuvalt sõnastasin uurimusküsimused.

1. Millised bioloogilistes andmebaasides (NCBI andmebaasid) esinevad valgud on *BaAG2* valgujärjestusele kõige sarnasemad?
2. Kui suur on *BaAG2* ensümaatiline aktiivsus maltoosil ja sahharoosil (disahhariidid, 100 mM) ning sünteetilisel maltaaside substraadil *pNPG* (1 mM)?
3. Kas *BaAG2* suudab substraadilt glükoosijääke teisele suhkrule üle kanda (transglükosüülida) ja milliseid uusi keemilisi sidemeid suudab ensüüm sünteesida, kui substraadina lisatakse reaktsioonisegusse sahharoosi isomeere maltuloosi või turanoosi?
4. Kas ja kui suurel määral mõjutavad kahevalentsed metalliioonid ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) *BaAG2* aktiivsust?
5. Kas ja kuidas mõjutab reaktsioonisegusse levinud puhvrikomponendi (Tris) lisamine *BaAG2* aktiivsust?

*Blastobotrys adenivorans* on evolutsioonis vara lahknunud ebatraditsiooniline pärm (Malak jt, 2016, lk 535), millel on mitmeid biotehnoloogilisi eeliseid, võrreldes näiteks toiduainetööstuses ja biotehnoloogias laialt kasutatava *Saccharomyces cerevisiae*'ga. *B. adenivorans*'il on täheldatud osmo- (Yang jt, 2000, lk 309) ja halotolerantsust ehk soolataluvust (Wartmann jt, 1995, lk 217), mis on hinnatud omadused biotehnoloogilistes protsessides kasutatavatel organismidel. Siiski ei ole *B. adenivorans* veel tööstuses laialdast kasutust leidnud ning paljud organismi omadused on praegu teadmata.

Toetudes hiljuti avaldatud uurimistööde andmetele, eelistab *B. adenivorans*'i ensüüm AG2 substraatidena  $\alpha$ -glükosiidseid disahhariide, nagu maltoos ja sahharoos ning *pNPG*-d (Meldre, 2019, lk 32; Visnapuu jt, 2020, lk 6), mistõttu valisin need substraadid valgupreparaadi ensümaatilise aktiivsuse kindlakstegemiseks. *BaAG2* aktiivsuse kindlakstegemine sünteetilisel (*pNPG*) substraadil toimus *p*-nitrofenooli vabanemise kaudu ajaühikus ja seda määrasin

spektrofotomeetriliselt. Looduslike substraatide (sahharoos, maltoos) korral kasutasin ensümaatilist meetodit, mis põhines aktiivsuse kindlakstegemisel reaktsioonisegus glükoosi koguse tekke algkiiruse määramisega.

Kahevalentsete metalliioonide ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ja  $\text{Mn}^{2+}$ ) ja puhvrikomponendi Tris mõju *BaAG2* aktiivsusele uurisin *pNPG* lagunemise käigus vabaneva *p*-nitrofenooli vabanemise kaudu ajaühikus ja määrasin seda spektrofotomeetriliselt. Saadud andmeid võrdlesin väärtustega, mis määrati reaktsioonisegudega, mis ei sisaldanud uuritavat anorgaanilist või orgaanilist ühendit.

Uute oligosahhariidide tekke testimisel kasutasin substraadina disahhariide (turanoos, maltuloos). Kindlatel ajapunktidel võtsin proovid, mida kandsin õhukese kihi kromatograafiaplaadile koos vastavate suhkrumarkeritega. Proovid lahutasin, värvisin ning analüüsisin – võrdlesin visuaalselt proovides leiduvaid suhkruid markeritega.

Uurimistöö koostamisel kasutasin rahvusvahelisi bioloogiaalaseid andmebaase, teaduslikke artikleid ning Tartu Üikooli bakalaureuse- ja magistriastme lõputöid, mis keskendusid ebatraditsioonilistele pärmidele ja nende ensüümide omadustele. Üks peamisi allikaid, millele toetusin, oli 2019. aasta Aivar Meldre magistritöö, kus *BaAG2* kloneeriti, puhastati ja tehti kindaks ensüümi mitmeid biokeemilisi omadusi. Näiteks tõestati ensüümi transglükosüülimisvõime maltoosil ja sahharoosil (lk 36–40). Teine peamine allikas oli 2020. aastal ajakirjas *International Journal of Molecular Sciences* avaldatud Triinu Visnapuu jt artikkel, mis käsitles *BaAG2* omadusi ning kus tehti kindlaks ensüümi pH- ja temperatuurioptimum (lk 6) ning sobiv substraadivalik (lk 5–6). Lisaks kasutati töö koostamisel asjakohaseid kõrgkooli õpikuid, käsiraamatuid ja andmebaase. Töö eksperimentaalosa valmis Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis juunis ja septembris 2019. aastal Eesti Teadusagentuuri rahastatud projekti PUT1050 (Uudsete prebiootikumide ensümaatiline süntees: ensüümide iseloomustamine ja produktide prebiootilise efektiivsuse hindamine) raames.

# Sisukord

SISSEJUHATUS.....	1
TERMINITE JA KASUTATUD LÜHENDITE LOETELU.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1. <i>Blastobotrys adeninivorans</i> .....	7
1.2. Sahhariidid .....	9
1.3. $\alpha$ -Glükosidaasid .....	12
2. METOODIKA JA TÖÖ KÄIK .....	16
2.1. <i>BaAG2</i> valgujärjestusele sarnaste valkude kindlakstegemine andmebaaside kasutamisega 16	
2.2. <i>BaAG2</i> preparaadi valmistamine .....	16
2.3. <i>BaAG2</i> preparaadis valgusisalduse määramine .....	16
2.4. <i>BaAG2</i> aktiivsuse määramine sünteetilise substraadi ja looduslike sahhariididega .....	17
2.4.1. <i>pNPG</i> substraadina.....	17
2.4.2. Maltoos ja sahharoos substraatidena.....	18
2.5. Kahevalentsete Mn, Ca ja Mg metalliioonide mõju <i>BaAG2</i> aktiivsusele.....	19
2.6. Tris puhvri mõju <i>BaAG2</i> aktiivsusele .....	20
2.7. Oligosahhariidide tekke testimine turanoosist ja maltuloosist.....	20
2.8. Andmete töötlus .....	22
3. TULEMUSED JA ANALÜÜS.....	24
3.1. <i>BaAG2</i> valgujärjestusele sarnaste valkude kindlakstegemine .....	24
3.2. Valgusisaldus <i>BaAG2</i> puhastatud preparaadis.....	25
3.3. <i>BaAG2</i> aktiivsus, kasutades substraadiks <i>pNPG</i> -d, maltoosi ja sahharoosi .....	26
3.4. Kahevalentsete metalliioonide mõju <i>BaAG2</i> aktiivsusele.....	26
3.5. Tris puhvri mõju <i>BaAG2</i> aktiivsusele .....	27
3.6. Oligosahhariidide tekke testimine turanoosist ja maltuloosist.....	29
KOKKUVÕTE .....	32
SUMMARY .....	35
KASUTATUD ALLIKAD .....	37
Lisa 1. Sahhariidide molekulide valemid (Nelson ja Cox, 2013, lk 248; 4-Nitrophenyl $\beta$ -D-glucuronide, 2020).....	41
Lisa 2. <i>BaAG2</i> aminohappeline järjestus (Triinu Visnapuu).....	41
Lisa 3. Optiliste tiheduste väärtused <i>BaAG2</i> ensüümiaktiivsuse määramisel, kus substraatideks kasutati <i>pNPG</i> -d, maltoosi või sahharoosi, hinnati metalliioonide ja Tris puhvri mõju ensüümi aktiivsusele ning määrati vabanenud glükoosi hulka turanoosi või maltuloosiga segudes.....	42
Lisa 4. Trisi graafiline struktuurivalem (Tris base, 2020) .....	47

## TERMINITE JA KASUTATUD LÜHENDITE LOETELU

Anomeer – kindla süsinikuaatomi geomeetiline variatsioon sahhariidi molekulis (Zilmer jt, 2018, lk 65).

Ba – pärm *Blastobotrys adenivorans*.

BaAG2 – *Blastobotrys adenivorans*  $\alpha$ -glükosidaas 2.

Basaalne rühm – alusrühm, evolutsiooniliselt varem lahknenud liike sisaldav rühm (*basal clade*).

Biotervendus – bioremeditatsioon, bioloogiliste organismide abil keskkonna puhastamine teatud saasteainetest (Csutak jt, 2010, lk 5066).

BSA – albumiin veise seerumist (*bovine serum albumin*).

Dimorfism – seente esinemine nii hüüfidest koosneva mütseelina ehk seeneniidistikuna kui ka üherakulisena ehk pärmseenena (Wolf, 1996, lk 13).

Disahhariid – suhkur, mis koosneb kahest monoosijäägist ehk suhkrujäägist (Zilmer jt, 2018, lk 68).

Eellasensensüüm – evolutsioonis ensüümi vahevorm.

Ekspressioonivektor – plasmiid (bakteriaalne rõngas-DNA), millelt toimub vastava valgus tootmine (Heinaru, 2012, lk 820).

Ensüüm – valk, mis viib elusorganismis läbi teatud biokeemilist reaktsiooni, bioloogiline katalüsaator (Zilmer jt, 2018, lk 104).

Ensüümi reaktsioonitsenter – ensüümi keskne osa, aktiivtsenter, kus toimub vastav reaktsioon substraadi ja ensüümi aminohapete vahel (Zilmer jt, 2018, lk 113).

Fülogeneesipuu – puukujuline diagramm, mis näitab suhtelisi evolutsioonilisi kaugusi erinevate liikide vahel ning baseerub bioloogiliste molekulide sarnasuse analüüsil (Heinaru, 2012, lk 942–943).

GH – glükosiidi hüdrolaas.

Halotolerantsus – soolataluvus.

Homöostaas – organismi normaalne tasakaal.

Hüdrolüüs, hüdrolüüsreaktsioon – lagundamine, lõhustamine ensüümi toimel (Zilmer jt, 2018, lk 106).

Hüüf – seeneniit.

Klaad – organismide grupp, kellel on evolutsiooniliselt kõigil üks ühine eelane.

Kofaktor – keemiline ühend või metalliioon, mis on vajalik ensüümi aktiivsuse ja/või stabiilsuse tagamiseks (Zilmer jt, 2018, lk 105).

Migratsioonidistants – vahemaa stardijoone ning pipeteeritud proovi laigu vahel kromatogrammil.

Metülotroofne – organism, kes tarvitab süsinikuallikana metanooli (Viigand, 2018, lk 9).

Monoosijäägi anomeerne süsinik – monosahhariidi ahela süsinikuaatom, mis osaleb karboksüülrühma moodustamises.

OD – optiline tihedus (*optical density*).

Osmotolerantsus – kõrge osmootse rõhu ja lahustunud ainete kõrge kontsentratsiooni talumine.

PA – polümerisatsiooniaste.

pNPG – p-nitrofenüül-glükopüranosiid.

Puhver – lahus, mille pH ei muutu, kui sinna lisada väikeses koguses hapet või alust (Nelson ja Cox, 2013, lk 63-64).

Sahhariid – suhkur (Zilmer jt, 2018, lk 64, 2018).

Transglükosüülimine, transglükosüülimisvõime – glükoosijäägi ülekanne doonormolekulilt või substraadilt vastuvõtja- või aktseptormolekulile, mis ei ole vee molekul, protsessi käigus tekivad oligosahhariidid (Sinnott, 1990, lk 1171).

TLC – õhukese kihi kromatograafia, planaarkromatograafia (*thin layer chromatography*).

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. *Blastobotrys adeninivorans*

*Blastobotrys adeninivorans* on seeneriiki kuuluv pärm (tabel 1), mida nimetatakse ka „ebatraditsiooniliseks“ (*non-conventional*), sest seda on tunduvalt vähem uuritud võrreldes näiteks pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae*'ga, mida kasutatakse laialdaselt toiduainetööstuses (Malak jt, 2016, lk 535). Ebatraditsiooniliste pärmide hulka kuuluvad veel näiteks pärmiliigid *Ogataea polymorpha*, *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora vineae*, *Schizosaccharomyces japonicus* ja *Wickerhamomyces anomalus*. Nende pärmide uurimine on praegusel ajal biotehnoloogias oluline, sest neil võib esineda vajalikke omadusi, mis puuduvad hetkel alkoholitööstuses, toidutehnoloogias ning biobensiini tootmisel kasutusel olevatel pärmidel. (Canonico jt, 2019, lk 1; Alamäe, 2019, lk 1–2)

Tabel 1. Pärm *Blastobotrys adeninivorans*'i taksonoomiline klassifikatsioon (Robnett ja Kurtzmann, 2007, lk 141–151)

Taksonoomiline üksus	Takson
Riik	<i>Fungi</i> (Seened)
Hõimkond	<i>Ascomycota</i> (Kottseened)
Klass	<i>Saccharomycetes</i> (Pärmkottseened)
Selts	<i>Saccharomycetales</i>
Sugukond	<i>Trichomonascaceae</i>
Perekond	<i>Blastobotrys</i>
Liik	<i>Blastobotrys (Arxula)</i> <i>adeninivorans</i>

*B. adeninivorans*'il on biotehnoloogilist potentsiaali, sest pärmil esineb temperatuurist sõltuv dimorfism kasvutemperatuuridel üle 42 °C ning kõrgel temperatuuril kasvades suureneb märkimisväärselt valkude eritamine hüüfidest võrreldes selliste pärmirakkudega, mis kasvavad madalamatel temperatuuridel (Kunze ja Wartmann, 2000, lk 619). Dimorfism on vastavalt valitsevatele tingimustele seente esinemine nii hüüfidest koosneva mütseelina ehk seeneniidistikuna kui ka üherakulisena ehk pärmseenena (Wolf, 1996, lk 13). *B. adeninivorans* on

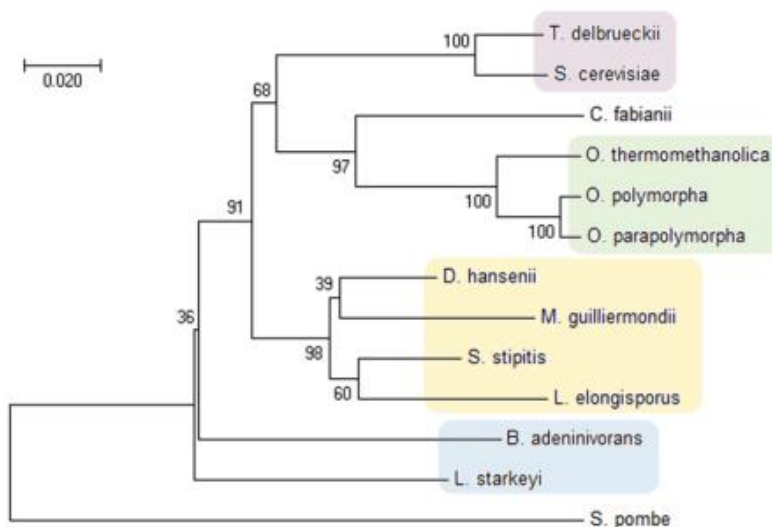
madalamatel temperatuuridel üherakuline, kui aga kasvutemperatuur tõuseb kõrgemale kui 42 °C, moodustab organism hüüfe. Kõrgeim temperatuur, kus *B. adenivorans* veel kasvada suudab, on 48 °C. (Wartmann jt, 1995, lk 217) Kui võrrelda *B. adenivorans*'i kasvutemperatuuride vahemikku *S. cerevisiae* vastavate näitajatega, on see kõrgem, ja *B. adenivorans*'i peetakse seetõttu termotolerantseks pärmiks. *S. cerevisiae* tüvede kõige kiirem kasv toimub temperatuurivahemikus 30-35 °C ning kõrgemal kui 39,8 °C pagaripärmi tüved enam paljuneda ei suuda (Martin ja Walsh, 1997, lk 170). Ka pagaripärm on dimorfne organism, mille puhul moodustuvad hüüfid lämmastikuvaeguse korral (Blacketer jt, 1993, lk 5567).

*B. adenivorans*'it võib nimetada halotolerantseks, kuna pärmil on täheldatud kõrget soolataluvust (kuni 20% NaCl), kusjuures 10% keedusoola kontsentratsioon on pärmi elutegevusele ainult minimaalselt pärssiva toimega (Yang jt, 2000, lk 309). Osmotolerantsus ehk vastupidavus kõrgetele lahustunud ainete kontsentratsioonidele on tehnoloogiliste pärmide puhul soovitud omadus ning seda saab ära kasutada nii käärimises ja biotervenduses protsessi efektiivsemaks muutmisel kui ka biosensorite väljatöötamisel (Malak jt, 2016, lk 538). Soolataluvus võib viidata sellele, et organismi ensüümid on kohastunud ionide kõrge kontsentratsiooniga ning võivad vajada näiteks metalliioone kofaktoritena, mis neid valke stabiliseeriksid.

Teise generatsiooni bioetanooli tootmisprotsess on üks näide, kus mikroorganism peab hakkama saama äärmuslike tingimustega. Bioetanooli toodetakse lignotselluloosirikast biomassist ning selle eelpuhastamise käigus tekib kõrge osmolaarsuse ja kõrge inhibiitorite kontsentratsiooniga segu, mis takistab käärimisprotsessi. (Radecka jt, 2015, lk 1) *B. adenivorans* ja ka teised evolutsioonis varem lahknunud pärmid on võimelised taluma ebasoodsaid tingimusi ja neid saab kasutada taoliste protsesside saagise suurendamiseks. Edukalt on *B. adenivorans*'it kasutatud näiteks butanooli tootmiseks (Malak jt, 2016, lk 538).

Viigandi jt (2018, lk 9) koostatud fülogeneesipuult (vt joonis 1) on näha, et *B. adenivorans* on evolutsioonis varakult pärmide põhiharust lahknunud pärm ning see paikneb koos *L. starkey*'ga *Saccharomycotina* basaalses rühmas. Hiljuti avaldatud analüüsi põhjal lahknus põhirühm teistest alamhõimkonna esindajatest 200–400 miljoni aasta eest (Correia jt, 2019, lk 11). Seetõttu on oluline uurida vara lahknunud pärmide ensüüme ja nende omadusi, et oleks võimalik teha üldistusi, millistel tingimustel ürgsed pärmitüved võisid elada, milline võis olla nende substraadieelistus ja metabolism ning millises suunas on toimunud erinevate pärmide evolutsioon.





Joonis 1. *Saccharomycotina* alamhõimkonda kuuluvate pärmiliikide fülogeneesipuu, mis on koostatud ribosoomi suure subühiku RNA geenijärjestuse D1/D2 piirkondade alusel (Viigand jt, 2018, lk 9)

Välisrühmana on kasutatud punguva pärm *Schizosaccharomyces pombe* vastavat järjestust. Erinevate värvidega on tähistatud alamhõimkonda *Saccharomycotina* 4 klaadi: lilla – *Saccharomycetaceae* sugukond (*Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*), roheline – metülotroofsete pärmide sugukond (*Ogataea thermomethanolica*, *Ogataea polymorpha*, *Ogataea parapolyomorpha*), kollane – alternatiivset geneetilist koodi kasutavad pärmid (CTG-klaad) [*Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Lodderomyces elongisporus*], sinine – basaalne rühm, kuhu kuuluvad varalahknendud pärmid [*Blastobotrys (Arxula) adeninivorans*, *Lipomyces starkeyi*] (Viigand jt, 2018, lk 9).

## 1.2. Sahhariidid

Keemiliselt on sahhariidid ehk süsivesikud polühüdoksü-aldehüüdid või -ketooneid (Nelson ja Cox, 2013, lk 243), mis on looduses väga laialt levinud. Sahhariidid on väga mitmekesised – need koosnevad erinevatest suhkrujääkidest, sisaldavad erinevaid sidemetüüpe ning varieeruvad suurel määral ahelapikkuste ja molekulmasside poolest. Sahhariidid jagunevad kolme suurde klassi: mono-, oligo- ja polüsahhariidid. Levinud monosahhariidid on näiteks glükoos ja fruktoos; disahhariidid, mis koosnevad glükosiidsidemega seotud kahest suhkrujäägist, on näiteks maltoos ja sahharoos ning nende suhkrute isomeerid, ja polüsahhariidid on näiteks tselluloos ja tärklis. Oligosahhariidideks nimetatakse lühemaid polüsahhariide, mille polümeerisatsiooniaste (PA) jääb vahemikku 2 kuni 10. Polüsahhariidide polümeerisatsiooniaste kirjeldab monosahhariidide arvu

süsivesikuahelas. (Zilmer jt, 2015, lk 64–67). Tänu suurele varieeruvusele ja laiale levikule on sahhariidid elusorganismide peamised energiaallikad, aga ka olulised ehituslikud komponendid (Zilmer jt, 2015, lk 70). Mikroorganismidel, nagu seened ja bakterid, on olemas vajalikud ensüümid erinevat tüüpi sahhariidide lagundamiseks ja metaboliseerimiseks (Nelson ja Cox, 2013, lk 257), kuid inimene suudab oma keharakkude toodetud ensüümide abil kasutada vaid üksikuid suhkruid: disahhariididest sahharoosi ja maltoosi ning polüsahhariididest lahustuvat tärklis ja glükogeeni (Zilmer jt, 2015, lk 69).

Kõige lihtsama ehitusega on monosahhariidid, mis koosnevad kas aldehyüdi või ketooni funktsionaalrühmast ning hüdroksüülrühmadest. Monosahhariidid võib omakorda jagada süsiniku aatomite järgi alarühmadeks, mis on toodud tabelis 2.

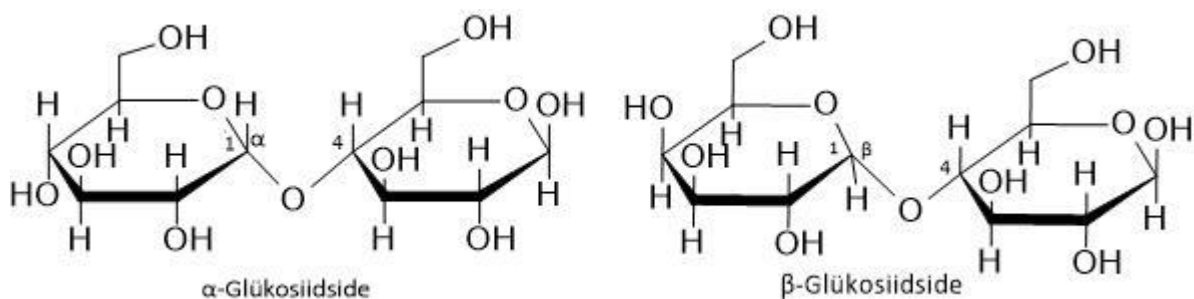
Tabel 2. Monosahhariidide jagunemine süsiniku arvu järgi peaahtelas (Zilmer jt, 2015, lk 64)

Üldnimetus	Süsinike arv	Aldoosid	Ketoosid
Tetroos	4	Erütroos	Erütroloos
Pentoos	5	Riboos	Ribuloos
Heksoos	6	Glükoos (Glc)	Fruktoos (Fru)

Monosahhariidid esinevad vesilahuses peamiselt tsükliilises vormis ja nende puhul saab eristada  $\alpha$ - ja  $\beta$ -anomeeriat.  $\alpha$ -Anomeeria puhul on sahhariidi tsükliis anomeerse süsiniku juures OH-rühm allpool tsükli tasapinda,  $\beta$ -anomeeria puhul aga ülevalpool (lisa 1a). (Zilmer jt, 2015, lk 65).

Monosahhariidiga võib olla kovalentselt seotud ka mittesahhariidne ühend (Nelson ja Cox, 2013, lk 249). Väga tihti kasutatakse glükosiidi hüdrolaaside reaktsioonides *p*-nitrofenüülglükopüranosiidi (*p*NPG-d) sünteetilise substraadina. Selles molekulis on glükosiidi jäägiga seotud 4-nitrofenüül ehk *p*-nitrofenüül (lisa 1b) ja selle lagunemisel tekib glükooos ja 4-nitrofenool, kus viimane annab lahusele aluselises keskkonnas kollase värvuse. (*4-nitrophenyl β-D-glucoside*, 2020)

Oligosahhariidides on omavahel glükosiidsidemega seotud 2–10 monosahhariidijääki, mida omakorda saab jagada vastavalt polümeerisatsiooniastmele di-, tri-, tetrasahhariidideks (Zilmer jt, 2015, lk 68). Side on moodustunud, kui ühe monoosijäägi anomeerne süsinik (monosahhariidi ahela süsinikuaatom, mis moodustab karboksüülrühma) on reageerinud teise monosahhariidi hüdroksüülrühmaga. Sõltuvalt sellest, kas anomeerse süsiniku hüdroksüülrühm on üleval- või allpool tsükli tasapinda, saab eristada ka  $\alpha$ - ja  $\beta$ -glükosiidsidet (joonis 2) (Nelson ja Cox, 2013, lk 252).



Joonis 2. Disahhariidide  $\alpha$ - ja  $\beta$ -sidemed glükoosi näitel (Nelson ja Cox, 2013, lk 252–253); sideme moodustamisel osalevate süsinike positsioonid ja anomeersus on joonisel tähistatud vastavate numbrite ja tähtedega

Kuna sahhariidid on polühüdrosüühendid, peab sidemetüübi määramisel märkima, millise süsiniku hüdroksüülrühm reageerib anomeerse süsinikuga. Näiteks sahharoos on disahhariid, mis koosneb  $\alpha$ -glükoosi ja  $\beta$ -fruktoosi jäägist. Glükoosi esimene süsinik on reageerinud fruktoosi teise süsinikuga, moodustades nii glükoosi ja fruktoosi vahele  $\alpha$ -1,2 sideme (Glc- $\alpha$ 1,2-Fru) (tabel 3). Ensüümid on spetsiifilised glükosiidsideme moodustavate positsioonide ja anomeeria suhtes, mis tähendab, et hüdrolüüsivad ainult kindla sidemetüübiga sahhariidi (Nelson ja Cox, 2013, lk 252; Zilmer jt, 2015, lk 65).

Tabel 3. Glükoosist ja fruktoosist koosnevad oligosahhariidid, nende koostis, sideme tüübid ja informatsioon suhkru tüübi kohta (Meldre, 2019, lk 8)

Sahhariidi	Sideme tüüp	Kirjeldus
Maltoos	Glc- $\alpha$ 1,4-Glc	Maltoosi-tüüpi disahhariid
Turanoos (sahharoosi isomeer)	Glc- $\alpha$ 1,3-Fru	Maltoosi-tüüpi disahhariid
Maltuloos (sahharoosi isomeer)	Glc- $\alpha$ 1,4-Fru	Maltoosi-tüüpi disahhariid
Meletsitoos	Glc- $\alpha$ 1,3-Fru- $\beta$ 2,1-Glc	Maltoosi-tüüpi trisahhariid
Maltotrioos	Glc- $\alpha$ 1,4-Glc- $\beta$ 1,4-Glc	Maltoosi-tüüpi trisahhariid
Panoos	Glc- $\alpha$ 1,6-Glc- $\beta$ 2,1-Glc	Segatüüpi trisahhariid
Isomeletsitoos	Glc- $\alpha$ 1,6-Fru- $\beta$ 2,1-Glc	Isomaltoosi-tüüpi trisahhariid
Isomaltoos	Glc- $\alpha$ 1,6-Glc	Isomaltoosi-tüüpi disahhariid
Sahharoos	Glc- $\alpha$ 1,2-Fru	Substraat nii maltaasidele kui isomaltaasidele

Tabelis 3 esitatud lühendid Glc ja Fru tähistavad vastavalt glükoosijääki ja fruktoosijääki.

Polüsahhariidid on kõrgmolekulaarsed ühendid, kus sarnaselt oligosahhariididele on suhkrujäägid seotud  $\alpha$ - ja/või  $\beta$ -glükosiidsidemetega. Looduses esinevadki süsivesikud peamiselt polüsahhariididena, kuid heterotroofsete organismide ainevahetusrajad on kohandunud kätte saama energiat eelkõige di- ja monosahhariididest. Et saada polüsahhariididest di- ja monosahhariide, peab organism polüsahhariide lagundada suutma. Mõnedel organismidel puuduvad oma ainevahetuses vastavad reaktsioonimehhanismid, mistõttu on neil välja kujunenud soolestikus esinev mikrobiota, mis lagundab paljusid polüsahhariide oligo- ja monosahhariidideks. Lühemad sahhariidid imenduvad seejärel läbi soolestiku seina vereringesse. (Zilmer jt, 2015, lk 69–70)

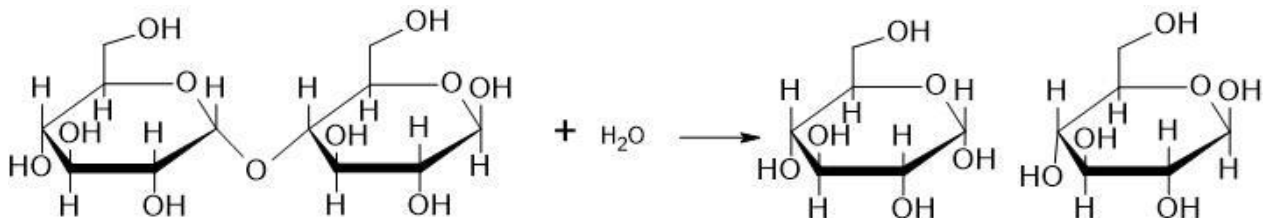
### 1.3. $\alpha$ -Glükosidaasid

Organismi homöostaasi ja ainevahetuse säilitamiseks toimub korraka palju erinevaid biokeemilisi reaktsioone. Kõik need reaktsioonid on aga rangelt kontrollitud. Ühe kontrollsüsteemid on ensüümid (valgulised biokatalüsaatorid, mis katalüüsivad bioloogilisi reaktsioone). (Zilmer jt, 2015, lk 104) Sahhariidide suur varieeruvus ja esinemine looduses peamiselt polüsahhariididena tingib ka ensüümide, mis hüdrolüüsivad erinevaid glükosiidsidemeid erinevat tüüpi molekulides, suure varieeruvuse. Sahhariide hüdrolüüsivad ensüümid kuuluvad valdavalt glükosiidi hüdrolaaside (GH-de) hulka. (Lombard jt, 2014, lk D490)

GH-d jagunevad omakorda perekondadesse (GH 1–168) ja alamperekondadesse, millest üks esindajate poolest arvukamaid on GH13. Alamperekonda kuuluvaid ensüüme eristavad ensüümikomisjoni (EC) numbrid, mis märgivad ensüümide aktiivsust, ja organism, kust ensüüm pärineb. GH13 hulka kuuluvad näiteks  $\alpha$ -amülaasid (EC 3.2.1.1), kuhu kuulub ka inimeste süljes tärklis lagundav amülaas, ja  $\alpha$ -glükosidaasid (EC 3.2.1.20 ja EC 3.2.1.10). (Lombard jt, 2014, lk 490–495) *B. adenivorans*'il on genoomijärjestuse alusel identifitseeritud kaks  $\alpha$ -glükosidaasi: *BaAG1* ja *BaAG2* (Viigand jt, 2018, lk 8). Hiljuti kioneeriti *BaAG2* valku kodeeriv geen ekspressioonvektorisse, ekspresseeriti see *Escherichia coli*'s ja ensüüm puhastati. Biokeemilised analüüsid näitasid, et *BaAG2* puhul on tegemist maltaasiga. (Meldre, 2019, lk 33; Visnapuu jt, 2020, lk 6)

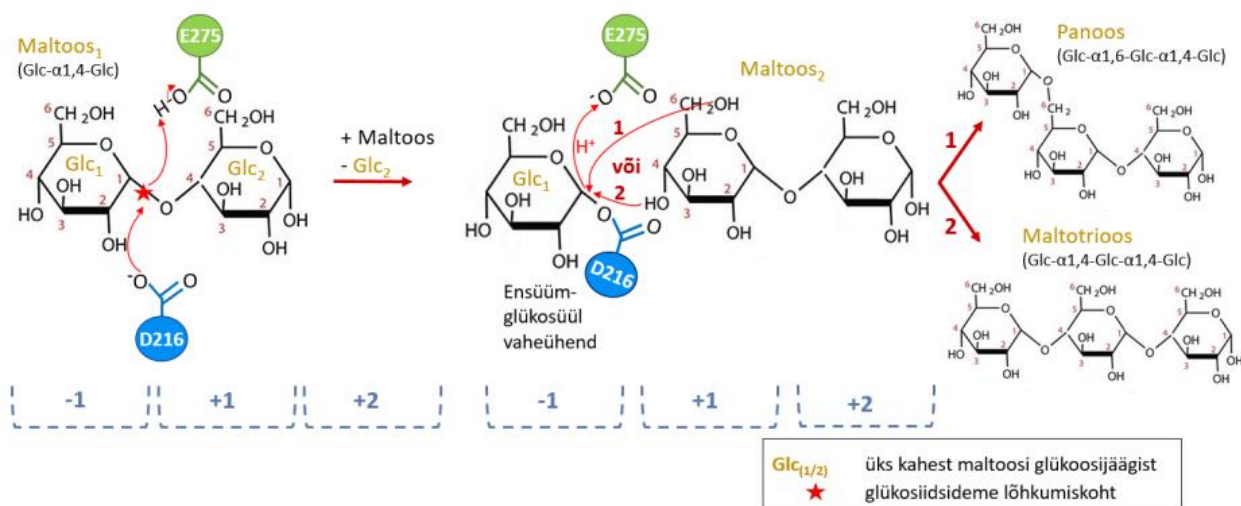
Maltaasid viivad läbi hüdrolüüsreaktsioone  $\alpha$ -1,4-glükosiidsidemetega seotud süsivesikutel (maltoosi-tüüpi suhkrud, tabel 3) (Lombard jt, 2014, lk 490-495). Lõhustamisreaktsioon toimub vee molekuli osavõtul, kus ensüümi reaktsioonitsentris hüdrolüüsitakse glükosiidside kahe monomeeri vahel, mille tulemusena laguneb molekul eraldiseisvateks monosahhariidideks (joonis 3). Enamasti pole organismi ainevahetusrajad kohastunud kasutama rakusiseselt oligo- ja

polüsahhariide, seepärast on hüdroolüüsreaktsioonid eluliselt tähtsad ning tekkinud monosahhariidid liiguvad edasi vastavatesse ainevahetusradadesse. (Zilmer jt, 2015, lk 66)



Joonis 3. Hüdroolüüsreaktsioon, mille käigus maltoos laguneb maltaasi abil vee toimel molekulide osalusel kaheks glükoosijäägiks (Nelson ja Cox, 2013, lk 252)

Lisaks hüdroolüüsile on leitud, et mitu GH perekonna ensüümi viivad läbi transglükosüülimisreaktsioone (Casa-Villegas jt, 2018, lk 19). Selles protsessis kantakse glükoosijääk substraadilt vastuvõtjale, mis võib olla näiteks mono-, di- või trisahhariid. Tekib ühe monomeeri võrra pikendatud sahhariid ning vabaneb teine glükoos (joonis 4). Transglükosüülimine toimub eelkõige kõrgel substraadi kontsentratsioonil, kus on suures koguses vastuvõtja- ehk aktseptormolekule (Casa-Villegas jt, 2018, lk 19). Madalal substraadi kontsentratsioonil toimub eelistatult hüdroolüüsireaktsioon, sest selles keskkonnas on vee molekulide palju (Adlercreutz ja Mangas-Sanchez, 2015, lk 51-55). Varem on näidatud pärmi *Xanthophyllomyces dendrorhous* maltaasil transglükosüülivat aktiivsust, kui kasutati substraadina 200 g/l maltoosi (Fernandes-Arrojo jt, 2007, lk 1; Gutierrez-Alonso jt, 2016, lk 3131). Hiljuti näidati samas uurimisgrupis, kus siinse uurimistöö tegin, et ka *BaAG2* on võimeline maltoosi transglükosüülima ja tootma maltoosist nii maltotrioosi kui ka panoosi (Visnapuu jt, 2020, lk 10).



Joonis 4. Maltaasi transglükosüülimisreaktsiooni skeem, kus substraadina kasutatakse maltoosi (Meldre, 2019, lk 9); D216 ja E275 on *BaAG2* valgujärjestuses vastavad aminohapped, mis osalevad reaktsiooni läbiviimisel; siniste numbrite ja katkendjoontega on markeeritud reaktsioonitsentri alapiirkonnad

Glükosidaaside transglükosüülivat omadust saab ära kasutada isomalto-oligosahhariidide (IMO-ide) tootmiseks (Casa-Villegas jt, 2018, lk 17). IMO-d on aeglaselt seeditavad kiudained või prebiootikumid, kus glükoosijäägid on valdavalt seotud  $\alpha$ -1,6-sidemega, aga võib esineda  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -1,2-sidemete kombinatsioone (Casa-Villegas jt, 2018, lk 17). Seda sidemetüüpi suhkrutes seedeensüümid aktiivselt ei hüdrolyüüsi, mis tingib IMO-de madala kalorsuse ning madala glükeemilise indeksi (Sorndech jt, 2017, lk 2). Valdavalt seedib taolised prebiootilised ained soolestikus leiduv mikrobioota ja need ained soodustavad probiootiliste bakterite kasvu, happeliste metabolismiproduktide moodustumist ning takistavad organismis tõvestavate bakterite vohamist (Sorndech jt, 2017, lk 2).

Organismil on ensüümide reguleerimiseks erinevaid mehhanisme, mis on võimelised nii aktiveerima kui ka pärssima ensüümi tööd kas osaliselt või täielikult. Üks selliseid mehhanisme on kofaktorite kasutamine. Kofaktorid on ühendid, mis stabiliseerides ensüümi tõstavad selle aktiivsust ning reaktsiooni tulemusel tekib rohkem saaduseid. (Zilmer jt, 2015, lk 105) Ei ole teada, kas  $\alpha$ -glükosidaasidel on kofaktoreid, mis on aktiivsuse jaoks äärmiselt olulised, kuid enamasti on neil ensüümidel kirjeldatud metallilisi inhibiitoreid, mis vähendavad aktiivsust. Varem on kirjeldatud pärmsene *Chaetomium thermophilum*  $\alpha$ -glükosidaasi ning tehtud kindlaks selle aktiivsust mõjutavaid metalliioone. Näiteks 1 mM  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ja  $Cu^{2+}$  ioonid inhibeerisid ensüümi aktiivsust vähemalt 46% ulatuses, kuid sama kontsentratsiooniga  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ja  $Mn^{2+}$  ionide mõju valgule aktiivsusele ei täheldatud. (Gianessi jt, 2006, lk 1733) Toetudes bakteriaalse *Bacillus brevis*'e maltaasi biokeemilise iseloomutamise andmetele, kus näidati  $CaCl_2$  toimet ensüümi aktivatsiooni 12% võrra (McWethy ja Hartman, 1979, lk 1099) ja sarnast  $Ca^{2+}$  aktiveerivat toimet pärmi *Brettanomyces lambicus*  $\alpha$ -glükosidaasile (Shanta Kumara jt, 1993, lk 2357), võib ennustada, et mõned kahevalentsed metalliioonid, nagu  $Ca^{2+}$ , võiks omada uuritavale valgule aktiveerivat toimet. Perioodilisustabeli järgi kuulub  $Ca^{2+}$  samasse perioodi (4. periood)  $Mn^{2+}$  ning rühma (II A)  $Mg^{2+}$ . Kuna mõlemad metalliioonid on sarase aatomi ehitusega Ca-ioonile, võiks ka nendel ionidel olla aktiveeriv toime.

Ensüümidel on kindel pH väärtus või selle vahemik, milles ensüümi struktuur on stabiilne ja mille puhul soovitav reaktsioon toimuda saab. Reaktsioonikeskkonda, milles ensüüm töötab, võib saadustena tekkida suur kogus substraate ja kõrvalprodukte, mis võivad hakata mõjutama ensüümi tööd või mõnel juhul ka lahuse pH väärtust. Siis hakkab reaktsioon pidurduma. Sellise olukorra vältimiseks ja ensümaatiliseks reaktsiooniks sobiva pH väärtuse vahemiku hoidmiseks on välja töötatud puhversüsteemid. Need on süsteemid, mis suudavad teatud hüdroksüülionide või prootonite lisandumisel keskkonda säilitada lahuse kindlat pH väärtust (Nelson ja Cox, 2013, lk 63-64). Väga laialt on ensüümide uurimisel kasutusel Tris puhver tema loodava kergelt aluselise keskkonna tõttu (pH vahemik 7...9) (*Tris base*, 2020). Tris puhvri mõju kohta maltaasidele on väga

vähe teada. Varasemate uurimustööde alusel on aga Tris puhvril tugev inhibeeriv toime *Br. lambicus*'e  $\alpha$ -glükosidaasile (Shantha Kumara jt, 1993, lk 2355-2356) ning *Ba. brevis*'e maltaasile (McWethy ja Hartman, 1979, lk 1099-1100). *BaAG2* puhul Trisi inhibeerivat mõju valgu aktiivsusele ei olnud siinse töö eksperimentide tegemise ajaks uuritud.

## 2. METOODIKA JA TÖÖ KÄIK

Töös on kasutatud Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi bakteri- ja pärmivalkude uurimisgrupis välja töötatud ja optimeeritud meetodikaid, kaliibergraafikuid, valmistatud lahuseid ja segusid. Kemikaalide ja komplektide ning katseaparatuuri tootjatele on viidatud.

### 2.1. *BaAG2* valgujärjestusele sarnaste valkude kindlakstegemine andmebaaside kasutamisega

*BaAG2* aminohappeline järjestus (lisa 2) saadi *BaAG2* valku kodeeriva geeni DNA järjestuse sekveneerimisel, kus kasutati spetsiifilisi polümeraasi ahelreaktsioonis kasutatavaid praimereid ja BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing komplekti (Applied Biosystems) (sekveneeris ja järjestuse koostas Triinu Visnapuu). DNA järjestuselt saadud valgu aminohappelise järjestuse sisestasin BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) järjestuste analüüsi vahendisse, kasutades BLASTP programmi (kasutades algoritmi algseid parameetreid), ning võrdlesin seda mitteredundantsete valkude järjestuste (*non-redundant protein sequences*), valgu tasemel biokeemiliselt iseloomustatud valkude (UniProt KB) ja katseliselt kindlaksmääratud valkude kristallstruktuuride (Protein Data Bank, PDB) andmebaaside vastu. Tulemuste analüüsil hindasin *BaAG2* ja teisest organismist pärineva valgu aminohappelist identsust, mis näitab seda, kui palju esineb samu aminohappeid samades positsioonides valgu järjestuses. Analüüsi tegin 21.09.2020.

### 2.2. *BaAG2* preparaadi valmistamine

*B. adenivorans*'i genoomsest DNA-st kioneeriti *BaAG2* valku kodeeriv geen ekspressioonivektorisse, *BaAG2* ekspresseeriti *Escherichia coli* laboritüves BL21(DE3) ja valk puhastati (Meldre, 2019, lk 13–18; Visnapuu jt, 2020, lk 13–14). Siinse uurimustöö jaoks ekspresseeris ning puhastas *BaAG2* ensüümpreparaadi Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis Triinu Visnapuu.

### 2.3. *BaAG2* preparaadis valgusisalduse määramine

Valgu kontsentratsiooni on vajalik teada, et arvutada ensüümi aktiivsused 1 mg valgu kohta. Puhastatud valgu kontsentratsiooni määrasin, kasutades valgupreparaadi optilise tiheduse (OD) väärtuste määramist spektrofotomeetriliselt (Meldre, 2019, lk 18). Lahjendamata ja destilleeritud vees 2 korda lahjendatud valgulahused pipeteerisin 2 µl kaupa nelja tehnilise paralleelina (kordust) mikroplaadile NanoQuantPlate (Tecan Group Ltd.). Kokku kasutasin kaheksat



kordusproovi. Lahuste optilised tihedused mõõtsin lainepikkusel 280 nm ( $OD_{280}$ ), kasutades mikroplaadilugejat Tecan infinite M200 PROTm (Tecan Group Ltd.). Tootjafirma programmiga Tecan i-control 1.7 registreeritud  $OD_{280}$  väärtustest arvasin preparaadi valgukontsentratsiooni, nagu on näidatud peatükis 2.8. Saadud valgukontsentratsiooni kasutasin, et arvutada valgu aktiivsusi erinevate substraatide ja tingimuste korral.

## 2.4. *BaAG2* aktiivsuse määramine sünteetilise substraadi ja looduslike sahhariididega

### 2.4.1. *pNPG* substraadina

Valgu aktiivsuse määramiseks kasutasin maltaaside sünteetilist substraati *pNPG* (lisa 1b), mille lagunemisel tekib lahusesse  $\alpha$ -glükoos ja *p*-nitrofenool, kus viimane annab lahusele aluselises keskkonnas kollase värvuse, näidates reaktsiooni toimumist. *BaAG2* aktiivsuse (reaktsiooni algkiiruse) väljendasin vabanenud *p*-nitrofenooli hulkana mikromoolides, mis tekkis 1 mg valgu kohta 1 minutis [ $\mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ ]. (Viigand jt, 2016, lk 4; Visnapuu jt, 2020, lk 16)

Uuritavat ensüümi lahjendasin vahelahjenduste abil reaktsioonipuhvriga 2000 korda (valgusisaldus 0,64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ning valgu lõppkontsentratsioon reaktsioonisegus oli 0,064  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Puhvrina kasutasin 100 mM kaalium-fosfaatpuhvrit (pH 6,5), kuna valgu optimaalne pH vahemik on piirkonnas 5,5...6,5 pH (Visnapuu jt, 2020, lk 5). Sama puhvrit ja valgulahjendust kasutasin ka edaspidi teistes eksperimentides. A. Meldre (2019, lk 27–28) magistritöö alusel oli teada, et puhvris lahjendatud valk hakkas kiiresti kaotama oma aktiivsust, sest hakkas lagunema, mistõttu lisasin ensüümisegusse *BaAG2*-d stabiliseerivat valku – veise seerumi albumiini (BSA ehk Bovine Serum Albumin Fraction V, Amresco; lõppkontsentratsioon valgulahjenduses 5 mg/ml). Valgulahjenduste lõppmaht oli 1 ml. Reaktsioonisegu koostis oli järgmine: *pNPG* (lõppkontsentratsioon 1 mM; Acros Organics), K-fosfaatpuhver ja valgulahjendus (100  $\mu\text{l}$  2000 korda lahjendatud preparaati, mis sisaldas 5 mg/ml BSA-d), kusjuures ensüümi lisasin alles siis, kui soovisin reaktsiooni käivitada. Kontrollsegu, mida kasutasin proovide mõõtmisel negatiivse kontrollina, tegin sama substraadi kontsentratsiooniga, kuid ensüümilahuse asendasin reaktsioonipuhvriga. (Visnapuu jt, 2020, lk 14–15)

Reaktsioon toimus temperatuuril 30 °C. Kasutasin vähemalt kolme tehnilist kordust. Reaktsiooniaeg oli vahemikus 1–2 min. Reaktsiooni peatasin 500  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 M, pH 11) lisamisega reaktsioonisegusse, mis muutis lahuse aluseliseks ning ensüümi reaktsioonivõime kadus. (Visnapuu jt, 2020, lk 14–15)

Reaktsioonisegude optiliste tiheduste väärtused mõõtsin lainepikkusel 400 nm (lisa 3), kasutades spektrofotomeetrit (Ultrospec 3100 pro, Biochrom Ltd.) ja plastikküvette, ning nullpunkti seadistamiseks kasutasin kontrollproovi, mis ensüümi ei sisaldanud (Visnapuu jt, 2020, lk 14–15). Sama spektrofotomeetrilist meetodit kasutasin edaspidi ka teiste proovide optiliste tiheduste väärtuste mõõtmiseks. Mõõdetud optiliste tiheduste väärtustele vastavad ensüümiaktiivsused arvutasin, nagu on näidatud peatükis 2.8.

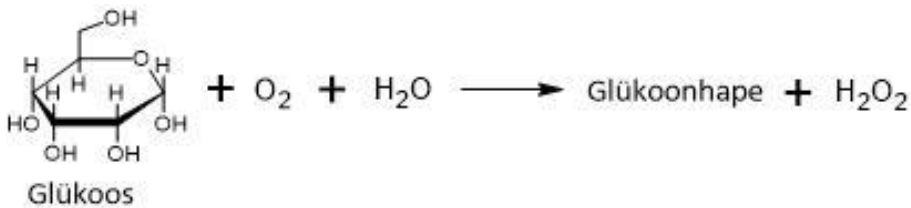
#### **2.4.2. Maltoos ja sahharoos substraatidena**

Substraatide maltoosi ja sahharoosi hüdroolüüsi käigus lagundab maltaas maltoosi kaheks glükoosi molekuliks ja sahharoosist tekib glükoosi- ja fruktoosimolekul (tabel 3). Ensüümi aktiivsust nendel substraatidel väljendasin glükoosi hulga tekkena mikromoolides 1 mg valgu kohta 1 minuti jooksul –  $\mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$  (Visnapuu jt, 2020, lk 14–15).

Mõlema substraadi korral kasutasin segus lõppkontsentratsiooni 100 mM (maltoos ja sahharoos tootjalt Sigma-Aldrich). Reaktsioonikeskkonnana kasutasin K-fosfaatpuhvit (100 mM, pH 6,5) ning reaktsiooni käivitamiseks lisasin 50  $\mu\text{l}$  *BaAG2* 100 kordset lahjendust (valgusisaldus 12,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) samas puhvris BSA juuresolekul. Reaktsioonimaht oli 1 ml ja ensüümi lõppkontsentratsioon reaktsioonisegus oli 0,64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Kontrollproovis asendasin ensüümi reaktsiooni puhvriga. (Visnapuu jt, 2020, lk 14–15)

Ilma valguta substraadisegud ja kontrollproovi panin mõneks minutiks 30 °C termostaati soojenema. Algatasin reaktsiooni *BaAG2* lahuse lisamisega, võtsin 2., 4. ja 6. minutil mõlemast substraadisegust ja kontrollproovidest kahes korduses 50  $\mu\text{l}$  proovi ning panin uude tuubi, kuhu olin eelnevalt pipeteerinud 150  $\mu\text{l}$  Tris puhvrit (100 mM, pH 8,3). See tagab glükoosi määramise reaktiivile sobiva keskkonna. Järgnevalt tõstsin proovid kohe 5 minutiks 96 °C inkubeerima, et peatada vastaval ajamomendil ensüümi töö, ning seejärel jahutasin proove vähemalt 5 minutit jääl (Visnapuu jt, 2020, lk 14–15).

Substraatidest tekkinud glükoosi hulga kindlakstegemiseks proovides kasutasin GLUCOSE liquicolor testikomplekti (tootja Human GmbH), mille reaktsioonimehhanismi kirjeldab joonis 5. Kui lahus sisaldab glükoosi, siis reaktsioonide tulemusel tekkiv kinoneimiini värvikompleks annab lahusele punaka tooni. Mida rohkem on proovis glükoosi, seda intensiivsem värvus tekib. (Glucose..., 2020) Kaliibergraafik kindlate glükoosi kontsentratsioonidele vastavate  $\text{OD}_{500}$  väärtustest oli vastavale testikomplektile varem koostatud (Triinu Visnapuu).



Joonis 5. GLUCOSE liquicolor testikomplekti reaktsioonimehhanism (Glucose..., 2020)

Jahtunud proovidele lisasin vastavalt tootja juhisele 500 µl GLUCOSE liquicolor reagenti, segasin ning inkubeerisin 37 °C 5 minutit. Punaseks värvunud reaktsioonisegude optiliste tiheduste väärtused mõõtsin plastikküvettes spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 500 nm (lisa 3) ning kontrollproovina kasutasin proovidega analoogselt käideldud, kuid ensüümi mitte sisaldavaid segusid (Visnapuu jt, 2020, lk 14–15). *BaAG2* aktiivsused arvutasin, kasutades erinevate ajapunktide proovidest mõõdetud OD<sub>500</sub> väärtusi, nagu on näidatud peatükis 2.8.

## 2.5. Kahevalentsete Mn, Ca ja Mg metalliioonide mõju *BaAG2* aktiivsusele

Kahevalentsete metalliioonide mõju *BaAG2* aktiivsuse uurimiseks kasutasin 25 mM MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> ja MgCl<sub>2</sub> soolalahuseid (10 ml). Need valmistasin tootja Sigma-Aldrich'i kõrge puhtusastmega sooladest (kaalutise massi arvutamiseks kasutasin ainete molekulmasse) ning lahustasin ained K-fosfaatpuhvis. Metalliooni mõju uurisin 1 mM, 2 mM ja 5 mM lõppkontsentratsiooniga reaktsioonisegudes. Ensüümi jääkeaktiivsust määrasin ja arvutused tegin samamoodi, nagu on kirjeldatud peatükkides 2.4.1 ja 2.8.

1 mM soolalahuse mõju uurimiseks pipeteerisin tuubi 100 µl ensüümilahendust, 40 µl soolalahust ja 760 µl puhvrit, inkubeerisin segu 30 °C 10 minutit, et metalliioonid saaksid ensüümiga seonduda, ning seejärel algatasin reaktsiooni 100 µl *pNPG* lisamisega. Kui ensüümi reaktsioon oli toimunud 1 minuti, lisasin ensüümi inhibeerimiseks 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lahust. Kontrollproovina kasutasin samasugust segu, kuid ensüümilahuse asemel kasutasin reaktsioonipuhvrit. Lisaks tegin kontrollproovi, mis koosnes 900 µl reaktsioonipuhvrist ja 100 µl *pNPG*-st, aga ei sisaldanud soolalahust. Kontrollproovide OD väärtuste erinevuse abil oli võimalik kontrollida, kas soolad reageerivad puhvriga, ning oli võimalik leida soolade kontsentratsioonid, kus sadet reaktsioonisegusse ei tekkinud. (Visnapuu, 2012, lk 52–53)

2 mM ja 5 mM soolalahuse mõju uurimiseks kasutasin samasugust määramismeetodit, nagu eelmises lõigus on kirjeldatud. Reaktsioonisegud sisaldasid lisaks ensüümlahusele 5 mM soola kontsentratsiooni korral 200 µl soolalahust ja 600 µl puhvrit, 2 mM soola kontsentratsiooni puhul

80 µl soolalahust ja 720 µl puhvrit. Järgnevad etapid tegin, nagu on näidatud eespool 1 mM tehtud proovidega. (Visnapuu, 2012, lk 52–53)

Kõikide kasutatud soolade ja kontsentratsioonide puhul kasutasin vähemalt kolme tehnilist paralleeli ning reaktsioonisegude optilise tiheduse väärtused mõõtsin spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 400 nm (lisa 3) (Visnapuu, 2012, lk 52–53).

## **2.6. Tris puhvri mõju *BaAG2* aktiivsusele**

Tris puhvri mõju uurisin kolmel erineval kontsentratsioonil – 1 mM, 5 mM ja 10 mM. Kuna Tris on puhverdav ühend, siis kasutasin eksperimendis Tris puhvit, mille pH oli 6,5, ning reaktsiooni viisin läbi sama pH-ga K-fosfaatpuhvrit sisaldavas segus, et Tris lisamisel ja ilma selle juuresolekuta proovid oleksid võrreldavad. Uurisin aine võimalikku seondumist ensüümiga ning selle mõju valgu aktiivsusele. Ensüümi jääkaktiivsuse määrasin sarnaselt eespool toodule (peatükid 2.4.1 ja 2.). Kõikide reaktsioonisegude valmistamiseks kasutasin 100 µl K-fosfaatpuhvrit (lõppkontsentratsioon 100 mM, pH 6,5) ja 100 µl *pNPG*-d (lõppkontsentratsiooniga 1 mM). (Visnapuu jt, 2020, lk 14)

10 mM Tris kontsentratsiooni puhul kasutasin ensüümi kahte lahjendust – 100 ja 200 korda (valgusisaldus vastavalt 12,8 µg/ml ja 6,4 µg/ml, lõppkontsentratsioonid vastavalt reaktsioonisegus 1,28 µg/ml ja 0,64 µg/ml). Reaktsioonisegu sisaldas 100 µl 100 mM Tris puhvrit, 100 µl sobiva ensüümpreparaadi lahjendust, 100 µl 1 M K-fosfaatpuhvrit, 600 µl destilleeritud vett ning reaktsiooni algatasin 100 µl 10 mM *pNPG* lisamisega. 5 mM ja 1 mM Tris lõppkontsentratsiooni puhul kasutasin 200 kordset valgu lahjendust. 5 mM mõju testimisel lisasin 100 mM Tris puhvrit segusse 50 µl ja 1 mM puhul 10 µl. (Visnapuu jt, 2020, lk 14)

Inkubeerisin Trisi sisaldava puhvriga valgulahust 10 minutit 30 °C, et uuritav aine saaks ensüümiga seonduda. Seejärel käivitasin reaktsiooni *pNPG* lisamisega ja reaktsiooni lõpetasin 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lisamisega. Reaktsiooniaeg oli 3 minutit. Sarnaselt teistele reaktsioonidele määrasin optilise tiheduse väärtused lainepikkusel 400 nm (lisa 3) ja arvutasin vastavad aktiivsused (peatükk 2.8). (Visnapuu jt, 2020, lk 14). 100-kordse valgulahjendusega saadud optilised tihedused tulid madalad (lisa 3), mistõttu tulemused polnud usaldusväärsed ning jätsin need analüüsist välja.

## **2.7. Oligosahhariidide tekke testimine turanoosist ja maltuloosist**

Transglükosüleerimise testimiseks kasutasin reaktsioonisegusid lõppmahus 400 µl, mis sisaldasid 200 µl uuritavat oligosahhariidi – turanoosi või maltuloosi (tabel 3) – lõppkontsentratsiooniga 50 mM. Lisaks sisaldas segu 40 µl BSA-d (lõppkontsentratsioon

5 mg/ml), 6,5 µl *BaAG2* valgupreparaati (lõppkontsentratsioon 16,3 µg/ml kohta) ning 153,5 µl K-fosfaatpuhvrit. Mõlema suhkru puhul tegin kontrollsegud, kus ensüümi preparaadi asendasin K-fosfaatpuhvriga. Suhkruproovide analüüsiks võtsin 2 h, 24 h ja 94 h ajapunktil 50 µl proovi, kuumutasin reaktsiooni peatamiseks 96 °C 5 minutit. Kromatograafiliseks analüüsiks lahjendasin proove 5 korda destilleeritud veega (maht 10 µl). (Visnapuu jt, 2020, lk 14)

Kasutasin õhukese kihi kromatograafia (ka planaarkromatograafia; *thin layer chromatography*) meetodit, et uurida, milliseid erinevaid suhkruid tekkis kasutatud disahhariididest uuritavas ajavahemikus. Selle jaoks kasutasin kontsentreeriva tsooniga õhukese kihi kromatograafia plaati (TLC Silica gel 60 with concentrating zone, tootja Merck), mille stardijoonele kandsin 0,5 µl eespool nimetatud ajapunktidel võetud ja lahjendatud proovid, ensüümi mitte sisaldavad kontrollproovid, substraadina kasutatavate suhkrute (maltuloos 10 mM ja turanoos 10 mM) lahused ning markersuhkrute lahused (valmistas Triinu Visnapuu). Viimaseid kasutasin transglükosüülimise käigus tekkinud suhkrute polümerisatsiooniastme ja sidemetüübi esialgseks kindlakstegemiseks (joonis 8). Kasutasin 4 erinevat markersegu, mis sisaldasid erinevaid mono-, di- ja trisahhariide. (Visnapuu jt, 2020, lk 15) Marker 1 sisaldas glükoosi (30 mM), maltoosi (10 mM), maltotrioosi (10 mM), marker 2 – fruktoosi (30 mM), sahharoosi (10 mM) ja meleletsitoosi (10 mM), marker 3 – isomaltoosi (10 mM) ning panoosi (10 mM) ja marker 4 – meleletsitoosi (5 mM) ja isomeletsitoosi (5 mM) (vt tabel 3).

Kromatograafia etapid toimusid tõmbekapis ning kasutasin ühekordseid nitriilkindaid. Voolutuslahusena kasutasin segu kloroform:äädikhape:vesi (60:70:10, ml:ml:ml) ning plaati voolutasin kaks korda, kuivatades seda tsüklite vahel. Pärast teist voolutamist kuivatasin ning ilmutasin plaadi aniliini reaktiiviga (1,2 g difenüülamiin ja 1,2 g aniliinhüdrokloriid 100 ml metanoolis, kuhu lisatud 10 ml kontsentreeritud ortofosforhapet), pihustades seda ühtlase kihina plaadile. Peale värvimist kuivatasin plaadi ning panin 10 minutiks 100 °C inkubeerima, et uuritavad suhkrud tuleksid plaadile nähtavale. (Põšnograjeva, 2017, lk 20; Visnapuu jt, 2020, lk 15)

Transglükosüülimise proovidest määrasin glükoosi sisalduse, lahjendades kontrollproove 5 korda (lõppmaht 150 µl) ning 2 h, 24 h ja 94 h proove 100 korda (lõppmaht 200 µl). Pipeteerisin 50 µl lahjendatud proovile 150 µl Tris puhvrit (100 mM, pH 8,3) ja inkubeerisin 96 °C 5 minutit. Glükoosisisalduse tegin kindlaks samal meetodil, nagu on näidatud peatükis 2.4.2, ja määrasin vähemalt kahe tehnilise paralleelina. (Visnapuu jt, 2020, lk 14)

## 2.8. Andmete töötlus

*BaAG2* preparaadi valgusisalduse mõõtmisel saadud OD<sub>280</sub> aritmeetilise keskmise väärtused (peatükk 2.3.; lisa 3) rakendasin valemisse 1,

$$[C] = \frac{OD_{280}}{\varepsilon \times L}$$

kus  $[C]$  = valgu kontsentratsioon (mg/ml), OD<sub>280</sub> = optiliste tiheduste väärtuste aritmeetiline keskmine,  $\varepsilon$  = neelduvustegur, mis vastab 1 mg/ml valgusisaldusega proovi neeldumise väärtusele (mg/ml) ja  $L$  = lahuse kihi paksus mikroplaadil (cm). Optiliste tiheduste (lisa 3) väärtuste aritmeetilise keskmise arvutamisel ei võtnud ma arvesse proovi B2, mis erines teistest saadud väärtustest olulisel määral, ja kahekordselt lahjendatud valguproovide OD<sub>280</sub> väärtused (C1-D2) korrutasin enne aritmeetilise keskmise arvutamist kahega. Seega arvutasin keskmise OD väärtuse 7 tehnilise paralleeli kohta. *BaAG2* teoreetiline neelduvustegur 1,971 mg/ml lainepikkusel 280 nm oli varasemalt kindlaks tehtud. (Meldre, 2019, lk 18) Vedelikukihi paksus mikroplaadi on 0,05 cm (NanoQuantPlate, Tecan Group Ltd.).

Sünteesilise substraadi *p*NPG-ga *BaAG2* aktiivsuse mõõtmisel saadud proovide optilise tiheduse väärtused (peatükk 2.4.1.; lisa 3) paigutasin valemisse 2,

$$E = \left( \frac{OD_{400}}{t} \times 1,5 \right) \div 0,0139 \div \left( \frac{1,28}{L} \right)$$

kus  $E$  = valgu aktiivsus [nmol / (mg x min)], OD<sub>400</sub> = proovi OD väärtus lainepikkusel 400 nm,  $t$  = reaktsiooniaeg (min), 1,5 = reaktsioonisegu lõppmaht (ml), 0,0139 = *p*-nitrofenooli sisaldusele vastav koefitsient (tõus, mis on määratud kindlate kontsentratsioonidega *p*-nitrofenooli proovidega koostatud kaliibergraafikult, 1 nmol/ml *p*-nitrofenooli sisaldusele vastav OD<sub>400</sub> väärtus, koostanud Triinu Visnapuu), 1,28 = valgusisaldus algses preparaadis (mg/ml),  $L$  = valgupreparaadi lahjendusfaktor, mis oli antud töös 2000 (mõjutamata proovides ja metalliioonide mõju määramisel) või 100 ja 200 (Tris puhvri mõju kindlakstegemise katses). Saadud tulemused korrutasin 1000-ga, et väljendada tulemused ühikutes  $\mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ , ning arvutasin kolme kuni kuue tehnilise korduse aritmeetilised keskmised ja standardhälbed. Sama arvutuskäiku kasutasin, kui uurisin metalliioonide ja Tris puhvri mõju ensüümi aktiivsusele (joonised 6 ja 7).

Katsetes, kus substraadina kasutasin sahharoosi või maltoosi, kasutasin mõõdetud optiliste tiheduste väärtuste (lisa 3) kaudu aktiivsuse arvutamiseks valemit 3,

$$E = \left( \frac{OD_{500}}{t} \right) \div 0,308 \div \frac{1,28}{2000}$$

kus  $E$  = valgu aktiivsus [ $\mu\text{mol}$  / (mg x min)], OD<sub>500</sub> = määratud proovi optiline tihedus,  $t$  = reaktsiooniaeg (min), 0,308 = glükoosisisaldusele vastav koefitsient (tõus, mis on määratud

kindlate kontsentratsioonidega glükoosi proovidega koostatud kaliibergraafikut, 1 mmol/ml glükoosile vastav OD<sub>500</sub> väärtus, koostanud Triinu Visnapuu), 1,28 = valgusisaldus algses preparaadis (mg/ml), L = valgupreparaadi lahjendusfaktor, mis on siinse töö katsetes 100. Tulemused on esitatud ühikutes  $\mu\text{mol} / (\text{mg} \times \text{min})$  ja arvasin erinevatel ajapunktidel määratud aktiivsuste aritm eetilise keskmised ning standardhälbed (peatükk 3.3.). Aktiivsuse arvutamisel, kus substraadiks oli maltoos, arvestasin, et reaktsioonis tekib kaks glükoosijääki ning seega jagasin keskmise tulemuse kahega.

Glükoosi koguse määramisel transglükosüülimise proovidest kasutasin glükoosi kaliibergraafikut ja mõõdetud optiliste tiheduste väärtusi (peatükk 2.8.; lisa 3). Arvestasin arvutamisel varem tehtud proovi lahjendust ja korrutasin tulemuse vastavalt kas 5 või 100-ga.

Kuigi divalentsete metalliioonide mõju *BaAG2* uurisin kolmel erineval kontsentratsioonil, arvasin valgu aktiivsuse ainult 1 mM ja 2 mM lõppkontsentratsioonil, sest 5 mM kontsentratsiooni puhul märkasin reaktsiooniseigus sademe teket, mis mõjutasid märgatavalt mõõtmistulemusi (lisa 3). Arvutused tegin, kasutades valemit 2.

Transglükosüülimisproduktide tekke kindlakstegemisel võrdlesin visuaalselt reaktsiooni käigus tekkinud suhkruproove teadaoleva koostisega markersuhkrute migratsioonidistantsidega (vahemaa stardijoonest kuni proovi laiguni kromatogrammil) ja värvustega ning järeldasin nende põhjal, millise PA-ga ja sidemetüübiga suhkrud transglükosüülimise käigus võisid tekkida. Lisaks võrdlesin teiste pärmide maltaaside transglükosüülimise proovidest tehtud samalaadse, kuid teisi substraate käsitleva analüüsi tulemusi (Meldre, 2019, lk 14) selles uurimustöös saadud tulemustega.

## 3. TULEMUSED JA ANALÜÜS

### 3.1. BaAG2 valgujärjestusele sarnaste valkude kindlakstegemine

*B. adenivorans*'i genoom sekveneeriti juba 2014. aastal, kuid selle pärmis ensüümide funktsioone ja nende biokeemilisi omadusi on seni suhteliselt vähe uuritud. Kindlaks on tehtud *B. adenivorans*'i alkoholi dehüdrogenaasi (lagudab alkohole), rakuvälise glükoamülaasi (lagundab tärklisi) ja invertaasi omadusi (lagundab sahharoosi). (Visnapuu jt, 2020, lk 1) Pärmide maltaase ja isomaltaase on valdavalt kirjeldatud pagaripärmis vastavate ensüümide näitel. Samas ei ole *B. adenivorans*'i ja *S. cerevisiae* maltaaside valgud omavahel eriti sarnased – identsuse määr *BaAG2* ja *ScMAL62* vahel on ainult 43% (Visnapuu jt, 2020, lisainfo, Tabel S2). See võib viidata erinevustele ka nende valkude biokeemilistes omadustes.

Seega uurisin, kas National Center for Biotechnology Information (NCBI) valkude üldises andmebaasis on valkude järjestusi, mis sarnanevad *BaAG2*-ga olulisel määral. Selleks sisestasin valgu aminohappelise järjestuse (lisa 2) BLAST järjestuste analüüsi vahendisse ning võrdlesin seda mitteredundantsete valkude (*non-redundant protein sequences*) (tabel 4), valgu tasemel iseloomustatud valkude (UniProt KB) ja kindlaksmääratud valkude kristallstruktuuride (PDB) andmebaaside suhtes. Leidsin teistest organismidest pärinevad valgud, millel on võrrelduna *BaAG2*-ga kõrgeimad identsuse määrad. Analüüsiks võtsin 5 kõige suurema identsusega vastet. Nii tulemustest (tabel 4) kui ka analüüsist jätsin välja hüptoteetiliste funktsioonidega valgud. Nendel valkudel on ainult aminohappelise järjestuse alusel ennustatud omadusi ja funktsioone, kuid ei ole teada valkude tegelikku ülesannet või kuuluvust, mistõttu teatakse nende kohta liiga vähe, et arvestada neid analüüsis. Hüptoteetilised valgud ei pruugi olla  $\alpha$ -glükosidaase aktiivsusega.



Tabel 4. *BaAG2* valgujärjestuse võrdluse tulemused teiste valkudega BLAST meetodil NCBI valkude andmebaasis

Ensüüm	Organism, tüvi	Identsuse määr (%)	GeneBank number
α-glükosidaas	<i>Coniochaeta</i> sp. 2T2.1 (viljakeha moodustav kottseen)	55,5	KAB5570591.1
α-glükosidaas	<i>Phialocephala subalpina</i> (taimejuurte endofüütne kottseen)	54,6	CZR67480.1
α-glükosidaas	<i>Lachnellula subtilissima</i> (viljakeha moodustav kottseen)	53,9	TVY35096.1
Maltaas	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1 (hallitusseen)	53,8	XP_001273478.1
α-glükosidaas	<i>Phialocephala scopiformis</i> (taimejuurte endofüütne kottseen)	53,7	XP_018062129.1

Tabelis 4 toodud valgujärjestuste analüüsi tulemusel saadud *BaAG2*-le suurima identsusega (kuni 55,5%) ensüüme, mis pärinevad valdavalt erinevatest kottseentest, ei ole biokeemiliselt iseloomustatud ning nende omaduste kohta ei ole praeguse seisuga midagi teada. Tulemustest on näha, et *BaAG2*-le väga sarnaseid valgujärjestusi, mille identsus ulatuks 56% või üle selle, ei ole seni teadustöodes kindlaks tehtud ega andmebaasi lisatud. Valgu tasemel uuritud ja teatud määral biokeemiliselt iseloomustatud valkudest (UniProt KB andmebaasi alusel) on *BaAG2*-le kõige lähedasem pärmi *Candida albicans* α- glükosidaas (UniProt KB number: Q02751.4), mille identsuse määr on 49,5%. Kindlaks määratud valgu 3D struktuuriga ensüümidest (PDB andmebaas) on kõige sarnasem *S. cerevisiae* isomaltaas (identsus 45,1%, PDB number: 3A47). Märkimist väärrib, et ühelgi pärmide maltaasil ei ole seni suudetud 3D struktuuri katseliselt kindlaks teha. Kuna *BaAG2*-le suure sarnasusega ensüüme ei ole varasemalt uuritud ega iseloomustatud, siis võib sellel maltaasil olla uudseid omadusi või muutunud biokeemilisi parameetreid.

### 3.2. Valgusisaldus *BaAG2* puhastatud preparaadis

*BaAG2* heteroloogiliselt toodetud ja puhastatud preparaadi (valmistamine on kirjeldatud peatükis 2.2), mille omadusi uurisin edaspidistes katsetes, valgusisalduseks sain 1,28 mg/ml. Selleks arvutasin valgusisalduse valemiga 1 (peatükk 2.8.), kasutades preparaadist mõõdetud optilise tiheduse OD<sub>280</sub> väärtusi (lisa 3). Saadud tulemust kasutasin kõikides edasistes *BaAG2* aktiivsuse arvutustes.

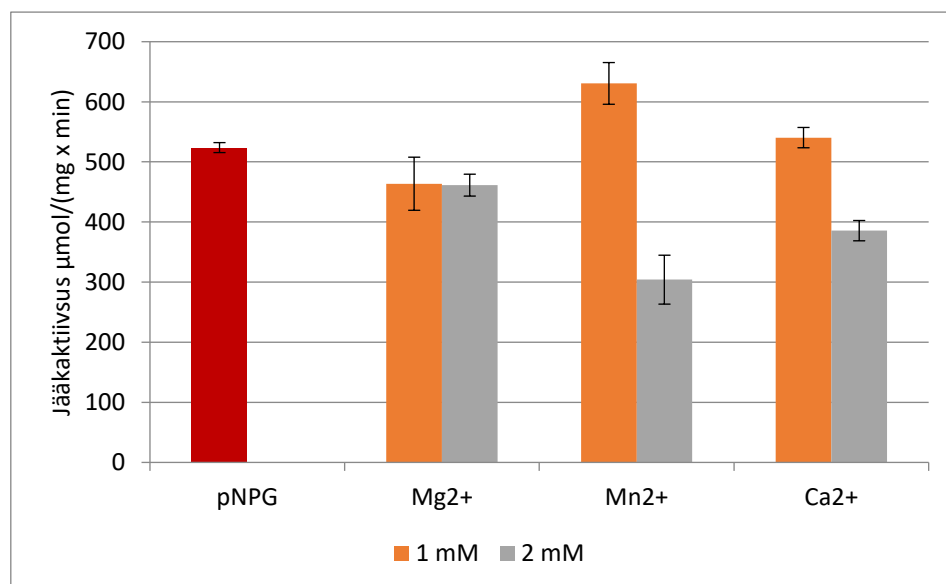
### 3.3. *BaAG2* aktiivsus, kasutades substraadiks *pNPG*-d, maltoosi ja sahharoosi

*BaAG2* näitas kõige kõrgemat aktiivsust substraadi *pNPG* suhtes, kus tulemuse väärtuseks sain  $523,8 \pm 8,3 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ . Seega on *pNPG* testitustest *BaAG2*-le kõige efektiivsem substraat. Sahharoosil mõõtsin aktiivsuseks  $392,6 \pm 18,4 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$  ning erinevus maltoosi aktiivsusega oli 1,16 kordne, mille väärtuseks sain  $337,6 \pm 15,7 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ . Aktiivsus mõlemal looduslikul substraadil oli sarnane, kuid sahharoos on veidi sobivam substraat. On kirjeldatud ka maltaase, mis erinevalt *BaAG2*-st eelistavad maltoosi sahharoosile. Üks selliseid on poolduva pärmi *S. pombe* maltaas (Chi jt, 2008, lk 983).

Tulemused olid ootuspärased, kuna A. Meldre (2019) magistritöös oli näidatud, et kolmest siinses töös testitud substraadist hüdrolyüsib *BaAG2* kõige suurema aktiivsusega sünteetilist maltaaside substraati *pNPG* ning kõige väiksema aktiivsusega maltoosi. Toetudes siinses töö tulemustele ja teistele analoogilistele eksperimentidele (Meldre, 2019, lk 33–34; Visnapuu jt, 2020, lk 6–7), võin järeldada, et *BaAG2* on suure aktiivsusega ensüüm. Näiteks pärmseene *O. polymorpha* maltaasi-isomaltaasi aktiivsused 100 mM maltoosi ja sahharoosi substraatidena kasutamise korral olid vastavalt  $107,4 \pm 3,5 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$  ja  $131,3 \pm 2,3 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$  (Viigand, 2016, lk 420). Erinevus kahe organismi maltaaside aktiivsuste vahel samadel tingimustel on seega ligikaudu kolmekordne.

### 3.4. Kahevalentsete metalliioonide mõju *BaAG2* aktiivsusele

Maltaaside võimalike kofaktorite kohta on vähe teada, mistõttu uurisin kolme divalentse metalliiooni ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ja  $\text{Ca}^{2+}$ ) mõju *BaAG2* aktiivsusele kolmel erineval kontsentratsioonil (1 mM, 2 mM, ja 5 mM). Tulemused on toodud joonisel 6.



Joonis 6. *BaAG2* aktiivsus 1 mM ja 2 mM metalliioonide juuresolekul

Punase tulbaga on näidatud ilma metalliioonide lisamiseta saadud *BaAG2* aktiivsuste keskväärtus. Aritmeetilised keskmised ja standardhälbed on arvutasin vähemalt kolme tehnilise korduse mõõtmistulemuste põhjal.

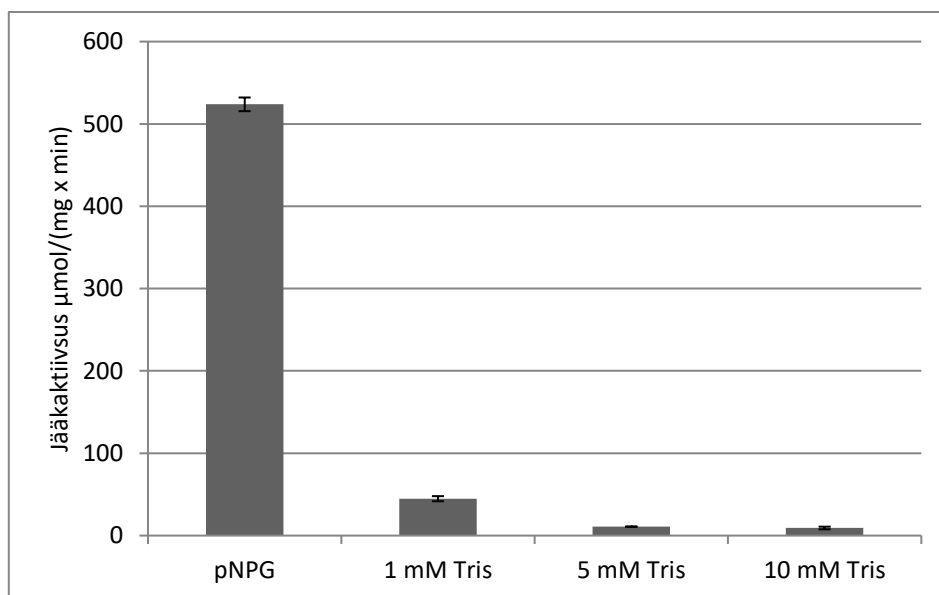
Joonisel 6 esitatud tulemustes on näha, et 1 mM  $Mn^{2+}$  juuresolekul on valgu aktiivsuse väärtus  $630,6 \pm 34,7 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ . Võrreldes seda ilma vastava metalliiooni osaluseta määratud aktiivsusega nägin ensüümi aktivatsiooni ligi 20% võrra. Samas 2 mM  $Mn^{2+}$  juuresolekul aktiivsus hoopis langes (jäakaktiivsus  $304,1 \pm 40,7 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ ), viidates tugevamale inhibitsioonile. Sarnast mõju märkasin ka  $Ca^{2+}$  puhul. 1 mM  $Ca^{2+}$  olemasolul [ $540,4 \pm 16,9 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ ] valgu aktiivsuse tõus oli minimaalne ning  $Mg^{2+}$  puhul langes aktiivsus vähesel määral [ $463,7 \pm 44,2 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ ]. Kõige vähem mõjutas valgu aktiivsust  $Mg^{2+}$  [ $461,5 \pm 18,2 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ ], mille 2 mM sisalduse korral langes aktiivsus 12% võrra ning oli väga sarnane 1 mM  $Mg^{2+}$  tulemustele.  $Ca^{2+}$  lisamine langetas ensüümi aktiivsust 26% võrra [ $385,6 \pm 16,9 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ ].

Tulemuste (joonis 6) põhjal saan väita, et uuritud kahevalentsetel metalliioonidel puudub tugev aktiveeriv mõju ensüümile, mis viitaks testitud metalliioonide kasutamisele ensüümi kofaktorina. Uuritud kontsentratsioonidest mõjutas *BaAG2* aktiivsust positiivselt ainult 1 mM  $Mn^{2+}$ , kuid aktiveeriv efekt kadus 2 mM  $Mn^{2+}$  kontsentratsioonil ning aktiivsus langes ligi 40%.

Varasemas kirjanduses on täheldatud, et bakteri *Ba. brevis*'e maltaasi (McWethy ja Hartman, 1979, lk 1099) ja pärimi *Br. lambicus*'e  $\alpha$ -glükosidaasi (Shantha Kumara jt, 1993, lk 2355–2356) aktiveeris  $Ca^{2+}$ , mille põhjal oletasin, et *BaAG2* võiks omada sobivaid seondumissaite metalliioonidele. Tulemuste põhjal (joonis 6) saan väita, et *BaAG2* puuduvad vastavad seondumissaidid Ca-ioonile. Magneesiumiooni inhibeeriv toime *BaAG2*-le võib olla osaliselt ka kooskõlas kirjandusega, kus on viidatud, et mitmed kahevalentsed metalliioonid maltaasi inhibeerisid (Gianessi jt, 2006, lk 1733), mistõttu võin oletada, et tõenäoliselt puudub valgul sobivaid seondumissaite ka  $Mg^{2+}$  jaoks. Edasi tuleks uurida  $Mn^{2+}$  ionide võimalikku mõju, sest 5 mM soolade puhul täheldasin sademe teket, mistõttu muutus OD väärtus, ning see võib seletada 2 mM  $Mn^{2+}$  aktiivsuse langust võrreldes 1 mM  $Mn^{2+}$  aktiivsusega (joonis 6). Soolade sadenemise põhjuseks võis olla puhversüsteem, mis tingis lahustumatute soolade moodustamise, ja mõjutas spektrofotomeetrilist määramise tulemusi (lisa 3). Viimase tähelepaneku tõttu ei ole tulemused 5 mM soolade puhul usaldusväärsed, mistõttu jätsin need analüüsist välja.

### 3.5. Tris puhvri mõju *BaAG2* aktiivsusele

Tris puhver on tuntud tänu oma laiale kasutusotstarbele erinevates biokeemilistes süsteemides ning seetõttu on vajalik teada, kas tegu võib olla inhibeeriva ainega kasutatava ensüümi suhtes. Jääkaktiivsuse määramise tulemused on toodud joonisel 7.



Joonis 7. *BaAG2* aktiivsused erineva kontsentratsiooniga Tris puhvri juuresolekul; toodud on vähemalt kahe tehnilise paralleeli keskväärtuste tulemused ja standardhälbed

Nägin, et Tris inhibitsioon kasvab puhvri kontsentratsiooni suurendamisel. Jääkaktiivsus 1 mM Tris puhvri kontsentratsioonil oli võrreldes ilma Trisi sisalduseta variandiga langenud ligi 12 korda ( $44,8 \pm 3,11 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ ), 5 mM puhul oli jääkaktiivsus [ $10,7 \pm 0,1 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ ] ligikaudu 50 korda väiksem. 10 mM, kus kasutati 200 kordset valgulahjendust, tuli arvutustest välja, et aktiivsuse kadu oli 57kordne [ $9,2 \pm 0,5 \mu\text{mol}/(\text{mg} \times \text{min})$ ].

*Br. lambicus*'e  $\alpha$ -glükosidaasile ja *Ba. brevis*'e maltaasile mõjus Tris puhver tugevalt inhibeerivalt (McWethy ja Hartman, 1979, lk 1099–1100; Shantha Kumara jt, 1993, lk 2355–2356) ning sarnaselt on ka *BaAG2* väga tundlik Trisi sisalduse suhtes (joonis 7). Siinse töö tulemused andsid sisendi, et määrata Tris puhvri täpne inhibitsioonikonstant ja inhibeerimise tüüp, mis määrati töös toodud katsetest hiljem ning ilmus artiklis Visnapuu jt (2020). Visnapuu jt (2020, lk 7–8) tegid kindlaks, et Tris seondub konkureerivalt ensüümi reaktsioonitsentrisse, mis seletab ka selle aine suutlikkust inhibeerida ensüümi aktiivsust. Kui aga võrrelda aktiivsusi Trisi ja suhkrute puhul, mida ensüüm ei suuda hüdrolüüsida ning mis käituvad seega reaktsiooni inhibiitoritena (näiteks palatinoos ja isomaltoos), on Tris viimastest isegi palju tugevam inhibiitor (inhibitsioonikordaja  $K_i = 70 \mu\text{M}$ ). See võib olla seotud sellega, et Trisi struktuuril (lisa 4) on sarnasusi ensüümi substraatidega, mistõttu saab aine seonduda tugevasti ensüümi reaktsioonitsentrisse. (Visnapuu jt, 2020, lk 7–8)

### 3.6. Oligosahhariidide tekke testimine turanoosist ja maltuloosist

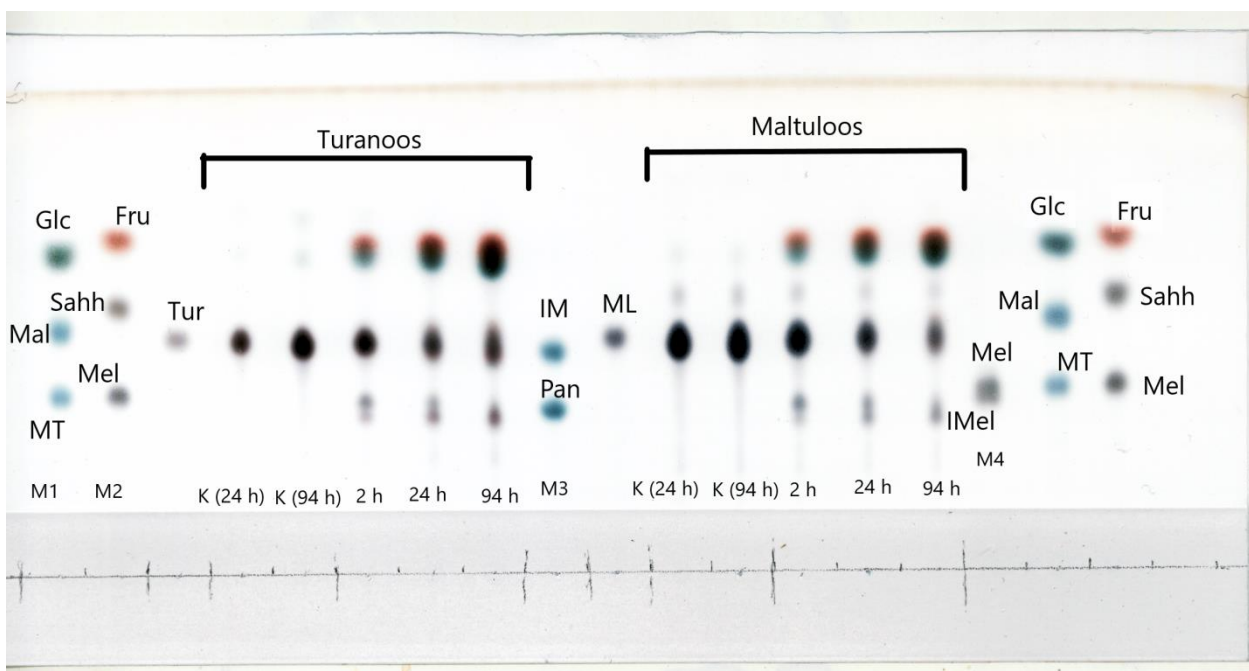
A. Meldre (2019, lk 40–41) on kirjeldanud *BaAG2* märkimisväärsed transglükosüülimisvõimet substraatidele maltaasile ja sahharoosile. Uurisin, kas ensüümil on transglükosüülivaid omadusi substraatidena kindlaks tehtud turanoosile ja maltuloosile, mis on sahharoosi isomeerid.

Proovidest määrasin vabanenud glükoosi kogust (tabel 5) ning analüüsisin proove õhukese kihi kromatograafiaga (joonis 8). Substraadid sisaldasid väga vähesel määral glükoosi. Tegin kindlaks, et juba 2 h peale reaktsiooni algust oli glükoosi mõlema substraadiga reaktsionisegusse märkimisväärsel hulgal lisandunud ning ajas tekkinud glükoosisisaldus kasvas veelgi. See viitab toimunud substraadi hüdrolyüsile. Kuna substraati lisati 500 mM, aga maksimaalne määratud glükoosisisaldus proovides oli 234,4 mM, siis oluline osa substraadist kas jäi reageerimata vaatamata pikale inkubeerimise ajale või sellest tekkis muidprodukte. Seda kontrollisin kromatograafiliselt, lahutades proovides sisalduvad suhkrud ja visualiseerides need värvimisega. Võrdluse jaoks kandsin kromatograafiaplaadile ka kindlad markersuhkrud, mille abil on võimalik produktide polümerisatsiooniaset ja mitmetel juhtudel ka koostist kindlaks teha.

Tabel 5. Glükoosisisaldus kindlatel ajapunktidel, kui substraadiks oli turanoos ja maltuloos; K tähendab kontrollproovi

<b>Turanoos (mM)</b>	<b>K 2 h</b>	<b>K 94 h</b>	<b>2 h</b>	<b>24 h</b>	<b>94 h</b>
	4,7 ± 0,2	5,6 ± 0,5	110,6 ± 7,4	97,7	234,4
<b>Maltuloos (mM)</b>	<b>K 2 h</b>	<b>K 94 h</b>	<b>2 h</b>	<b>24 h</b>	<b>94 h</b>
	2,6 ± 0,6	2,7 ± 0,8	53,6 ± 3,0	95,9 ± 3,5	180 ± 2,3

Glükoosisalduse määramise proovide maht oli väike, mistõttu ei saanud teha palju korduskatseid. Lisaks märkas optiliste tiheduste tulemustes (lisa 3) suurt kõikumist ja ei saanud ebatäpsuse tõttu kasutada kõiki andmeid glükoosi koguse määramiseks. Turanoosi 24 tunni proovi minimaalne langus glükoosi koguses on seletatav sellega, et osa glükoosist võidi kasutada transglükosüülimise käigus sahhariidide tekkeks.



Joonis 8. *BaAG2* reaktsiooniproduktid turanoosist ja maltuloosist; proovid lahutasin õhukese kihi kromatograafia meetodil ning visualiseerisin

Joonisel 8 on kromatografiaplaat, kuhu on kantud proovid ning markerid sahharoosi isomeeride, turanoosi ja maltuloosi, reaktsiooni käigus tekkinud suhkrute määramiseks. K – kontroll ehk ilma valguta substraati sisaldav segu; M1 – marker 1 (Glc – glükoos; Mal – maltoos; MT – maltotrioo); M2 – marker (Fru – fruktoos; Sahh – sahharoos; Mel – meleitsitoos); M3 – marker 3 (IM – isomaltoos; Pan – panoos); M4 – marker 4 (Mel – meleitsitoos; IMel – isomeleitsitoos); Tur – turanoos; ML – maltuloos.

Mitte ühtegi produkti ei jäänud stardijonele, mis viitab sellele, et kõik ühendid on vees lahustuvad mono- või oligosahhariidid. Proovides ei olnud seega mittelahustuvaid kõrvalprodukte, mis ei saanud mõjutada tulemuste täpsust ja suhkrute erineva polümerisatsiooniastmega variantide lahutuvus oli piisav. Kõikides proovides oli tekkinud glükoosi ja fruktoosi, mis näitab kasutatud substraatide hüdrolüüsi. Varasematest katsetest oli teada, et *BaAG2*-l on turanoosi ja maltuloosi hüdrolüüsiv toime (Meldre, 2019, lk 32–34), kuid teadmata oli, kas antud substraadid võiksid olla sobivad ka transglükosüülimiseks. Turanoosist ja maltuloosist (disahhariidid) allapoole jääb trisahhariidide fraktsioon (joonis 8). Kontrollproovid näitasid, et substraadid on suhteliselt puhtad ning lisasuhkruid sisaldavad need väga vähe. Pikal inkubeerimisel (kuni 94 h) hakkasid substraadid küll vähesel määral lagunema, kuid *BaAG2* valgu lisamisel moodustus eripärane produktide muster. Kuna trisahhariidide fraktsioon tekkis juba 2 h reaktsiooniaja jooksul, siis võib järeldada, et *BaAG2*-l on tugev transglükosüüliv toime nii turanoosi kui maltuloosile. Visuaalsel analüüsil võib järeldada, et tekkisid meleitsitoos (kõrgemal asetsev suhkur) ja isomeleitsitoos (alumine). Meleitsitoos on tõestatud *BaAG2* substraat, seega selle vähenemine ajas on selgitatav

trisahhariidi hüdroolüüsiga. Võimalik, et turanoosist on tekkinud ka veidi lühema migratsioonidistantsiga disahhariidi, aga kasutatud meetodi lahutuvus ei ole piisavalt hea, et konkreetsemaid järeldusi teha. Sahharoosi turanoosist ei teki (joonis 8). Teada on, et maltoosist tekib *BaAG2* toimel isomaltoosi, mis on  $\alpha$ -1,6 sidemega disahhariid, mida ensüüm ise hüdroolüüsida ei suuda (Visnapuu 2020, lk 6, lk 10). Sahharoosist tekib aga disahhariididest maltuloosi ning võimalik, et ka turanoosi (Meldre, 2019, lk 41). Vastupidine reaktsioon, st sahharoosi moodustumine maltuloosist või turanoosist, ei ole töö tulemuste põhjal eelistatud protsess. Võib järeldada, et suure tõenäosusega *BaAG2* sahharoosis esinevat  $\alpha$ -1,2 sidet sünteesida ei suuda, kuid moodustab  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 ja ka  $\alpha$ -1,6 sidet.

Kuna maltuloosi substraat polnud täiesti puhas ning sisaldas arvatavasti vähesel määral sahharoosi, ei saa väita, kas *BaAG2* on võimeline maltuloosi hüdroolüüsi käigus sahharoosi sünteesima. Sarnaselt turanoosile täheldasin maltuloosil transglükosüülvat aktiivsust. Kromatogrammilt võib järeldada, et tekkinud on meletsitioosi ja/või isomeletsitioosi. Produktide täpse sidemetüübi kindlakstegemiseks tuleks kasutada spetsiifilisi analüütilisi meetodeid, näiteks tuumamagnetresonantsi või kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat, sest töös kasutatud meetod annab ainult esialgse võimaluse hinnata, millised produktid transglükosüülimise käigus tekkisid.

Tehes täpsemalt kindlaks, milliste sidemetüüpidega produkte *BaAG2* on võimeline transglükosüülimise käigus sünteesima, saab teada, kas seda ensüümi oleks võimalik ära kasutada uudsete oligosahhariidide tootmiseks. Pikema ahelaga suhkrutel võib olla prebiootiline toime soolestiku mikroobikoosusele (Visnapuu jt, 2020, lk 2). Lisaks puudub praegu odav tootmisviis taoliste trisahhariidide saamiseks, mis tingib nende kõrge hinna. Näiteks 1 g panoosi maksab umbes 3000 € (D-panose, 2020), ning isomeletsitioosi ei ole hetkel võimalik tootjatelt osta.

## KOKKUVÕTE

Töös tein kindlaks ebatraditsioonilise pärmil *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*  $\alpha$ -glükosidaasi AG2 (*BaAG2*) biokeemilisi omadusi, eesmärgiga hinnata, kas uuritava ensüümi on potentsiaali, et biotehnoloogilistes protsessides kasutust leida. Selleks on oluline teada, kas ensüümi võiks olla aktiivsuse stabiliseerimiseks vajalikke kofaktoreid, millest kõige levinumad on metallioonid, või esineb reaktsiooni toimumist takistavaid ühendeid. Testisin ka *BaAG2* võimet sünteesida vähelevinud trisahhariide, millel võiks olla rakendusi toidutehnoloogias. Kui ensüümidel esinevad uudsed või varem uuritud ensüümidega võrreldes eripärased omadused, võivad need ensüümid osutada efektiivsemaks ning tulevikus vahetada välja praegu biotehnoloogias kasutusel olevad mikroorganismid ja/või nende ensüümid.

Esimese uurimusküsimuse raames tein kindlaks, kui suurel määral esineb *BaAG2* valgu aminohappelise järjestuse ja avalikesse andmebaasidesse lisatud organismide maltaasid/ $\alpha$ -glükosidaaside järjestuste vahel identsust. Eesmärk oli leida andmebaasidest *BaAG2*-le kõige sarnasemad valgud. Selleks kasutasin *National Centre for Biotechnology Information* andmebaasi, sisestasin katseliselt kindlakstehtud *BaAG2* valgu aminohappelise järjestuse BLAST analüüsi vahendisse ning võrdlesin aminohappelise järjestuse alusel kirjeldatud valkude, valgu omaduste tasemel kirjeldatud valkude ja kindlaksmääratud valkude kristallstruktuuride andmekogude vasteid. Tulemuste hulgast eemaldas hüpoteetilise funktsiooniga valgud, mille võimalike omaduste ja kuuluvuse kohta ei ole praegusel hetkel midagi teada.

Analüüsi tulemus näitas, et seni pole *BaAG2*-le väga sarnaseid valke (valgujärjestuse identsus  $\geq$  56%) kirjeldatud. Aminohappelise järjestuse põhjal on suurima identsusega kottseene *Coniochaeta* sp.  $\alpha$ -glükosidaas (identsus 55,5%), valgu tasemel uuritud valkudest oli kõige sarnasem pärmil *Candida albicans*  $\alpha$ -glükosidaas (identsuse määr 49,5%) ning katseliselt kindlakstehtud 3D struktuuriga ensüümidest oli 45,1% identsusega vaste pagaripärmil (*S. cerevisiae*) isomaltaas, mis aga maltoosi ei lagunda. Kuna varem ei ole *BaAG2*-le sarnase aminohappelise järjestusega ensüüme uuritud ja iseloomustatud, siis võib *BaAG2*-l olla omadusi, mis on seni kirjeldatud maltaaside omadustest erinevad.

Teise uurimusküsimuse püstitasin, et teha kindlaks *BaAG2* puhastatud ensüümpreparaadi aktiivsus, mida oma eksperimentides kasutasin, kui substraat on maltoos (100 mM), sahharoos (100 mM) või pNPG (1 mM).

Veendusin, et määratud ensüümiaktiivsused olid maltoosil ja sahharoosil omavahel sarnased ning tulemused olid ka kooskõlas varasemate teadmistega *BaAG2* aktiivsusest. Kõige efektiivsemalt



hüdrolüüsis *BaAG2 pNPG*-d, mille aktiivsus oli kordades kõrgem võrreldes teistest pärmidest pärinevate maltaasidega. Seega on *BaAG2* ensüüm, millel on suur aktiivsus.

Kolmandaks uurisin, kas *BaAG2*-l on potentsiaalseid kofaktoreid kahevalentsete metalliioonide  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ja  $\text{Mn}^{2+}$  seas. Reaktsioone viisin läbi kolmel kontsentratsioonil (1 mM, 2 mM ja 5 mM). Tulemuste analüüsis kasutasin ainult 1 mM ja 2 mM ionide kontsentratsioonidel kindlaks tehtud tulemusi. Soolade 5 mM kontsentratsioonide puhul täheldasin, et proovidesse oli tekkinud sadet, mis mõjutas eksperimendi tulemusi.

Vastavalt saadud andmetele  $\text{Mg}^{2+}$  sisaldus reaktsioonisegus ei aktiveeri *BaAG2*-d. Kuigi metalliioonide mõjust maltaaside aktiivsusele on vähe teada, siis varasemas kirjanduses on kindlaks tehtud, et  $\text{Ca}^{2+}$  on mõnele maltaasile vähene aktiveeriv toime. Ca-ioonide põhjustatud aktivatsiooni *BaAG2* puhul ei täheldatud.  $\text{Mn}^{2+}$  mõju tuleks edasi uurida, kuna leidsin, et 1 mM kontsentratsiooni puhul aktiivsuse tõusu ligi 20% võrra, kuid 2 mM kontsentratsiooni korral aktiivsus langes. Tulevastes katsetes peaks kasutama puhversüsteemi, mis ei põhjustaks soolade sadestumist, et oleks võimalik testida laiemalt erinevate metalliioonide kontsentratsioonide vahemikku.

Neljanda uurimusküsimuse puhul tegin kindlaks, kas Tris puhvril, mida kasutatakse laialdaselt puhversüsteemina aluselise keskkonna loomiseks, on mõju *BaAG2* aktiivsusele. Uurisin puhverlahuse mõju kolmel kontsentratsioonil – 1 mM, 5 mM ja 10 mM. Teaduskirjanduses on mõned viited sellele, et Trisil on inhibeeriv toime maltaaside aktiivsusele. Seda kinnitavad ka siinse töö tulemused, kus määrasin Trisil olulise mõju *BaAG2* aktiivsusele ning isegi väikese kontsentratsiooniga Trisi sisaldavates proovides säilis ainult väga väike osa jääkaktiivsusest. Kontsentratsiooni 1 mM korral oli Trisi mõju juba väga tugev: aktiivsus oli langenud üle 10 korra. Kuid 5 mM aine sisalduse puhul nägin ligi 50 kordset aktiivsuse langust. Testitud Trisi kontsentratsioonidest oli kõige madalam jääkaktiivsus 10 mM Tris puhvri korral, kus jääkaktiivsus võrreldes algse ensüümiaktiivsusega oli langenud ligi 57 korda. Sellest eksperimendist sisendi saanud töögrupp, kus oma uurimistöö praktilist osa tegin, tegi kindlaks, et Tris inhibeerib *BaAG2* aktiivsust väga olulisel määral (inhibitsioonikordaja  $K_i = 70 \mu\text{M}$ ). Hiljem tehtud katsed kinnitasid, et uuritav puhvrkomponent seondub tugevasti ensüümi reaktsioonitsentrisse ilmselt tänu struktuurilisele sarnasusele suhkrutega.

Viimase uurimusküsimuse raames tegin kromatograafiliselt kindlaks, kas *BaAG2* suudab transglükosüülida ehk glükoosi jääki vastuvõtjale üle kanda ning milliseidprodukte võib transglükosüülimise reaktsioonis tekkida, kui substraatideks kasutada sahharoosi isomeere maltuloosi või turanoosi. Proovid tegin 500 mM substraatidega ning reaktsioonisegudest võtsin proove 2, 24 ja 94 tunni möödumisel. Proovidest määrasin glükoosisisaldust, mis näitasid, kas

maltuloosist ja turanoosist tekkis substraadi hüdroolüüsil glükoosi. Proovid kandsin ka õhukese kihi kromatograafia (TLC) plaadile, et lahutada tekkinudprodukte ja teha esmane sahhariidide analüüs.

Glükoosi ja fruktoosi esinemine kõikide ajapunktide proovides viitas sellele, et *BaAG2* hüdroolüüsib turanoosi ja maltuloosi, millele varasem uurimistöökä viitas (Meldre, 2019, lk 32-34). TLC plaadilt nägin, et juba 2 h jooksul oli mõlema substraadi korral tekkinud trisahhariidide fraktsioon, mille põhjal võib väita, et *BaAG2*-l on mõlemat substraati transglükosüüliv toime. Suure tõenäosusega tekib meleletsitoosi ning haruldast trisahhariidi – isomeletsitoosi. Vastavalt markersuhkrute ja proovides sisalduvate suhkrute migratsioonidistantside visuaalsele võrdlusele ning varasemate eksperimentide andmetele, võin oletada, et *BaAG2* ensüümil on võime sünteesida  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 ja  $\alpha$ -1,6 sidet, kuid puudub  $\alpha$ -1,2 sideme moodustumine. Täpsemaks tekkinud sidemetüüpide analüüsiks on vajalik kasutada spetsiifilisi analüütilisi meetodeid, nagu tuumamagnetresonants või kõrgefektiivne vedelikkromatograafia. Samade proovidega tehtud glükoosisisalduse määramisel leidsin, et esimesel ajapunktil oli glükoosi kogus reaktsioonisegus märkimisväärselt tõusnud, viidates hüdroolüüsile. Kuna olin kasutanud substraadina 500 mM suhkrut ja maksimaalset glükoosi koguse mõõtsin turanoosi 94 tunnisest proovist, mille sisaldus oli seal alla 250 mM, saan oletada, et kas osa substraadist ei kasutatud ära või moodustati sellest di- ja trisahhariidseidprodukte.

Märksõnad: aktiivsus, *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*, ensüümiaktivaator, ensüüm,  $\alpha$ -glükosidaas, hüdroolüüs, inhibiitor, pärmseen, sahhariid, transglükosüülimine, Tris, valk

# SUMMARY

Hugo Teffner Gymnasium

Eliis Grigor

Supervisors: teacher Saima Kaarna, Associate Prof. Triinu Visnapuu (*PhD*, University of Tartu)

## **Characterization of the activities and biochemical parameters of maltase AG2 from the non-conventional yeast *Blastobotrys adeninivorans***

Research Paper

2020

The aim of this study was to investigate the biochemical characteristics of  $\alpha$ -glucosidase AG2 (*BaAG2*) from the yeast *Blastobotrys (Arxula) adeninivorans*, in order to determine the suitability of the enzyme in biotechnological applications.

*B. adeninivorans* is evolutionally early-diverged yeast which is often called non-conventional as it is significantly different from *Saccharomyces cerevisiae*. The detailed characteristics of enzymes from *B. adeninivorans* have previously only scarcely studied. Investigation of proteins from non-conventional yeast species might reveal some unique characteristics or activities which are uncommon for enzymes of conventional yeast (for example *S. cerevisiae*). These traits could be applied in biotechnology to improve existing processes and yields.

$\alpha$ -Glucosidases are enzymes which hydrolyse  $\alpha$ -glucosidic bond between di- and oligosaccharides. Various physical and chemical parameters, for example, pH, temperature, metal ions and organic substances impact the activity of the enzyme. It has also been noted by other research groups that some  $\alpha$ -glucosidases have an ability to transglycosylate: transfer glucose residue from the substrate (donor molecule) to another sugar (acceptor molecule). The process results in the formation of different novel di- and trisaccharides.

In this research, I performed a database search to find similar protein sequences to *BaAG2* from other organisms and conducted four laboratory experiments using purified enzyme preparation. In ascertainment, I used sequences available in National Centre for Biotechnology Information database to find the protein sequences with the highest identity. Interestingly, *BaAG2* has an only modest identity (up to 55,5%) with fungal  $\alpha$ -glucosidase sequences deposited in the database. The first experiment conducted was to determine the activity of the enzyme preparation on two natural substrates (maltose and sucrose) and *p*NPG (4-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside). The measurements were carried out spectrophotometrically and activity units were calculated as a release of the product (glucose or *p*-nitrophenyl, respectively) per 1 mg of enzyme per 1 min. In the second

experiment, I determined the effect of divalent metal ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  (concentrations 1 mM, 2 mM and 5 mM) on *BaAG2* activity and in the third set of experiments I determined the effect of a common buffer component Tris (concentrations 1 mM, 5 mM and 10 mM) on *BaAG2* activity. In both experiments on the effect of compounds, I spectrophotometrically determined the hydrolysis of *p*NPG.

In the fourth experiment, I tested if *BaAG2* is able to transglycosylate and synthesize novel sugars with new glycosidic bonds. Sucrose isomers turanose and maltulose (500 mM) were applied as substrates and the reaction with *BaAG2* was monitored from 2 to 94 hours. In addition to the separation of the saccharides by thin-layer chromatography, the concentration of released glucose in the reaction mixtures was determined.

The results demonstrated that there are no highly similar proteins (protein sequence identity  $\geq 56\%$ ) with the *BaAG2* deposited to the database and investigated biochemically. This indicates that the *BaAG2* may have characteristics unique compared to described enzymes. I also noted that the activity of the enzyme was high and when compared to yeast *Ogataea polymorpha* maltase-isomaltase on maltose and sucrose as substrates the difference was almost triple. Based on the results, I can conclude that  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  do not have activating properties towards *BaAG2*, but  $\text{Mn}^{2+}$  may slightly activate the enzyme depending on the concentrations because I saw 20% increase of activity with 1 mM. The results with Tris showed clearly that the buffer component has a strong inhibiting effect on the enzyme. The lowest residual activities were recorded with 10 mM Tris buffer, where the activity decreased almost 57 times. When compared with some sugars (e.g. palatinose and isomaltose), which also can inhibit the enzyme, it was clearly shown that Tris inhibition is even stronger. In the last experiment, I concluded that *BaAG2* can form different glycosidic bonds between sugar molecules via transglycosylation and as a result, di- and trisaccharides are formed. Most probably melezitose and a rare trisaccharide, isomelezitose, were produced. Also, I could confirm that glucose was released due to the hydrolysis of substrates, but the final yield was relatively low suggesting the presence of incomplete hydrolysis and also transglycosylation reaction.

More research is needed to be done in order to clarify the dose-dependent effect of  $\text{Mn}^{2+}$  on *BaAG2* activity. The buffer system should be used that avoids precipitation of salts to accurately determine the effect. Also, more precise and specific analytical methods should be used to determine clearly which molecules and what kind of bonds *BaAG2* is able to form during transglycosylation reaction.

Keywords: activity, *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*, enzyme activator, enzyme,  $\alpha$ -glucosidase, hydrolysis, inhibitor, yeast, saccharide, transglycosylation, Tris, protein

## KASUTATUD ALLIKAD

4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucuronide 2020. Merck. Kättesaadav: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n1627?lang=en&region=EE> (15.11.2020).

Adlercreutz, Patrick; Mangas-Sanchez, Juan 2014. Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, lk 51–55. Kättesaadav: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.014> (03.09.2020).

Alamäe, Tiina; Viigand, Katrin; Põšnograjeva, Kristina 2019. Utilization of  $\alpha$ -Glucosidic Disaccharides by *Ogataea (Hansenula) polymorpha*: Genes, Proteins, and Regulation. *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*. Šveits: Springer, lk 1–22. Kättesaadav: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_1) (05.09.2020).

Altschul, Stephen F.; Madden, Thomas L.; Schäffer, Alejandro A.; Zhang, Jinghui; Zhang, Zheng; Miller, Webb; Lipman, David J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, lk 3389–3402. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389> (26.09.2020).

Blacketer, Melissa J.; Koehler, Carla M.; Coats, Sarah. G.; Myres, Alan. M.; Madaule, Pascal 1993. Regulation of dimorphism in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the novel protein kinase homolog Elm1p and protein phosphatase 2A. *Molecular and Cellular Biology*, 13(9), lk 5567–5581. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1128/MCB.13.9.5567> (13.06.2020).

Canonico, Laura; Galli, Edoardo; Ciani, Enrico; Comitini Francesca; Cini, Maurizio 2019. Exploitation of Three Non-Conventional Yeast Species in the Brewing Process. *Microorganisms*, 7 (11), lk 1–14. Kättesaadav: <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/11/11> (07.06.2020).

Casa-Villegas, Mary; Marin-Navarro, Julia; Polaina, Julio 2018. Amylases and related glycoside hydrolases with transglycosylation activity used for the production of isomaltooligosaccharides. *Amylase*, 2, lk 19–27. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1515/amyase-2018-0003> (27.02.2020).

CHEBI:9754 – tris 2017. ChEBI. Kättesaadav: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:9754> (05.04.2020).

Chi, Zhenming; Ni, Xiumei; Yao, Shumin 2008. Cloning and overexpression of a maltase gene from *Schizosaccharomyces pombe* in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant maltase. *Mycological Research*, 112 (8), lk 983–39. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.024> (15.11.2020).

Correia, Kevin; Yu, Shi M; Mahadevan, Radhakrishnan 2019. AYbRAH: a curated ortholog database for yeasts and fungi spanning 600 million years of evolution. *Database*, 2019, lk 1–16. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1093/database/baz022> (13.06.2020).

Csutak, Ortansa; Stoica Ileana; Ghindea, Raluca; Tanase, Ana-Maria; Vassu, Tatiana 2010. Insights on yeast bioremediation processes. *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (2), lk 5066–5071. Kättesaadav: [https://www.researchgate.net/publication/228910865\\_Insights\\_on\\_yeast\\_bioremediation\\_processes](https://www.researchgate.net/publication/228910865_Insights_on_yeast_bioremediation_processes) (25.10.2020).

D-Panose 2020. Merck. Kättesaadav: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/92145?lang=en&region=EE&cm\\_sp=Insite-\\_-caContent\\_prodMerch\\_gruCrossEntropy-\\_-prodMerch10-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/92145?lang=en&region=EE&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_gruCrossEntropy-_-prodMerch10-1) (14.11.2020).

Fernandes-Arrojo, Lucia; Marin, Dolores; Segura, Aranzazu Gomez De; Linde, Dolores; Alcalde, Miguel; Gutierrez-Alonso, Patricia; Ghazi, Iraj; Plou, Francisco, J.; Fernandez-Lobato, Maria; Ballesteros, Antonio 2007. Transformation of maltose into prebiotic isomaltooligosaccharides by a novel  $\alpha$ -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Process Biochemistry*, 42 (11), lk 1530–1536. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.08.007> (15.06.2020).

Gianessi, Giovana Cristine; Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes; Terenzi, Hector Francisco; Jorge, Joao Atilio 2006. A novel  $\alpha$ -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* that converts maltose into trehalose: Purification and partial characterisation of the enzyme. *Process Biochemistry*, 41, lk 1729–1735. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.017> (04.09.2020).

Glucose LiquiColor® Test Procedure No. BD14 2020. Interchim. Kättesaadav: <https://www.interchim.fr/ft/B/BD1840.pdf> (05.04.2020).

Gutierrez-Alonso, Patricia; Gimeno-Perez, Maria; Ramirez-Escudero, Mercedes; Plou, Francisco J.; Sanz-Aparico, Julia; Fernandez-Lobato, Maria 2016. Molecular characterization and heterologous expression of a *Xanthophyllomyces dendrorhous*  $\alpha$ -glucosidase with potential for prebiotics production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 3125–3135. Kättesaadav: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-015-7171-3> (27.02.2020).

Kumara Shantha, H. M.; De Cort, S.; Verachtert, H. 1993. Localization and Characterization of  $\alpha$ -Glucosidase Activity in *Brettanomyces lambicus*. *Applied And Environmental Microbiology*, 59, lk 2352–2358. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182290/> (16.06.2020).

Lombard, Vincent; Ramula, Hemalatha Golaconda Ramulu; Drula, Elodie; Coutinho, Pedro M.; Henrissat, Bernard 2014. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic*

*Acids Res*, 42, D490–D495. Kättesaadav: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24270786/> (19.07.2020).

Malak, Aanna; Baronian, Kim; Kunze, Gotthard 2016. *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*: a promising alternative yeast for biotechnology and basic research. *Yeast*, 33, lk 535–547. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1002/yea.3180> (25.11.2019)

McWethy, S. J.; Hartman, Paul A. 1979. Extracellular Maltase of *Bacillus brevis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 3, lk 1096–1102. Kättesaadav: <https://aem.asm.org/content/37/6/1096/article-info> (26.09.2020).

Meldre, Aivar 2019. Pärsi *Blastobotrys adenivorans*  $\alpha$ -glükosidaasi AG2 iseloomustamine. Magistritöö. Tartu Ülikool: loodus- ja täppisteaduste valdkond.

Nelson, David L.; Cox, Michael M. 2013. Lehninger Principles of Biochemistry. New York: Freeman.

Põšnograjeva, Kristina 2017. *Ogataea polymorpha* maltaas: valgu ja selle mutantide iseloomustamine ja mikroplaadipõhise aktiivsuse analüüsi meetodi väljatöötamine. Bakalaureusetöö. Taru Ülikool: loodus- ja täppisteaduse valdkond.

Radecka, Dorota; Mukherjee, Vaskar; Mateo, Raquel Quintilla; Stojiljkovic, Marija; Folquie-Moreno, Maria R.; Thevelein, Johan M. 2015. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 15 (6), lk 1–13. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053> (25.11.2019).

Robnett, Christie J.; Kurtzmann Cletus P. 2007. Multigene phylogenetic analysis of the *Trichomonascus*, *Wickerhamiella* and *Zygoascus* yeast clades, and the proposal of *Sugiyamaella* gen. nov. and 14 new species combinations. *FEMS Yeast Research*, 7 (1), lk 141–151. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00157.x> (25.07.2020).

Sinnott, Michael L. 1990. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews*, 90 (7), lk 1171–1202. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1021/cr00105a006> (15.11.2020).

Sorndech, Waraporn; Nakron, Kuenchan Na; Tongta, Sunata; Blennow, Andreas 2018. Isomalto-oligosaccharides: Recent insights in production technology and their use for food and medical applications. *LWT – Food Science and Technology*, 95, 2, lk 135–142. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.098> (28.02.2020).

Sorndech, Waraporn; Tongta, Sunata; Blennow, Andreas 2017. Slowly Digestible- and Non-Digestible  $\alpha$ -Glucans: An Enzymatic Approach to Starch Modification and Nutritional Effects. *Starch*, 70, lk 1–42. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1002/star.201700145> (28.02.2020).

Zilmer, Mihkel; Rehema, Aune; Soomets, Ursel; Zilmer, Kersti 2015. Inimkeha põhilised biomolekulid (meditsiiniliselt tähtsamad ülesanded). Inimorganismi metabolism (biokemism ja kliinilised aspektid). Tallinn: Avita.

Teste, Marie-Agne; Francois, Jean Marie; Parrou, Jean-Luc 2010. Characterization of a new multigene family encoding isomaltases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the IMA family. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (35), lk 26815–26824. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.145946> (05.09.2020).

Tris base 2020. Merck. Kättesaadav:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/trisro?lang=en&region=EE> (16.11.2020).

Walsh, R. M.; Martin, P. A. 1977. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. *Journal of The Institute of Brewing*. 83, 169–172. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1977.tb06813.x> (13.06.2020).

Wartmann, Thomas; Krüger, Annette; Adler, Klaus; Duc, Bui Minh; Kunze, Irene; Kunze, Gotthard 1995. Temperature-dependent dimorphism of the yeast *Arxula adenivorans* Ls3. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68, 215–223. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1007/bf00871818> (26.11.2019).

Wartmann, Thomas; Kunze, Gotthard 2000. Genetic transformation and biotechnological application of the yeast *Arxula adenivorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, lk 619–624. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1007/s002530000444> (07.06.2020).

Viigand, Katrin 2018. Utilization of  $\alpha$ -glucosidic sugars by *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. Väitekiri. Tartu Ülikool: loodus- ja täppisteaduste valdkond.

Viigand, Katrin; Põšnograjeva, Kristina; Visnapuu, Triinu; Alamäe, Tiina 2018. Genome Mining of Non-Conventional Yeasts: Search and Analysis of MAL Clusters and Proteins. *Genes*, 8, lk 1–20. Kättesaadav: <https://doi.org/10.3390/genes9070354> (26.11.2019).

Viigand, Katrin; Visnapuu, Triinu; Mardo, Karin; Aasamets, Anneli; Alamäe, Tiina 2016. Maltase protein of *Ogataea (Hansenula) polymorpha* is a counterpart to the resurrected ancestor protein ancMALS of yeast maltases and isomaltases. *Yeast*, 33 (8), lk 415–432. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1002/yea.3157> (12.11.2020).

Visnapuu, Triinu 2012. Levansucrases encoded in the genome of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: heterologous expression, biochemical characterization, mutational analysis and spectrum of polymerization products. Doktoritöö. Tartu Ülikool: loodus- ja täppisteaduste valdkond.



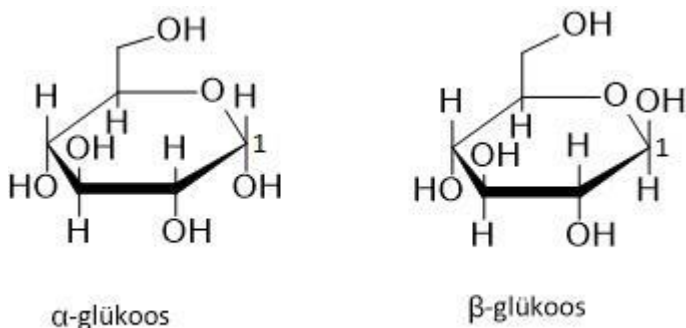
Visnapuu, Triinu; Meldre, Aivar; Põšnograjeva, Kristina; Viigand, Katrin; Ernits, Karin; Alamäe, Tiina (2020). Characterization of a Maltase from an Early-Diverged Non-Conventional Yeast *Blastobotrys adenivorans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–20. Kättesaadav: <https://doi.org/10.3390/ijms21010297> (15.04.2020).

Wolf, Klaus 1996. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*. Berliin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

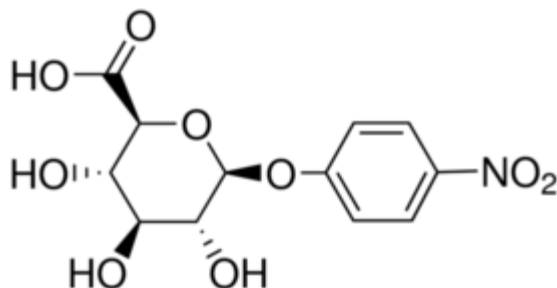
Yang, Xiao-Xian; Wartmann, Thomas; Stoltenburg, Regina; Kunze, Gotthard 2000. Halotolerance of the yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77, lk 303–311. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1023/A:1002636606282> (25.11.2019).

### Lisa 1. Sahhariidide molekulide valemid (Nelson ja Cox, 2013, lk 248; 4-Nitrophenyl $\beta$ -D-glucuronide, 2020)

a)



b)



### Lisa 2. *BaAG2* aminohappeline järjestus (Triinu Visnapuu)

>*Blastobotrys adenivorans* AG2

MVLGFFKKEQERNTAWWREGTVYQVYPSSFKDSNGDGIGDIPGIISKLDYIKSVGTDIVWLSPH  
 YKSPQVDMGYDISDYKAIHEPYGTFDDCIKLIQECHDRGLKIIFDLVVNHTSDQHEWFKQSRSSK  
 SNAKRDWYIWKPAKYDEQGNRIPPNNWESYFGGSAWEWDEETQEYYLHLFAKEQP DINWRN  
 LQAREAIYKDAILFWLDRGIDGFRIDTVQIYSKPEDFPDAPERVPGQKLQNPSIIVETGPQLHEILQ  
 EMNRKAFSKYDIMTVGEGSPPSLEKTLEYVSSSRHEIDMLFSFDFGALDHREIAHTLNDIDMVE  
 MKETVYRWQRLVGKTDGWTTFFLENHDSGRSISR FASDATPEARNRSTKFLAVLQATMSGTLY  
 LYQQQEIGIPNLPDEVPIEEYKDVNSINYYNAVKEDTKNDPDALKKAKKYLQKVARDHARSPMQ  
 WDASKHSGFTDGEPMWIMVNPIYPEVNVAQEWADDSGLNFWRHILRFRRQHKDVMVYGTLEV  
 LDKENTKVFTFTKASESGRTFLVALNFTDKAVDYDVDQFASKSTLLLSSIGNVHHKSGSLQPLEA  
 VIFEI

**Lisa 3. Optiliste tiheduste väärtused *BaAG2* ensüümiaktiivsuse määramisel, kus substraatideks kasutati *pNPG*-d, maltoosi või sahharoosi, hinnati metalliioonide ja Tris puhvri mõju ensüümi aktiivsusele ning määrati vabanenud glükoosi hulka turanoosi või maltuloosiga segudes**

	Lahjendamata valgupreparaadi optilise tiheduse väärtused (280 nm)		Kahekordse lahjendusega valgupreparaadi optilise tiheduse väärtused (280 nm)
A1	0,1319	C1	0,059
A2	0,1575	C2	0,0593
B1	0,1121	D1	0,0561
B2	0,0765	D2	0,0616

	Optiline tihedus väärtused (400 nm), kasutades substraadiks 1 mM <i>pNPG</i>
A1	0,307
A2	0,305
A3	0,296
A4	0,302

A5	0,314
----	-------

	<b>Optilise tihedus väärtused (500 nm) substraadiks sahharoos</b>	<b>Reaktsiooniaeg (min)</b>		<b>Optilise tiheduse väärtused (500 nm) substraadiks maltoos</b>	<b>Reaktsiooniaeg (min)</b>
A1	0,158	2	D 1	0,261	2
A2	0,172	2	D 1	0,29	2
B1	0,299	4	E 1	0,519	4
B2	0,304	4	E 2	0,553	4
C1	0,425	6	F 1	0,756	6
C2	0,468	6	F 2	0,775	6

	<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 1 mM Mn<sup>2+</sup> juuresolekul</b>		<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 1 mM Ca<sup>2+</sup> juuresolekul</b>		<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 1 mM Mg<sup>2+</sup> juuresolekul</b>
A1	0,364	B1	0,239	C1	0,271
A2	0,37	B2	0,281	C2	0,251
A3	0,358	B3	0,373	C3	0,303
A4	0,404				
	<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 2 mM Mn<sup>2+</sup> juuresolekul</b>		<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 2 mM Ca<sup>2+</sup> juuresolekul</b>		<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 2 mM Mg<sup>2+</sup> juuresolekul</b>
D1	0,174	E1	0,273	F1	0,266
D2	0,16	E2	0,246	F2	0,269
D3	0,207	E3	0,294	F3	0,286
		E4	0,228		
		E5	0,239		
		E6	0,219		
	<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 5 mM Mn<sup>2+</sup> juuresolekul</b>		<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 5 mM Ca<sup>2+</sup> juuresolekul</b>		<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 5 mM Mg<sup>2+</sup> juuresolekul</b>
G1	1,03	H1	0,716	I1	0,278
G2	1,072	H2	0,722	I2	0,251
G3	1,019	H3	0,707	I3	0,303

	<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 1 mM Tris juuresolekul, valgulahjendus 200x</b>	<b>Reaktsioonia eg (min)</b>		<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 5 mM Tris juuresolekul, valgulahjendus 200x</b>	<b>Reaktsioonia eg (min)</b>
A1	0,860	3	B1	0,194	3
A2	0,755	3	B2	0,192	3
A3	0,777	3	B3	0,190	3
	<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 10 mM Tris juuresolekul, valgulahjendus 100x</b>	<b>Reaktsioonia eg (min)</b>		<b>Optilise tiheduse väärtused (400 nm) 10 mM Tris juuresolekul, valgulahjendus 200x</b>	<b>Reaktsioonia eg (min)</b>
C1	0,095	3	D1	0,169	3
C2	0,092	3	D2	0,157	3
C3	0,044	3			

<b>Optilise tiheduse väärtused (500 nm), substraadiks turanoos</b>							
	<b>Kontroll - 24 h (5 x)</b>		<b>2 h (10 x)</b>		<b>24 h (10 x)</b>		
A1	0,296	B1	1,741	C1	1,908		
A2	0,277						
	<b>Kontroll - 94 h (5 x)</b>		<b>2 h (100 x)</b>		<b>24 h (100 x)</b>		<b>94 h</b>
D1	0,368	E1	0,334	F1	0,301	G1	0,275
D2	0,328	E2	0,366	F2	0,109	G2	0,175
		E3	0,322	F3	0,094	G3	0,722

Optilise tiheduse väärtused (500 nm), substraadiks maltuloos							
	Kontroll - 24 h (5 x)		2 h (10 x)		24 h (10 x)		
A1	0,189	B1	1,665	C1	1,831		
A2	0,118						
A3	0,134						
	Kontroll - 94 h (5 x)		2 h (100 x)		24 h (100 x)		94 h (100 x)
E1	0,202	F1	0,156	G1	0,341	D1	0,836
E2	0,134	F2	0,173	G2	0,362	D2	0,577
						D3	0,532

Lisa 4. Trisi graafiline struktuurivalem (Tris base, 2020)

