



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО

КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

ИМЕН ЛАХМАР

ТЕМА

**“Изолиране, пречистване, скрийнинг и имобилизиране на ензими от
растителни източници”**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

**за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия и химия на
физиологичноактивните вещества)**

Научен ръководител: проф. д-р инж. Любов Йотова

Научно жури:

1. доц. д-р инж. Иво Лалов – председател, рецензент
2. доц. д-р инж. Михаил Камбуров
3. доц. д-р Тамара Пайпанова
4. доц. д-р Иванка Стойнева - рецензент
5. доц. д-р Иванка Станкова

София, 2016

Дисертационният труд е написан на 119 страници, съдържа 22 фигури и 20 таблици. Цитирани са 356 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на . научен съвет на научното звено на катедра „ Биотехнологии ”, състояло се на 08/05/2016.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 30.11.2016 от 14.00 часа в зала 439, сграда „ А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересующите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Използвани съкращения

DNS	3,5-динитросалицилова киселина
DOPA	3,4-дихидроксифенилаланин
pNPP	p-нитрофенил палмитат
pNP	p-нитрофенол
TEMED	Тетраметилетилен диамин
SDS	Натриев додецил сулфат
PNAGLy	Поли N-акрилоилглицин
NAGLy/ PEGDM	N-акрилоилглицин/ Полиетилен гликол диметакрилат
PEGDM/ NAS	Полиетилен гликол диметакрилат/ N-акрилоксисукцинимид естер
CAB+	Целулозоацетат бутират+ Съполимер на акрилонит акриламид+
pANpAA+TBOT	бутанол и титанов бутилат
R	изчислените коефициенти за грешка
SD	стандартно отклонение

Въведение:

Използването на терапевтичното действие на растенията е известно още от най-ранните времена на човешката история. Доказателства за това са били открити на пет континентна при почти всички цивилизации. На Запад терапевтичното използване на растенията е започнало да намалява за сметка на синтетичните биологично активни вещества. Въпреки това, през последните десет години интересът отново се възвръща към растенията, които продължава и до днес.

Ензимите са широко разпространени природни биокатализатори, които многократно увеличават скоростта на химичните реакции и потенциалната им употреба е добре позната. Ензимите ускоряват биохимичните реакции до скоростта, необходима за биологичните процеси в живите организми. Първият открит ензим е била амилазата, изолирана от ечемик през 1833 и катализираща преобразуването на нишестето до захари. Това откритие е дало началото на развитието на производството на търговски хляб и пивоварството, и също така и на развитието на ферментационните ензими и началото на XX. Ензимите се използват практически в много индустриални процеси, което производство е било осъществявано в области като: финия органичен синтез, фармацевтиката, биосензорите, хранителната индустрия, екологията. Ензимите са предпочитани в сравнение с химичните катализатори, защото те са по-селективни и ефикасни.

Естествените вещества, присъстващи в растенията, имат предимството да притежават разнообразни химични структури и многообразни биологични активности. Растителните ензими имат по-висока активност и стабилност, отколкото подобните им ензими, изолирани от животински източници. Те разграждат повече белтъци, мазнини и въглехидрати при по-разнообразни условия на средата. Всъщност β -амилазата е била прилагана във фармацевтичната индустрия за дисперсия, производство на богати на малтоза сиропи и малтитол, а също и в пивоварната индустрия. Протеиназите са много важни за физиологичните процеси като оплождане, съсирване на кръвта и възстановяването на костите.

Други ензими, като L-аспарагиназа е била определена като важно лекарство при лечението на острата лимфобластна левкемия при децата. Липоксигеназата катализира биоокислението на полиненаситените мастни киселини, съдържащи цис, цис-1,4-пентадиенови единици като отделя хидропероксиdienови киселини като продукти.

Растителните полифенол оксидази са търсени поради тяхната способност да неутрализират свободните радикали при фотосинтезиращите тъкани. Тирозиназата е била прилагана при производството на храни, в медицината, земеделската промишленост, а също така и за аналитични цели и в екологията. Липазата катализира хидролизата на естери на глицерола с висшите мастни киселини с висока специфичност.

Съществуват някои ограничения при използването на ензимите в широко-машабните производства, като високата цена и липсата на дълготрайна оперативна стабилност. Всъщност е трудно да бъдат отделени от реакционната система, което лимитира повторното използване на ензима. Тези ограничения насърчават изследователите да прибегнат до имобилизираните ензими, като по този начин се увеличава тяхната стабилност и тяхното по-лесно възстановяване, сравнени със свободните ензими в разтвор. Освен това имобилизирането на ензимите може да подобри каталитичната стабилност.

Присъствието на амилолитична активност в растителните екстракти създава възможност за втечняването на нишестето. Използването на имобилизираната β -амилаза при различни процеси, в сравнение с използването на свободния ензим, може да редуцира разходите по процеса, като намали количеството необходим ензим, поради факта, че имобилизираните биокатализатори могат да бъдат възстановени след края на хидролитичния цикъл и могат да бъдат използвани докато ензима остава активен за няколко цикъла на реакцията.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се направи скрийнинг на изолирани и пречистени ензими от широко разпространени средиземноморски растения като *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium*.

За осъществяване на целите на настоящия дисертационен труд си поставихме следните по-конкретни задачи:

1. Провеждане на екстракция на различни ензими от двете растения.

2. Охарактеризиране по активност на наличните ензими, като амилолитична активност(α и β -амилази), протеинази, L-аспарагиназа, липоксигеназа, тирозиназа, полифенол оксидаза и липаза.
3. Определяне на молекулната маса на получените ензими чрез SDS-електрофореза.
4. Установяване на каталитичните свойства и рН и температурен оптимум на изолираните ензими.
5. Имобилизирание на ензими с амилолитична активност и охарактеризирането им, като биокатализаторни системи.
6. Оптимизация на рН и температурните оптимуми на β -амилаза и изучаване на нейната термална стабилност. Изследвания върху кинетиката на амилолитичното действие.

Материали и методи

Растителен материал:

Pergularia беше доставено от маслинен насади и бадемови дървета в региона на Сфакс (Тунис). *Ecballium* беше събрана от региона на Солун (Гърция). Соята беше поръчана от региона на София (България). По 30 g от всяко от обезмазнените растения беше накиснато в 120 mL 30 % етанол. Ензимите бяха екстрахирани и утаени съответно фракциониране с 96% и 75% етанол.

Изследване на ензимите:

Концентрацията на белтъците в ензимните препарати беше определена по метода на Лоури [13]. Колориметричното измерване на β -амилазната активност беше проведено при 540 nm с помощта 1% нишесте като субстрат [6]. Изследването на казеинолитичната активност беше проведено при 37°C в присъствието на 1 g/100 ml казеин [12]. Активността на пресичане на млякото беше измерено по метода на Arima et al. [2] с някои модификации. Времето на коагулация по-ниско от 60 min беше определено като положително. Определянето на активността на пепсина беше базирано на метода на Anson [1] с въвеждането на лека модификация и използването на говежди хемоглобин като субстрат. L-аспарагиназната активност беше определена чрез

проследяването на концентрацията на амоняка, освободен като резултат от ензимното действие по директен метод [20]. Чрез използването на модифициран метод на Axlerod et al. [3], беше определена липоксигеназната активност в боратен буфер (0.2 M, pH 9.00) и линолова киселина ($21.53 \cdot 10^{-4}$ M) като субстрат. Полифенол оксидазната активност беше определена при 475 nm с помощта на L-тирозин като монофенолен субстрат [16]. Тирозиназната реакция беше проследена за 5 min на интервали от 10 s при 475 nm [5, 9]. Липазната активност беше определена с помощта на p-нитрофенил палмитат като субстрат с малка модификация - Ertuğrul et al. [10].

SDS-PAGE електрофореза:

Молекулните маси на белтъците от *Pergularia*, *Ecballium* и екстрактите от соя бяха анализирани по метода на Laemmli SDS-PAGE [11] с помощта на 12% полиакриламидна концентрация на събирация и разделяция гел.

Имобилизиране на β -амилаза:

Матриците бяха синтезирани на основата на органичен полимер (целулозен ацетат бутират (CAB)) и съполимер на полиакрилонитрил и акриламид (Поли (AN-co-AA)) в неорганична мрежа [23]. Другите два типа полимерни мембрани бяха синтезирани на основата на N-акрилоил глицин (NAGly) – поли (N-акрилоилглицин) (PNAGly). Многократното използване на първата матрица беше тествано при 5 цикъла на ензимна реакция.

Характеристика на свободна и имобилизирана β -амилаза:

pH оптимума на амилазата беше определен от изследването на активността при различни стойности на pH (3.0-10.0) с помощта на различни буфери 0.02 M. Температурния оптимум на свободния и имобилизиран ензим беше определен от изследването на ензимната активност при температури от 20°C до 80°C. Кинетичното изследване беше проведено на основата на относителна промяна на освобождаването на редуциращи вещества с оптична абсорбция. Бяха приложени различни кинетични уравнения, описващи дифузионни, топохимични и хетерогенни процеси [4, 7, 24]. Кинетична променлива α беше използвана като безразмерна величина, която може да се приеме като степента на конверсия на субстрата. Тази величина α се изразява като отношението на редуциращите захари, освободени в разтвора в определен момент, R_s и

максималното количество при насищане, $R_{s \text{ max}}$ е определена експериментално: $\alpha = R_s/R_{s \text{ max}}$.

Резултати и дискусия

Изследване на ензимите:

Направен беше скрийнинг на ензимните активности в екстракти и латекси от *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium*. Резултатите са представени в Таблица 1. От нея се вижда, че амилазната активност, присъстваща в екстракта от *Pergularia* при приблизително 1.108 U/mg е по-ниска от тази, установена в латекса от *Ecballium* (0.575 U/mg белтък) и е по-малко от тази в латекса от *Euphorbia esula* (6.6 U/mg at pH 5.9 and 25°C). Резултатите, отнасящи се до *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium* също бяха сравнени с β -амилазната активност от соята. Трябва да се отбележи и това, че екстрактът от соя показва активност от 3.165 U/mg белтък.

Таблица 1. Стойности на ензимната активност на тестваните проби

		<i>Pergularia</i> Екстракт	<i>Pergularia</i> Латекс	<i>Ecballium</i> Екстракт	<i>Ecballium</i> Латекс
β -амилазна активност (U/mg белтък)	pH=4.8	0.65	1.10	0.23	0.57
Казеинолитична активност (U/mg белтък)	pH = 5.0	160.90	224.94	86.00	62.14
	pH = 7.0	299.87	331.40	250.07	115.35
	pH = 9.0	209.91	299.64	180.21	76.43
Активност на пепсин (U/mg белтък)	pH=2.0	185.40	378.10	174.61	83.69
L-аспарагиназна активност (U/mg белтък)	pH=8.6	0.07	0.06	0.06	0.06
Липоксигеназна активност (U/mg белтък)	pH=9.0	1.37	0.00	1.01	4.45
Полифенол оксидазна активност (U/mg белтък)	pH=7.0	2.41	9.27	3.55	0.76

Тирозиназна активност (U/mg белтък)	pH=7.0	1.31	4.94	0.48	0.46
Липазна активност (U/mg белтък)	pH=8.0	37.9	18.06	17.73	15.33

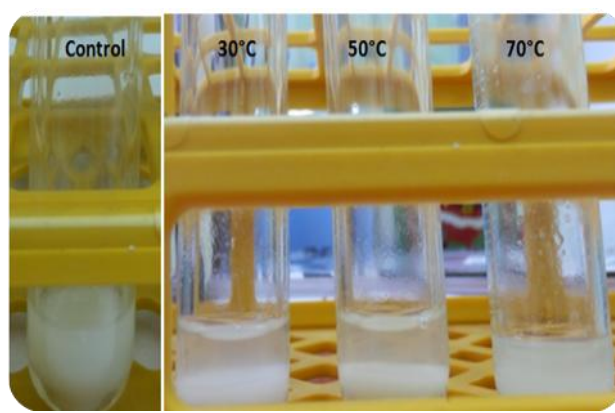
Протеолитичните ензими са инструмент при регулирането на симбиозата корен-растение като защитават растението от патогени и насекоми. Екстрактът от страничните части на *Ecballium* показва по-висока активност на протеиназите при pH 7.0 от тази при pH 5.0 и pH 9.0. При *Pegularia*, латексовия препарат показва по същество различна чувствителност при изследването на pH с оптимум при pH 7.0, за разлика от латекса от *Ecballium*. Въпреки това е известно, че някои тикови растения съдържат големи количества протеинази в техните зрели плодове. Важното количество протеинази може да се обясни с защитата на растенията срещу атака от хищници. Този ензим е най-използваната растителна протеиназа в пивоварството, пекарството и продукцията на сирена.

Активността на коагулация на млякото от *Ecballium elaterium* е отрицателна в сравнение с тази на *Pergularia tomentosa*, която е CaCl_2 -зависима. Свеж латексов екстракт от листата и стеблата притежава коагулираща млякото активност и наличие на сирищен ензим. Снимка 1 и Таблица 2 показват че латексовата пресичаща млякото активност достига най-високи стойности, когато млякото се загрее до 30°C, сравнено с ефекта наблюдаван при 50°C и 70°C. Феноменалното разделяне на млечния разтвор на фази може да бъде обяснено от хидролизата на к-казеина при разпадането на мицелите и излагането на α_s - и β -казеина на калций. Механизмът на реакцията на пресичане на млякото може да бъде асоциирана със сериновите и аспартовите протеинази. Сериновите протеинази от плода на *Cucumis melo* показват по-стабилна пресичаща млякото активност, сравнена с тази на папина. В допълнение, аспартовите протеинази от семената на *Oryza sativa* причиняващи разкъсване на к-казеина, по път, подобен на този на химозина и пепсина.

Таблица 2. Измерване на активността на пресичане на млякото при различни температури на тестваните проби.

		<i>Pergularia</i> Екстракт	<i>Pergularia</i> Латекс	<i>Ecballium</i> Екстракт	<i>Ecballium</i> Латекс
Активност на пресичане на млякото (U/mL)	30°C	много	4.94	-	-
	50°C	ниска	3.29	-	-
	70°C	активност	1.98	-	-

(-) означава отсъствие на активност



Снимка 1: Пресичане на обезмаслено мляко от латексов екстракт от *Pergularia tomentosa* L.

Някои растения имат подобна активност като тази на пепсина: бромелаин, протеолитичен ензим, открит в сока и стеблата на растението *Ananas comosus* е важен за храносмилането и разграждането на белтъците. Също така папаинът, открит в латексът на *Carica papaya*, познат като “Растителен пепсин”, заради подобната на пепсина протеолитична активност. Той отговаря за процесите на храносмилане на мазнините и белтъците и е полезен за цялостното усвояване на храната. Така че можем да изкажем хипотезата, че в *Pergularia tomentosa* присъстват протеиназоподобни на пепсина, бромелаина и папаина и в допълнение тези ензими могат да бъдат използвани за коагулиране на млякото.

В много растителни видове активността на L-аспарагиназата е свързана с нивото на калия. Има доказателства, че аспарагиназата се синтезира в листата и се пренася до върховете на развиващите се плодове. Показаната ниска активност във всички екстракти (Таблица 1) може да бъде обяснена с високата протеолитична активност ,

наблюдаваща се при повишаване нивата на протеиназите и понижаване на нивата на L-аспарагиназата. Растителните ензими не са изучавани толкова обстойно. В растенията, L-аспаргина е важен запас на азот и транспортиращо съединение, което също може да се синтезира при стресови ситуации.

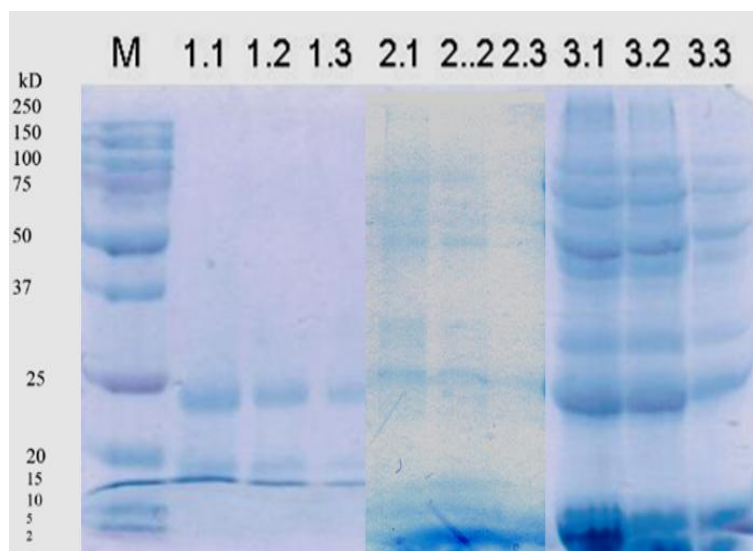
Физиологичната роля на липоксигеназата в растенията не е точно определена, но тя засяга нараняването и други стресови ситуации. Съществуват различни изоформи на липоксигеназата, присъстващи при различни стойности на pH. Латексът от *Ecballium* показва висока активност, много подобна на тази от външната част на растението. Хидропероксидните субстанции във вегетативната тъкан на *Pergularia* могат да обяснят механизма на защита. Нонадиенталаните и някои C₉ вещества присъстващи в *Ecballium* са характерни за плода и семената краставиците и тяхната биосинтеза зависи от разграждането на 9-хидроперокси октадекадиеновата киселина, като резултат от действието на липоксигеназата върху линоленова киселина. Според получените от нас резултати от *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium* в присъствието на линолова киселина, която е предпочитан субстрат от LOX 2 и LOX 3, ние можем да изкажем хипотезата, че сме получили LOX 1 и/или LOX 2 с pH оптимум на реакцията - 9.0.

Полифенол оксидазата се индуцира и при биотични и абиотичния стрес и играе важна роля при различни физиологични реакции. Латексът от *Pergularia* (Таблица 1) показва най-висока активност. Освен това покафеняването по време на периода на сушене е свързано с катализирането на кислород-зависимо окисление на фенол до реактивни хинони. Това може да бъде обяснено с присъствието на този ензим в латекса. Високата ензимна активност в латекса от *Pergularia*, сравнена с другите проби, може да обясни и коагулираща млякото активност, което е в съответствие с *Taraxacum* spp., където фенол оксидазата е ключов фактор за контролирането на коагулацията на латексът от глухарче. Трудно е обаче този факт да бъде отнесен само към полифенол оксидазата, защото нейната активност е подобна на тази на пероксидазата и лаказата, поради припокриващите се субстратни специфичности.

Тирозиназата, както и полифенол оксидазата е включена в регулацията на оксидо-редуктазния потенциал и системата на оздравяване при растенията. Нашето изследване с *Ecballium elaterium* показва ниска и почти-равномерна тирозиназна активност от порядъка на 0.4 U/mg белтък за двете тествани проби. Това може да се обясни с

присъствието на тирозиназни инхибитори, особено при плодовете. Според литературата, тирозиназата, изолирана от гъби, има тумор-супресорен ефект [22], което пък обяснява антитуморното действие на екстракта от *Pergularia* [17]. Липсата на доказателства при тирозиназна активност в тестваните екстракти, с изключение на латекса от *Pergularia* може да се дължи на различията в латентното състояние на този ензим.

Растителните липази са особено интересни, особено от гледна точка на ниската им цена, голямата достъпност на естествени източници и тяхната висока субстратна специфичност и селективност. Суровият екстракт от *Pergularia tomentosa* показва висока липазна активност (37.9 U/mg) сравнена с три други проби. Тя е по-ниска от активността от свежия латекс на *Carica papaya* и *Carica pentagona* Heilborn [8]. Във връзка с някои проучвания, касаещи липолитични ензими от *Aslepiadaceae* (ботаническото семейство на *Pergularia tomentosa*) предполагат, че липазата е включена в липидния метаболизъм или в метаболизма на терпените на латекса. Малка част от растителните ензими, показващи истинска липазна активност, са били клонирани до сега.



Снимка 2. SDS-PAGE на белтъци, изолирани от *Pergularia tomentosa* (1.1, 1.2, 1.3) *Ecballium elaterium* (2.1, 2.2, 2.3) и соя (3.1, 3.2, 3.3), в сравнение със стандартен белтък

Електрофоретичното разделяне показва чистотата и хомогеността на получените ензими.

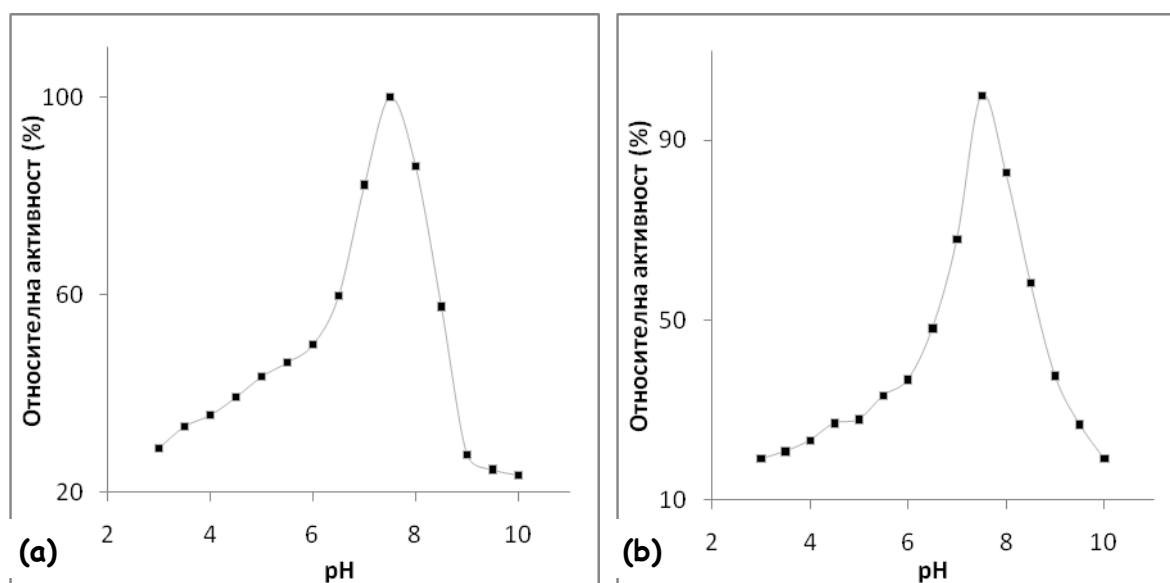
Голямото търсене на амилази на пазара, със специфични приложения в хранителната и фармацевтичната промишленост, налага продукцията и частичното пречистване на този значим ензим с помощта на евтин суров материал. Настоящата работа цели да докаже присъствието на амилази в тестваните екстракти, които да бъдат използвани в различни области като производството на перилни препарати, текстилни материали, хидролиза на добитите масла и хранителната индустрия. Според литературата молекулната маса на α -амилазата зависи от източника; α -амилазата от *Bacillus clausii* и *Heterorbditis bacteriophora* има маса 47 kDa, от *Heterorbditis dromedarii* 106 kDa, от *B. stearothermophilus* 59 kDa и тази от *Lactobacillus manihotivoras* 135 kDa

В растенията по-често се среща мономера на β -амилазата имащ молекулна маса от 42 до 65 kD. Стойност от около 110 kDa е била получена от три изоензима при соята. Молекулната маса на липоксигеназата е 51 kDa в покаралите зелени семена на *Vigna radiate*. Молекулната маса на говеждия α -, β -, и κ -казеин според SDS-PAGE беше определен между 20 и 25 kDa. Пречистената липаза от *Myroides odoratimimus*, подложена на SDS-PAGE показва молекулна маса от 35 до 45 kDa като е докладвана молекулна маса от 103 KDa, изолирана от *Bacillus coagulans*. В случая на тирозиназата, SDS-PAGE изолирана от гъби, показва молекулна маса от 95 KDa. Калусните култури от *Portulaca grandiflora* Hook имат молекулна маса от 53 kDa. Молекулната маса на активната полифенол оксидаза от картоф има молекулна маса 86 kDa, като е изградена от 2 идентични субединици. Латексът от *Hevea brasiliensis* съдържа белтъци с молекулна маса 34 kDa.

Проучването на Снимка 2 води до заключението, че резултатите на молекулните маси на изолираните белтъци са почти такива, каквито очаквахме. В екстрактът от *Ecballium* присъстват много различни белтъци и в екстрактите от соя има няколко различни белтъка. Белтъци с по-висока молекулна маса присъстват в екстракта от *Pergularia tomentosa*. Белтъци с молекулна маса от 18 и 24 KDa присъстват в екстракта от *Pergularia*. Екстрактът от *Ecballium* съдържа различни белтъци с молекулна маса 26, 31, 50, 62 и 77 KDa. Белтъците в соевия екстракт са с молекулни маси съответно 25, 30, 47, 50, 73 и 100 KDa. Според литературата, β -амилазата може да има молекулна маса 24, 31 или 50, 47 или 50, изолирана респективно от *Pergularia*, *Ecballium* and Soybean. Възможно е пробите да съдържат субстанции, които да пречат на електрофоретичното разделяне на белтъците в гела.

Протеинази:

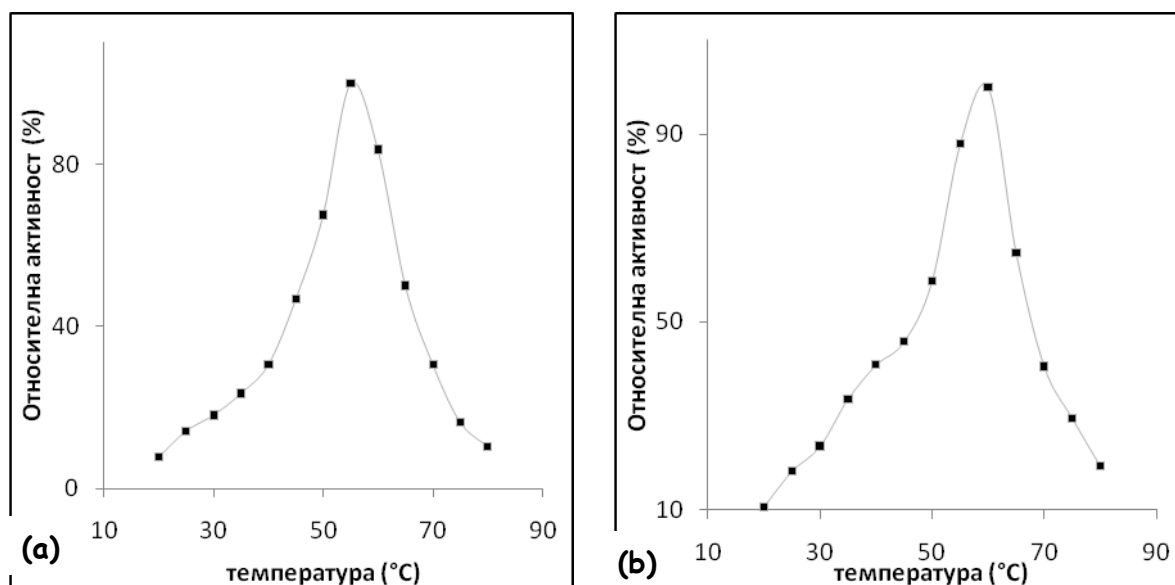
Концентрацията и вида на протеиназите зависи от фактори като вида на растението, вида на тъканта, където се намира ензима, и съответно функцията на самия ензим. Няколко различни серинови протеинази са били изолирани от различни части на растенията: семена, латекс и плодове. Екстрактът от *Synadenium grantii*, съдържащ серинови протеинази има рН оптимум 7.0 и температурен оптимум 60°C при субстрат азоказеин. Протеиназния екстракт от *T. aestivum* св. Рго показва голяма активност в рН областите от 8–10 при 60°C при субстрат химостатин. Нашите екстракти от *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium* показаха рН оптимум 7.5 (Фигура 1) и температурен оптимум 55 и 60°C, респективно. Това отговаря на хипотезата, че главните протеинази в изследваните растения са серинови протеинази. рН оптимума на растителните серинови протеинази за тяхната активност е в алкалната област с изключение на хордолизин от ечемик (рН оптимум 6.0), така както и протеиназите от царевича и протеиназа С₁ от соя (която работи най-добре в рН области от 3.5-6.5).



Фигура 1: Профил на рН оптимума на протеиназни екстракти от (a) *Pergularia tomentosa* (b) *Ecballium elaterium*

Температурния оптимум е различен при тези ензими, от 30 до 80 °C, но повечето растителни серинови протеинази, обикновено работят по-добре в областите от 20-50 °C. Температурния оптимум (Фигура 2) беше установен от 55 и 60 °C, респективно за *Pergularia* и *Ecballium*, подобен на този на алкалните протеинази, изолирани от *Alcaligenes faecalis*, които показват най-висока стойност на активността при 55°C.

Получената стойност е по-висока от тази, докладвана за изолати от кълнове от *Pleioblast hindsii*, корени от *Ipomea batatas*, семена от *Nelumbo nucifera* и *coconut endosperm*. В случая на *Pergularia*, ензимът достига до около 18% от активността при 30°C и губи до 70% при 70°C. Докато в случая на *Ecballium*, при 45°C, 47% от активността беше достигната и половината от активността беше загубена при 68°C (Фигура 2).



Фигура 2: Профил на температурния оптимум на протеинази изолирани от (a) *Pergularia tomentosa* (b) *Ecballium elaterium*

Суровите екстракти от *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium* при съответните рН и температурните оптимуми показват протеиназна активност от 249.63 и 173.49 U/mg белтък, което зависи от периода на прибиране на растителната реколта и физиологичния статус на растението. Въпреки това, нашите резултати са сравними с тези получени от други растителни протеинази. *Pseudomonas aeruginosa* показва специфична активност от 434 U/mg белтък [14]. Азоказеинолетечната активност на *Neanthes japonica* е 306.1 U/mg белтък. Активната форма на ензима, получена след ултрацентрифугиране на замразените/размразените разтворими супернатанти, екстрахирани от *Trypanosoma cruzi* показва специфична активност 220 U/mg белтък. Вторият активен протеиназен екстракт от утаения клетъчен материал – активност от 1100 U/mg белтък [18].

Имобилизиране на β -амилаза:

Имабилизирането на соевия екстракт върху NAGly/PEGDM, PEGDM/NAS и (CAB+pANpAA+TBOT) с и без активиране на матрицата, показва, че β -амилазата беше незначително по-активна на активираната матрица NAGly/PEGDM с активност 25.16%, без активиране активността беше определена като 21.09% (Таблица 3). В продължаващите ни изследвания ние ще се фокусирахме върху имобилизирането върху (CAB+pANpAA+TBOT) без използване на формалдехид за активиране на матрицата. Използването на неактивирани се матрици е много търсено за различни приложения, особено във фармацевтичната и хранителната индустрия на ензимите като цяло.

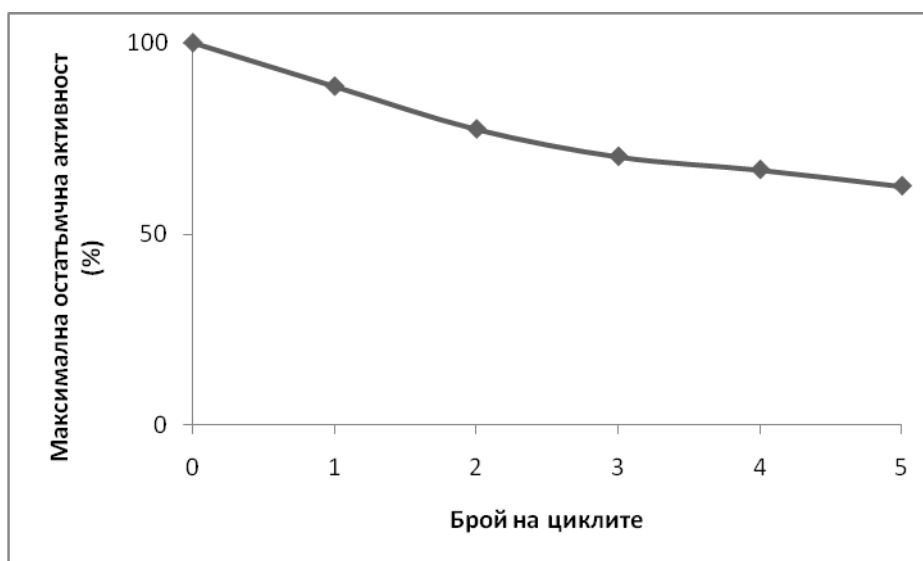
Table 3. Относителна активност на имобилизираната β -амилаза овърху различните матрици

	NAGly/PEGDM	PEGDM/NAS	CAB+pANpAA+TBOT
С активиране на матрицата	25.16	21.34	19
Без активиране на матрицата	21.09	19.5	17.97

➤ Многократно използване:

Броят на операциите, които може да бъде използван един имобилизиран ензим е една от най-важните характеристики за индустриалното му приложение. Спадът в активността във времето главно се причинява от адсорбцията на продуктите на реакцията и пречещите субстанции или загуба на стабилността от деградацията на йерархичните структури, причинено от разпадането на системата. Ефектът на многократното използване върху активността на имабилизираната β -амилаза е показан на Фигура 3. Активността спада равномерно при продължителния процес и имобилизирания ензим запазва повече от 60% от неговата начална активност след 5 цикъла на използване. Имобилизираната α -амилаза от *Bacillus acidocaldarius* върху катионнообменен носител и стъклени гранули запазва 70 и 73.4% началната си активност след 6 цикъла. Соевата α -амилаза имбилизирана върху хитозанови и амберлитни частици показва остатъчна активност от 38 and 58% респективно, след 10 използвания [21]. Загубата на активност може да бъде приписана на инактивирането на

ензима, причинено от денатуриране и отделяне на ензима от матрицата в хода на реакциите.



Фиг. 3: Графична зависимост на броя на циклите тестван имобилизиран ензим в присъствие на екстракт от соя

➤ Избор на матрица за имобилизирането:

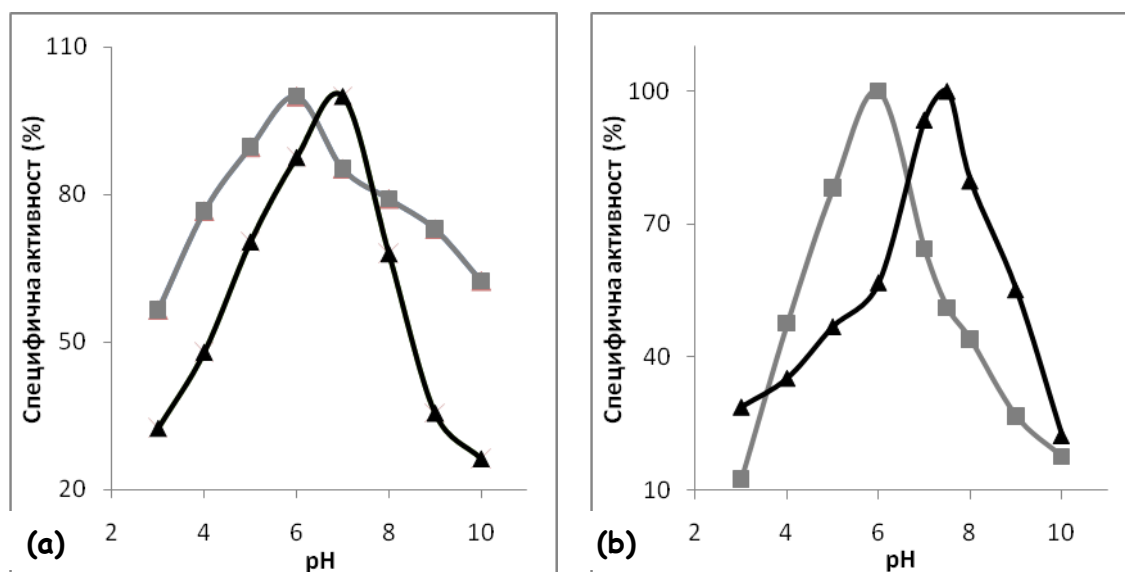
Имобилизационния добив е ключов параметър, защото той представлява общата ефективност от имобилизационния процес. Имобилизирането върху САВ+рANpAA+TBOT –базираната матрица (Таблица 4) показва, че β -амилазната активност зависи от вида на растението. Висока относителна активност беше регистрирана при соята с 17.97%, последвано от *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium* със съответно 17.01% и 14.94%.

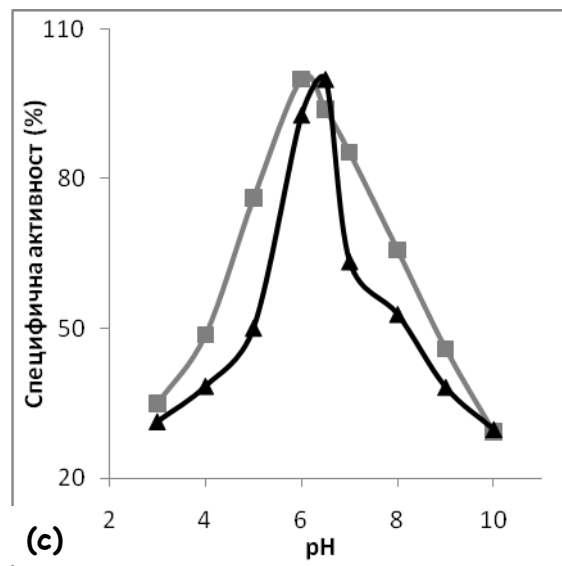
Table 4. β -амилазна активност на суровите екстракти

	Pergularia	Ecballium	Соя
Активност на свободната β-амилаза (U/mg белтък)	1.98	1.33	3.29
Активност на имобилизираната β-амилаза (U/mg белтък)	0.33	0.21	0.59

➤ **pH оптимум:**

pH оптимума на свободната и имобилизирана β -амилаза беше изследвана при различни стойности на pH (3.0–10.0) (Фигура 5). Резултатите показват, че стойностите за pH оптимумите на свободната и имобилизирана β -амилаза от *Pergularia tomentosa*, *Ecballium elaterium* и соя бяха 6.0 и 7.0; 6.0 и 7.5; 6.0 и 6.5 респективно. pH преминава към алкалните стойности след имобилизирането, което може да се дължи на вторичните взаимодействия между ензима и полимерната матрица, като йонни, аполарни взаимодействия и/или водороди връзки между ензима и матрицата [21, 99]. Максималната активност на имобилизирания ензим в областта от pH 6.50–8.0 показва неговата стабилност към алкалните промени на средата, в сравнение със свободния ензим. pH оптимумът на много ензими се измества към алкалната област, ако матрицата е анионна и към киселата област, ако матрицата е катионна, защото pH ще промени степента на йонизация на аминокиселинните остатъци в активните центрове. Това е било наблюдавано в случаите на съполимери - глицидил метакрилат и етилен гликол диметакрилат в случая на глюкоамилаза и ксиланаза, ковалентно имобилизирани върху glutаралдехид-алгинатни частици [15].

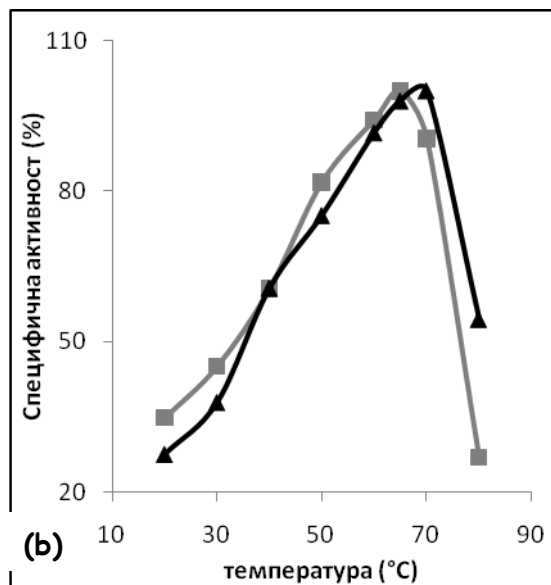
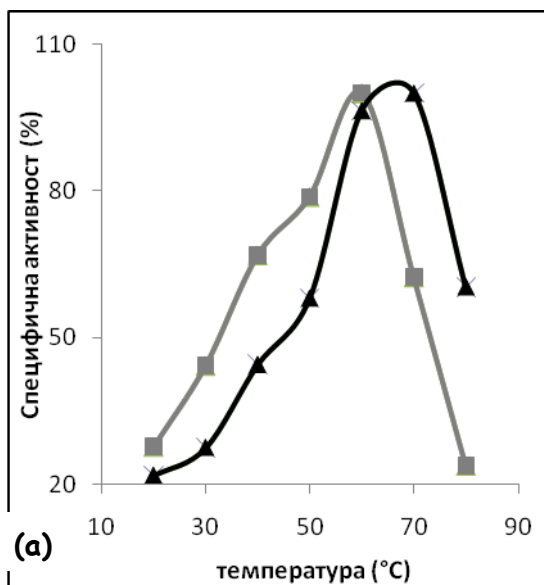


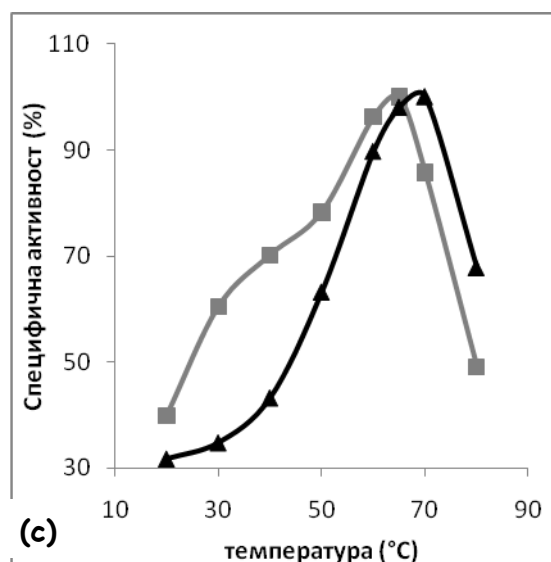


Фиг. 5: Профил на рН оптимума на свободната (—■—) и имобилизираната (—▲—) β -амилаза от (a) *Pergularia tomentosa* (b) *Ecballium elaterium* и (d) соя

➤ Температурен оптимум:

Реакциите бяха проведени при рН оптимума на всеки растителен екстракт и температурната зависимост беше проучена в областта между 20–80°C (Фигура 6).



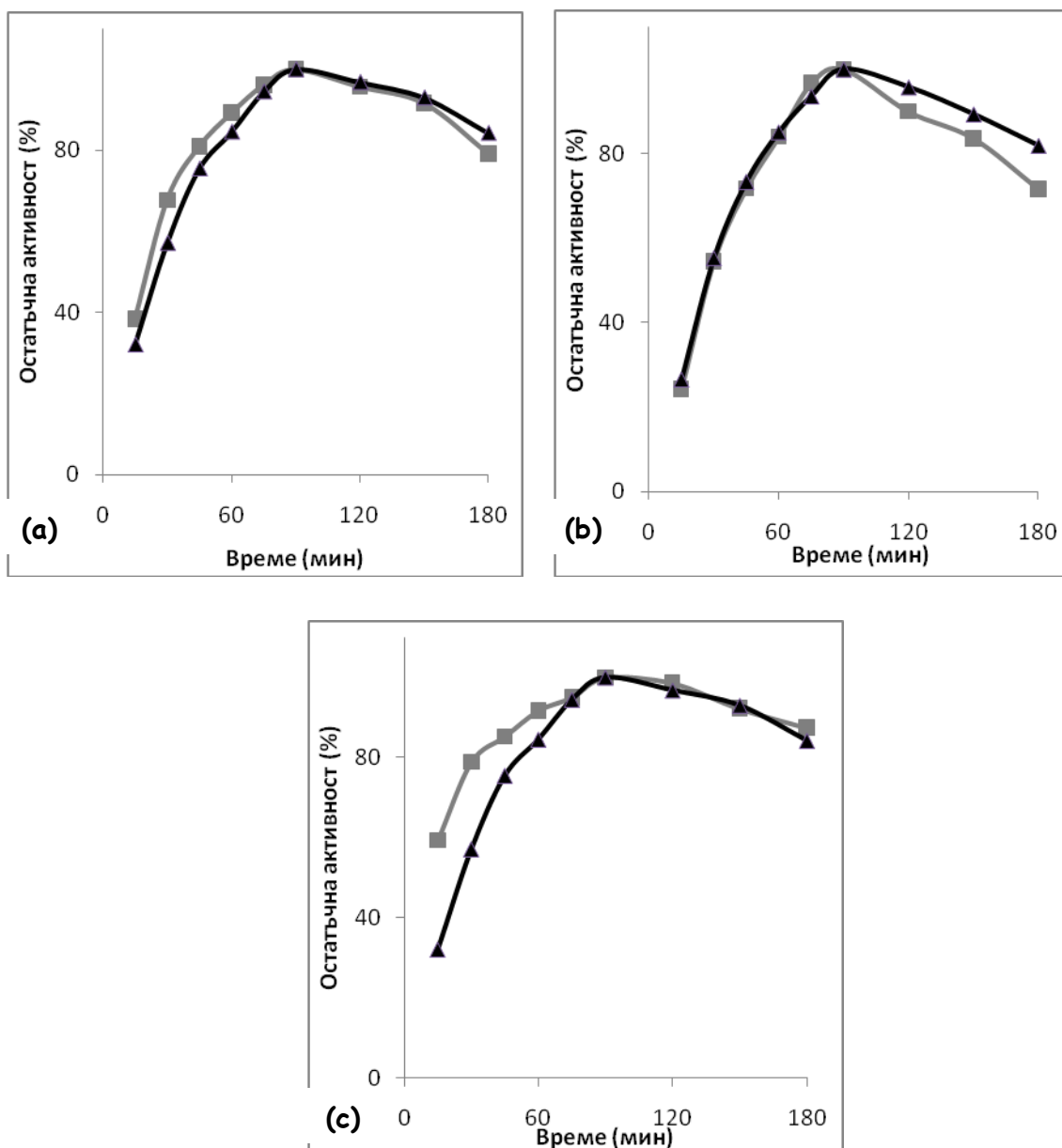


Фигура 6: Профил на температурния оптимум на свободната (—■—) и имобилизирана (—▲—) β -амилаза от (a) *Pergularia tomentosa* (b) *Ecballium elaterium* и (d) соя

Температурните оптимуми на свободния ензим в случая на *Pergularia tomentosa*, *Ecballium elaterium* и соя са съответно 60, 65 и 65°C, респективно, но след процеса на имобилизиране беше изместен и ензима показва максимални стойности на активност при 70°C и от трите растения, защото хидрофобните и други вторични взаимодействия на имобилизирания ензим могат да увредят конформацията на ензимната молекула. От друга страна, загубата на активност от 25 и 50% над 80°C може да се дължи на денатурацията на някои ензимни молекули, отделяне на ензима от матрицата и неговото разрушаване. Изместването на температурния оптимум може да се дължи на хидрофилността на матрицата, хидрофобността на самия ензим и подвижността на ензимната молекула.

➤ Изучаване на термичната стабилност:

Имобилизираната и свободна β -амилаза бяха изследвани при рН и температурния оптимум на всеки растителен екстракт за 3h (Фигура 7). Резултатите показаха, че имобилизираната β -амилаза екстрахирана от *Ecallium elaterium* запази висока активност в сравнение със свободния ензим от *Pergularia tomentosa* и соя, след 90 минутно инкубиране, което доведе до добра термична стабилност. Активността на имобилизираните ензими от трите растения намаля бавно и се запази до 80% от тяхната остатъчна активност при 70°C. Имобилизирането на ензимите може да подобри термичната стабилност чрез редуциране на мобилността на ензима и/или чрез създаване на микрообкръжаваща среда върху използваната матрица.



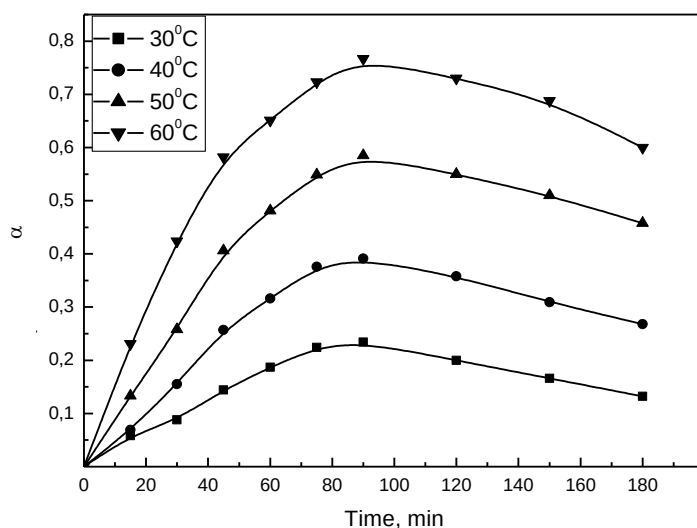
Фигура 7: Профил на термалната стабилност на свободната (—■—) и имобилизираната (—▲—) β -амилаза от (a) *Pergularia tomentosa* (b) *Ecballium elaterium* и (d) соя

Термалната стабилност на амилазите може да се подобри като се променят условията на имобилизация. Термичната стабилност на α -амилазата може да бъде многократно подобрена в присъствието на други вещества.

➤ **Кинетично проучване на β -амилазния екстракт от *Pergularia tomentosa*:**

В случая на β -амилаза и на базата на вариации в степените на α по време на реакция при различни температури, степента на конверсия се увеличава с увеличаване на температурата. С увеличаване на времето, α се увеличава до 100 min и тогава започва да спада (Фигура 8). В този случай това може да се дължи на инактивирането на ензима. Увеличаването на инкубационния период може да доведе до конформационни промени в 3D структурата на ензима, като по този начин засегне неговия афинитет към субстрата.

Проуване на Pietro изказва хипотезата [19], че амилазната активност след определен период от време на инкубиране, води до разграждане на нишестето, което се дължи на хидролизата на продуктите. β -Амилазата освобождава малто-олигозахариди с 2 или 6 глюкозни остатъка от нишесте. Малтотриази, малтотетрози, и малтопентози бяха първите продукти, получени след 90 минутна реакция. Тези резултати бяха съвместими с ендоамилолитичния механизъм на хидролиза. Това може да се дължи на първоначалното бързо действие, където α -амилазата продуцира късоверижни олигомери и тогава следва хидролиза на тези олигомери от глюкоамилазата и се получава глюкоза като краен продукт. За хидролизата на амилопектина, олигомерите са преминали през ранен максимум, намалели са и са се увеличили отново, което дава индикацията за получаването на лимитиращи скоростта декстрини с α -1,6 гликозидни връзки.



Фигура 8: Кинетични криви на процесите на проучените температури

Установено е, че процесът може най-добре да бъде описан от топохимичното уравнение на Pout – Tompkins (Таблица 5), където k има значението на видимата

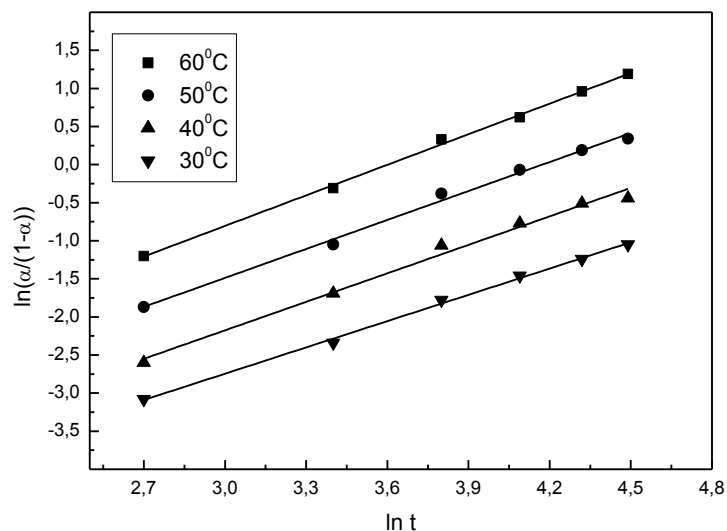
скоростна константа и фактора на активиране χ е невариабилна количествена характеристика на системата растение-ензим.

Таблица 5. Оценка на точността, представена чрез различни кинетични уравнения, описващи ензимния процес

Уравнение	T° C	R	SD
Уравнение на Prout - Tompkins $\ln \left[\frac{\alpha}{(1-\alpha)} \right] = c + kt$	60	0.96533	0.2588
	30	0.967	0.18281
Модифицирано уравнение на Prout – Tompkins $\ln \left[\frac{\alpha}{(1-\alpha)} \right] = \chi \ln k + \chi \ln t$	60	0.9992	0.0397
	50	0.99732	0.06919
	40	0.99488	0.09409
	30	0.99027	0.09983
Уравнение на активиране $\ln \alpha = \ln g + \chi \ln t$	60	0.9862	0.08322
	30	0.99081	0.08448
Експоненциално уравнение $\alpha = \frac{1}{a} \ln(v_0 a) + \frac{1}{a} \ln t$	60	0.99824	0.01344
	50	0.99316	0.02295
	40	0.99053	0.01957
	30	0.97347	0.01840
Топохимично уравнение на Avrami – Erofeev $\ln[-\ln(1-\alpha)] = \ln k + n \ln t$	60	0.99638	0.06046
	50	0.99514	0.07673
	40	0.99253	0.102
	30	0.99051	0.0913

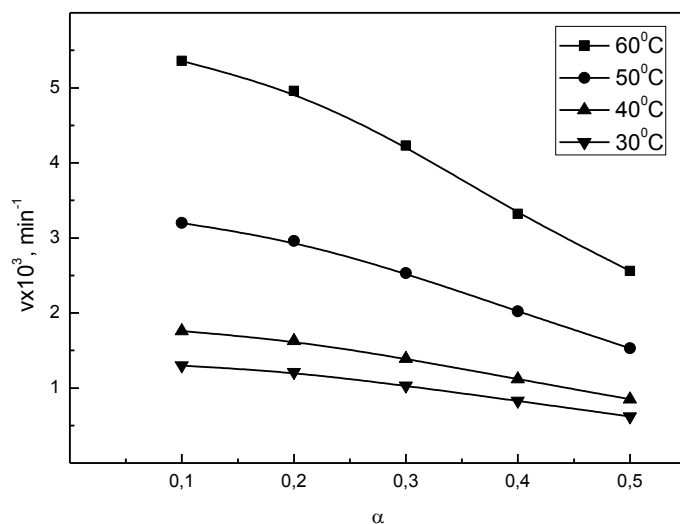
Реакцията продължава в интерфазата и нейната скорост зависи от размера и промените на контактната повърхност. Това определя зоните на продължение на реакцията и нейния топахимичен механизъм, което се дължи на специфичната

хетерогенна структура на субстратната матрица. Скоростната константа се увеличава с увеличението на температурата. Всички линии са паралелни, както може да се види на Фигура 9.



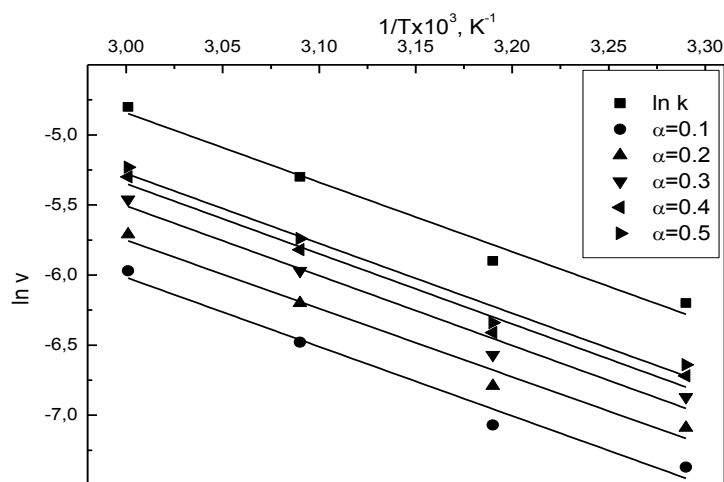
Фиг. 9: Линейно уравнение на Prout – Tompkins equatza различните температури

Скоростта на процеса е най-висока при стойности на $\alpha < 0.3$. Тогава тя намалява значително, вероятно заради инхибиращия ефект върху ензимната реакция на натрупания продукт (Фигура 10). Температурната зависимост от потока и началните стойности са проследени в съответствие с уравнението на Арениус.



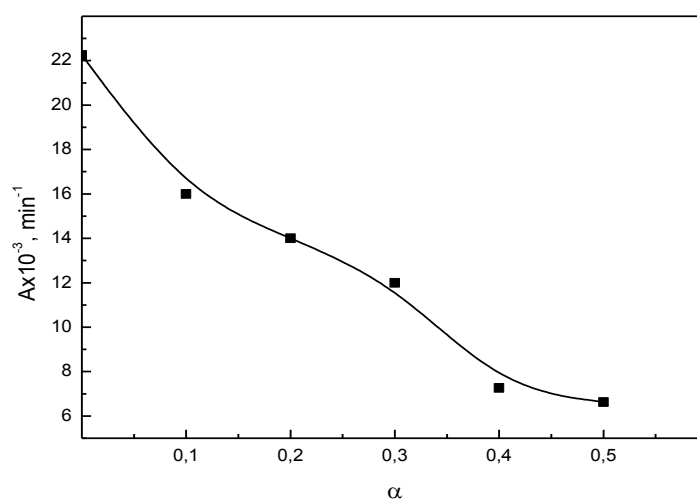
Фиг.10: Зависимост на скоростта v , min^{-1} като функция от α при различни температури

Активиращата енергия показва, че няма температурна зависимост, което се дължи на равенството на активиращата енергия при $\alpha \rightarrow 0$ ($E_0 = E = 41$ kJ/mol) и това, че активните центрове на субстрата не променят значително активността (Фигура 11).



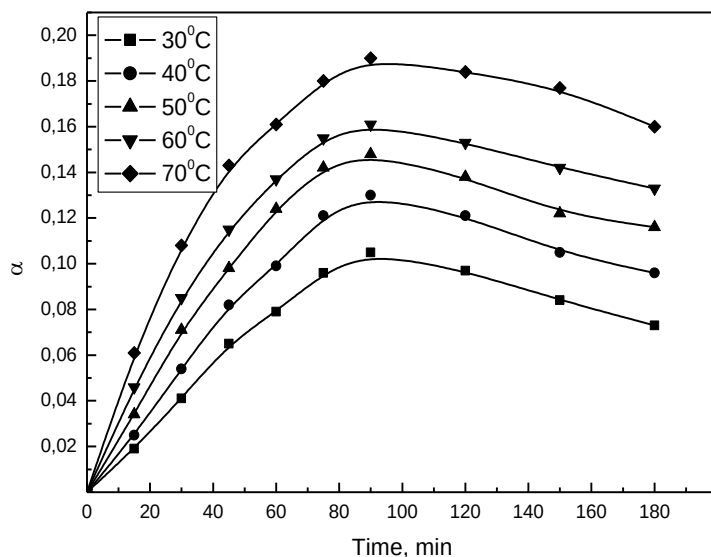
Фиг. 11: Арениусови зависимости на скоростта на процеса от температурата при различни стойности за α

Следващото отношение на A към α (Figure 12), преекспоненциалния факторо A може да бъде отнесен към димесиите и достъпността на реакционната област, което се образува на базата на комплексите растение-ензим и се променя по време на процеса. Намаляването на скоростта се дължи на инхибирането на ензима от получения продукт.



Фиг. 12: Зависимост на преекспоненциалния фактор A, min^{-1} от степента на процеса α

Поведението на степента α по време на инкубирането на имобилизираната β -амилаза показва подобни зависимости за свободния ензим (Фигура 13). Фактът, че присъства същия кинетичен механизъм, като на имобилизирания ензим, означава, че специфичната природа на процеса се определя от активността на β -амилазата (Таблица 6).



Фиг. 13: Кинетична крива на изследвания температурен процес

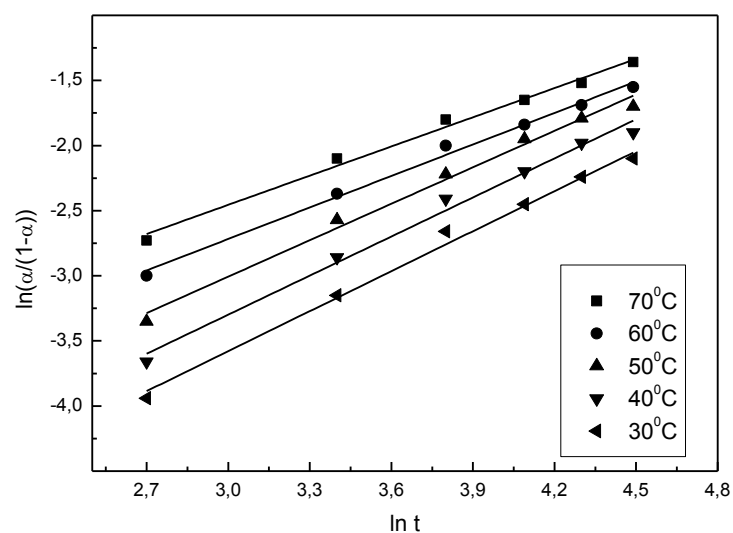
Таблица 6. Оценка на точността, представена чрез различни кинетични уравнения, описващи ензимния процес

Уравнение	T ⁰ C	R	SD
Уравнение на Prout - Tompkins	70	0,92589	0,20263
	30	0,93991	0,25919
$\ln\left[\frac{\alpha}{(1-\alpha)}\right] = c + kt$			
Модифицирано уравнение на Prout – Tompkins	70	0,99105	0,0716
	60	0,99252	0,0717
	50	0,99204	0,0859
	40	0,99481	0,07554
	30	0,99523	0,07405
$\ln\left[\frac{\alpha}{(1-\alpha)}\right] = \chi \ln k + \chi$			

Уравнение на активирание $\ln \alpha = \ln g + \chi \ln t$	70	0,98874	0,07112
	30	0,99418	0,07771
Експоненциално уравнение $\alpha = \frac{1}{a} \ln(v_0 a) + \frac{1}{a} \ln t$	70	0,99009	0,00532
	30	0,98974	0,00525
Топохимично уравнение на Avrami – Erofeev $\ln[-\ln(1-\alpha)] = \ln k + n$	70	0,9899	0,07146
	30	0,99473	0,07606

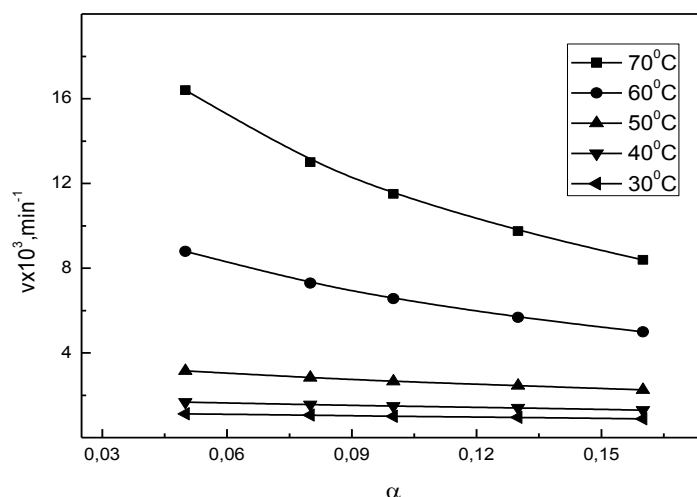
Скоростта на реакцията зависи от размера и промените в контактната повърхност.

Всички кинетични криви са линеаризирани в координати $\ln \frac{\alpha}{1-\alpha}$ vs (Фигура 14).



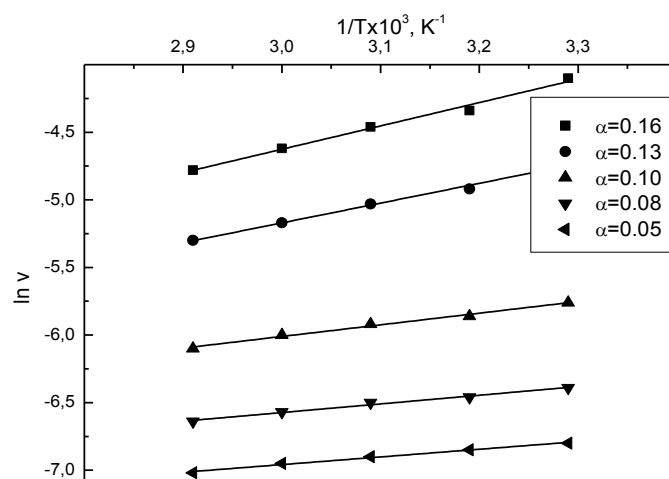
Фиг. 14: Линеаризация на уравнението на Prout – Tompkins за различните температури

Посочените скорости на ензимната реакция са получени при различни температури. Стойностите на α са представени на Фигура 15. Те показват, че скоростите намаляват по време на реакцията, като това е най-добре изразено при 60⁰С и 70⁰С, въпреки че, по-високите стойности на началните скорости са при тези температури.



Фиг.15: Зависимост на скоростта при различни температури

Зависимостта на скоростта от температурата на реакцията е представена на Фигура 16 съгласно уравнението на Арениус в координати $\ln v$ от $1/T \times 10^3, K^{-1}$.



Фигура 16: Температурна зависимост на скоростта на реакцията при различни стойности на α

Увеличението на стойностите на преекспоненциалния фактор се увеличава с увеличението на степените на процеса α . Промените в броя и достъпността на активните центрове на повърхността е главната причина за намаляването на скоростта на потока на процеса.

ИЗВОДИ:

Проведен беше скрийнинг върху различни активности, съдържащи се в широко разпространените средиземноморски растения *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium*.

1. Получените резултати доказват наличието на амилолитична и протеолитична активност, както и на ензимите *L*-аспарагиназа, полифенол оксидаза, тирозиназа и липаза във водни екстракти. Латексът не съдържа положителна липоксигеназна активност.
 - 1.1 Установено беше наличие на протеолитична активност и за двете растения по отношение действието на алкални и кисели протеинази.
 - 1.2 По отношение на коагулационната способност на млякото беше доказана такава ензимна активност предимно в извлеци от *Pergularia tomentosa*.
2. Амилолитичната активност беше демонстрирана в екстракти и от двете растения, и сравнени с такива екстракти от соя..
 - 2.1 Бяха установени рН оптимуми за *Pergularia tomentosa*, *Ecballium elaterium* и соя, съответно 6.0 и 7.0; 6.0 и 7.5; 6.0 и 6.5.
 - 2.2 Бяха установени температурни оптимуми за *Pergularia tomentosa*, *Ecballium elaterium* и соя, съответно 60, 65 и 65°C.
3. Поради възможността за приложение в хранителната индустрия на ензими с амилолитична активност беше имобилизирана изолираната β -амилаза, поотделно получена и от трите изследвани растения.
 - 3.1. Имобилизираният ензим показва висока оперативна стабилност до 5 изследвани цикъла на конверсия на нишесте.
 - 3.2. Получената относителна активност на β -амилаза, изолирана от трите растителни източници: *Pergularia tomentosa*, *Ecballium eleterium* и соя беше съответно: 17.97%, 17.01% и 14.94%.

4. Изследвана беше кинетиката на действие на β -амилаза от *Pergularia tomentosa* в свободно и имобилизирано състояние.

4.1. Доказана беше приложимостта на модифицираното топохимично уравнение на Prout-Tompkins за процеса на конверсия на нишесте.

4.2. Установено беше, че свободната и имобилизирана β -амилаза следват един и същи кинетичен модел.

Приноси:

1. Настоящата работа има значителен принос за използването на *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium* като източници на полезни ензими като β -амилаза, протеинази, липоксигеназа, L-аспарагиназа, полифенол оксидаза, тирозиназа и липаза.
2. Имобилизирания β -амилаза, екстрахирана от соя, показва добра възможност за многократно използване, което е необходимо при индустриалното им приложение, защото намаля количеството на използваните матрици за имобилизиране, запазвайки висока ензимната активност. Имобилизирания β -амилаза от екстракти от *Pergularia*, *Ecballium* и соя върху САВ+рАНрАА+ТВОТ-базираната матрица са с висока активност в неутралните рН области, което е необходима характеристика за втечняване на нишестето. Техните максимални активности бяха при високи температури, където разтворимостта на нишестето е по-добра, и където обикновено се намалява вискозитетът и установената стабилност на ензимите при високи температури и времето на дългия период на инкубиране е важно за подобряване на активността при мащабните производства.
3. Приложимостта на модифицираното топохимично уравнение на Prout-Tompkins за екстракта от *Pergularia tomentosa* с β -амилазна активност и за имобилизирания и за свободния ензим, представлява интерес за начина на приложение на това уравнение при кинетичните анализи и изучаване на механизма на реакциите.

References

- [1] Anson M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22, 79-89.
- [2] Arima K., Ya J. and Iwasaki S., 1970. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. *Lindt*. *Methods in Enzymol.*, Academic Press, New York, p 446-459.
- [3] Axelrod B., Cheeseborough T.M. and Laakso C., 1981. Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol.*, Academic Press, New York, p 441-451.
- [4] Barret P., 1976. Kinetica Heterogennih Processor, (eds Mir, Moskwa), p. 85-87.
- [5] Behbahani I., Miller S.A. and O'Keeffe D.H., 1993. A Comparison of Mushroom 478 Tyrosinase Dopachrome and Dopachrome Assays Using Diode-Array Spectrophotometry: Dopachrome Formation vs Ascorbate-Linked Dopachrome Reduction. *Microchemical Journal*, 47, 251-260.
- [6] Bernfeld P., 1955. Amylases α and β . in *methods in enzymology*, S.P. Colowick, N.O. Kaplan, eds.). Academic Press, New York, 1, p 149-158.
- [7] Brown M.E., Dollimore D. and Galwey A.K., 1983. Reaction in the Solid State, (eds Mir, Moskwa), p. 87-90.
- [8] Dhouib R., Laroche-Traineau J., Shaha R., Lapaillerie D., Solier E., Rules J., Pina M., Villeneuve P., Carriere F., Bonneau M. and Arondel V., 2011. Identification of a putative triacylglycerol lipase from papaya latex by functional proteomics. *FEBS Journal*, 278, 97-110.
- [9] Duckworth H.W. and Coleman J.E., 1970. Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 1613-1625.
- [10] Ertuğrul S., Dönmez G. and Takaç S., 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *J. Hazard. Mater.*, 149, 720-724.
- [11] Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- [12] López M.I., Sequeiros C., Natalucci C.L., Caffi N.O., Brullo A., Maras B., Barra D. and Caffini N.O., 2000. Purification and characterization of macrodonta I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodonta* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Protein. Expr. Purif.*, 18, 133-140.
- [13] Lowry O.H., Resenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1, 265-275.
- [14] Najafi M.F. and Deobagkar D., 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8, 197-203.
- [15] Pal A. and Khanum F., 2011. Covalent Immobilization of Xylanase on Glutaraldehyde Activated Alginate Beads Using Response Surface Methodology: Characterization of Immobilized Enzyme. *Process Biochemistry*, 46, 1315-1322.
- [16] Pérez-Gilbert M., Morte A., Honrubia M. and Garcia-Carmona F., 2001. Monophenolase activity of latent *Terfezia clavaryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiol. Plant.*, 133, 203-209.
- [17] Piacente S., Masullo M., De Nève N., Dewelle J., Hamed A., Kiss R. and Mijatovic T., 2009. Cardenolides From *Pergularia tomentosa* Display Cytotoxic Activity Resulting From Their Potent Inhibition Of Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Nat. Prod.*, 72, 1087-1091.

- [18] Pinho R.T., Beltramini L.M., Alves C.R., De-Simone S.G., 2009. Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of aspartyl proteases Experimental Parasitology 122, 128–133.
- [19] Prieto J.A., Bort B.R., Martinez J., Randez-Gil F., Buesa C. and Sanz P., 1995. Purification and characterization of a new α -amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. Biochem. Cell Biol., 73, 41-49.
- [20] Ren J., He F. and Zhang L., 2010. The construction and application of a new PPY-MSPQC for l-asparaginase activity assay. Sensors and Actuators. 145, 272-277.
- [21] Usha B. and Hemalatha K.P.J., 2015. Immobilization of Little Millet (*Panicum sumatrense*) α -amylase. International Journal of Science and Research, 4, 150-154.
- [22] Vogel F. S., Kemper L.A., Jeffs P.W., Cass M.W. and Graham D.G., 1977. γ -L-Glutaminyl- 4-hydroxybenzene, an inducer of cryptobiosis in *Agaricus bisporus* and a source of specific metabolic inhibitors for melanogenic cells. Cancer Res., 37, 1133-1136.
- [23] Yotova L., Ivanov I., 2000. Kinetic studies and analytical application of cholesterol oxidase and peroxidase immobilized to synthetic polymer, in Applied Biochemistry and Biotechnology, 83, 141-151.
- [24] Young D., 1969. In Decomposition of Solids, eds Mir, Moskwa, p. 63-67.

Списък с публикациите по дисертационния труд

I. LAHMAR, D. MANOVA, L. YOTOVA, 2014. Enzymes screening from crude extract from crude extract of *Pergularia tomentosa* L. Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski", 100 (4), 184-190.

Lahmar Imen, Lubov Yotova, 2016. Investigation of different enzyme activities from *Pergularia tomentosa* L. and *Ecballium elaterium* L. Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 51 (3), 263-270.

Участия в научни семинари и конференции

The 11th Scientific Poster Session for young scientists, PhD and full-time students on May 22, 2014.

The first national conference in Biotechnology on October 17 and 18, 2014.

The 13th Scientific Poster Session for young scientists, PhD and full-time students on May 20, 2016.