



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО

КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

инж. Лъчезар Стефанов Мановски

ТЕМА

**ИЗОЛИРАНЕ И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЛИПОКСИГЕНАЗА ОТ АВОКАДО
(PERSEA AMERICANA MILL.)**

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, химия на
природните и физиологично активните вещества)

Научен ръководител:

(доц. д-р инж. Иво Лалов)

(Проф. д-р инж. Любов Йотова†)

Научно жури:

доц. д-р инж. Николай Калоянов – председател, рецензент

Проф. дбн инж. Милка Кръстева - рецензент

доц. д-р инж. Иво Лалов

доц. д-р инж. Иван Димитров

доц. д-р инж. Мая Георгиева, дф

София, 2019

Дисертационният труд е написан на 94 страници, съдържа 59 фигури и 3 таблици. Цитирани са 118 литературни източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на катедрен съвет на научното звено на катедра „Биотехнология”, състояло се на 19.02.2019г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 27.06.2019 от 14.00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

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

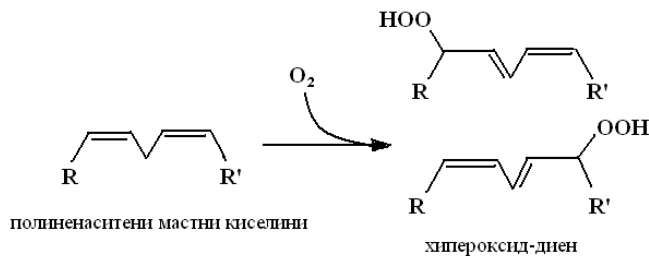
Въведение

Оксидоредуктазите са клас ензими, които катализират окислително-редукционни процеси [1]. Те катализират преноса на електрони от една молекула (окислител) към друга молекула (редуктор). Оксидоредуктазите катализират реакции от сходен тип, както следва $A + B \rightarrow A + B^-$, където А е окислителят, а В е редукторът в реакцията.

Липоксигеназите (LOX) принадлежат към семейството на хетерогенните пероксидазни ензими, които използват молекулен кислород за диоксигениране на липиди и участват в биосинтеза на медиатори на възпалението (левкотриени).

Според региоселективността, липоксигеназите се разделят на 5 -, 8 -, 12 -, и 15-липоксигеназа. Те вмъкват кислороден атом съответно при C⁵, C⁸, C¹² или C¹⁵ в молекулата на арахидоновата киселина, образувайки 5S-, -8S, 12S- или 15S-хидропероксиейкозатетраенова киселина (5 -, 8 -, 12 - или 15 - HPETE). HPETEs могат да бъдат модифицирани допълнително с глутатион пероксидаза до хидрокси форми (5 -, 8 -, 12 -, 15-НЕТЕ). 5-липоксигената е диоксигеназа, която катализира включването на молекулен кислород в арахидонова киселина (оксигеназна активност), като продукт се получава HPETE, а след това се образува нестабилен LTA₄ - епоксид (LTA₄ - синтаза).

Това е последвано от добавянето на молекулен кислород в позиция C⁵, превръщане на LTA₄ в 5S-хидрокси-6-транс-8,11,14-цис-ейкозатетраенова киселина (5-НЕТЕ) или левкотриен. Синтетичните аналози, инхибитори на 5-LOX се прилагат за лечение на ракови заболявания при човека.



Фиг. 1. Общ вид на реакция, катализирана от липоксигеназа

Цели и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е да бъде изолирана, пречистена, охарактеризирана и имобилизирана върху носители с подходящи технологични характеристики липоксигеназа от авокадо, като едновременно с това бъдат изследвани възможностите за установяване на неизвестни инхибитори на ензима с потенциал на бъдещи лекарствени средства.

За изпълнение на поставената цел бяха формулирани следните **задачи**:

1. Да бъде формулирана и реализирана подходяща, базирана на съвременни методи, процедура за изолиране и пречистване на липоксигеназа от авокадо.
2. Пречистеният ензимен препарат да бъде охарактеризиран, по отношение на молекулна маса на ензима, рН и температурен оптимуми; да бъдат определени активността на ензимния препарат и кинетичните параметри на катализираната от него реакция.
3. Да се изследва характера на въздействието на потенциални инхибиторни съединения, върху реакцията катализирана от ензима липоксигеназа от авокадо, в присъствие на субстрат – линоленова киселина.
4. Да бъде осъществена имобилизация на ензима към носители с подходящи технологични характеристики, както и охарактеризиране на новополучената система ензим-носител.
5. Да бъдат проучени нови възможности и подходи за определяне на ензимната активност, позволяващи осъществяването на кинетични изследвания и в същото време освободени от ограниченията присъщи на стандартния спектрофотометричен метод.

Резултати

1.1. Изолиране на липоксигеназа от авокадо

Отстраняват се кората и костилката от 6 броя плод на авокадото (около 1kg) и се нарязват на ситно. Нарязаните плодове се подлагат на обезмасляване по следните стъпки:

- Авокадото се обезмаслява с ацетон при непрекъснато разбъркване за 2 часа и процедурата се повтаря след филтрация, и се използва чист разтворител;
- Обезмасленото авокадо (ацетонов прах) се подлага на екстракция с вода (обемното съотношение на вода: авокадо е 10:1) при непрекъснато разбъркване на клатчка на стайна температура за 1 час;
- Екстрактът (1500ml) се избистря чрез центрофугиране за 15min. при 3500 об/мин.;
- рН на чистия екстракт се довежда до 4.5 с 1M HCl и утайката се изхвърля.
Бистрата фракция се обработва с NaOH (2M) до рН 8 и се оставя да престои 12 часа при температура 4 °C с цел утаяване на растителните соли;
- След центрофугиране за 15 минути при 3500 об/мин утайката се отделя, супернатантът се насища с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до крайна концентрация 40 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ за 100 ml разтвор и активната фракция се утаява;
- Последната се разтваря отново в малко количество (около 15-20ml) дестилирана вода и се нагрява до 63°C за 5 минути, за да коагулират албумините;
- Утайката се отделя при центрофугиране (3500rpm, 15 min), а супернатантът се насища отново с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, като се запазва фракцията между 35% и 50% насищане;

1.2. Пречистване на липоксигеназа от авокадо

- Ензимът беше пречистен чрез фракционно утаяване, ултрацентрофугиране с помощта на центрофужни епруветки Sartorius Vivaspin 6 с големина на порите 50kDa за 20 мин при 4500 об/мин и пропуснат през афинитетна колона.
- Пречистване на ензима чрез елуирането му през афинитетна колона: като неподвижна фаза за афинитетната хроматография беше използвана линолеиламинохексил агароза. Материалът беше приготвен от линолова

киселина, свързана към ω -аминохексил агароза чрез карбодиимидния метод. Беше използван десеткратен излишък на киселина, отнесен към свободните amino-групи на аминохексил агарозата (5mg/ml). Като разтворител беше използван 50% етанол. Реакцията беше оставена да протича за 3 дни при стайна температура, pH 4,5 и 0,1M EDC при непрекъснато разклащане на клатачка Heidolphi Promax 2020. Бяха приготвени 10ml линолеиламиноетил агароза. След завършване на реакцията материалът беше промит последователно с:

- 100 ml NH_4OH ;
- 100 ml 80% Метанол/ H_2O (v/v);
- 100 ml NH_4OH ;
- 100 ml 80% Метанол/ H_2O (v/v);
- 100 ml NH_4OH ;
- 500 ml H_2O ;
- след това материалът беше обезвъздушен под N_2 и пакетиран в 1x25 стъклена колона за афинитетна хроматография. Езимът беше елуиран с 5mM ацетатен буфер pH5 с помощта на нарастващ NaCl градиент (0-200mM). За уравновесяване на колоната беше използван същият буфер. Преди да бъде пропуснат през колоната всеки рътвор беше обезвъздушаван под N_2 . Бяха събрани фракции от 1ml, на които беше изследвано белтъчното съдържание и активността в присъствие на 0,2mM линолова киселина, съответно при 280 и 234nm.

1.3. Определяне на белтъчно съдържание

- За определяне на белтъчното съдържание на свободния ензим беше използван BCA методът [69]. Използван беше Microplate Kit Assay на ThermoScientific.

За изследване на белтъчното съдържание се построява стандартна права, като изходен разтвор се използва 2mg/ml говежди серумен албумин (BSA – bovine serum albumin, (съдържа се в Microplate Kit Assay на ThermoScientific) с различни концентрации в обхвата на метода (125-2000 $\mu\text{g/ml}$).

Работния реагент се смесва в съотношение реагент А : реагент В = 49:1. В плаки се отпипетирват 150 μl от работния реагент и 150 μl от всяка

проба (стандарт BSA и проба с неизвестно белтъчно съдържание), подходящо разредена с буфер (използван е 5mM фосфатен буфер с pH 6,5). Работния реагент трябва да бъде приготвен непосредствено преди процедурата. Обемът на плаките, използвани за тази процедура е 320µl.

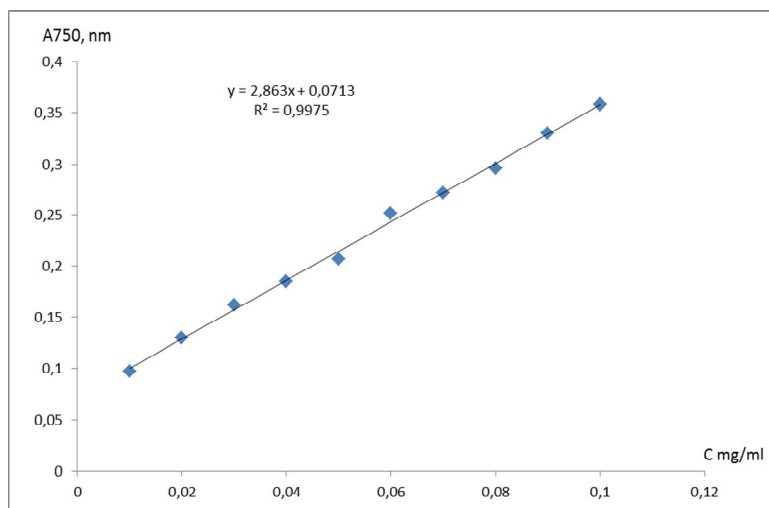
След смесването на работния реагент с пробите, плаките се покриват с фолио, разбъркват се за 30сек. и се инкубират на 37°C за 2 часа в термостат CAT SH-26.

След това се изчаква пробите да се охладят до стайна температура, отстранява се фолиото и се измерва абсорбцията при $\lambda=562\text{nm}$. За целта е използван UV- спектрофотометър µQuant: Biotek instruments inc.

- За определяне на белтъчното съдържание на свободният ензим беше използван методът на Лоури, а за имобилизирания ензим беше използвана модифицирана версия на метод на Лоури. Белтъчното съдържание бе изчислено с помощта на стандартна права, приготвена с BSA (Фиг. 2).

Определянето се основава на получаването на синьо оцветен продукт, както в резултат на реакцията на белтъка с Cu^{2+} в алкална среда (Биуретов метод), така и от реакцията на фосфомолибдодволфрамата до хетерополимолибденово синьо, от присъстващите в белтъците ароматни аминокиселини (тирозин и триптофан).

Методът е с висока чувствителност, позволява определянето на белтък в диапазона 0,005-0,1 mg.



Фиг. 2. Стандартна права за определяне на белтъчно съдържание

Модифициран метод на Лоури

- Разтвор А: 2% NaCO₃ в NaOH
- Разтвор Б: 1% CuSO₄·5H₂O
- Разтвор В: 2% Na-тартарат
- Разтвор Г: 0,5ml Б + 0,5ml В + 50ml А

Контрола: 100mg матрица без ензим, 5ml Г, разбъркване на магнитна бъркалка за 2,5 часа, отпипетирване на 0,5ml реагент на Folin-Ciocalteu и разбъркване на магнитна бъркалка за 40 минути.

Проба: 100mg матрица с ензим, 5ml Г, разбъркване на магнитна бъркалка за 2,5 часа, отпипетирване на 0,5ml реагент на Folin-Ciocalteu и разбъркване на магнитна бъркалка за 40 минути.

Абсорбцията на разтворите се измерва спектрофотометрично при 750nm.

1.4. Определяне на ензимна активност

Ензимната активност има следната дефиниция: за единица активност се приема, образуването на 1 μM продукт за 1 минута.

$$U/mg = \frac{\Delta A / \min \times \epsilon}{a}, \text{ където:}$$

$\Delta A / \min$ – изменение на абсорбцията за минута;

ϵ – моларен екстинкционен коефициент;

a – белтъчно съдържание внесено в реакционната смес (mg);

За определянето на активността и кинетичните параметри на свободната липоксигеназа, изолирана от авокадо, се използва 0,1M ацетатен буфер с pH 6,5.

Приготвя се изходен разтвор на субстрата 4mM линоленова киселина, като за целта киселината се разтваря в 60ml 96% етанол и се разбърква в продължение на 1 час. След това обема се довежда до 100ml с дестилирана вода. От изходния разтвор на субстрата, непосредствено преди реакцията, се приготвят разтвори с различни концентрации. Разтворите се разреждат с буфер.

За измерването на абсорбцията при 234nm се използват кювети и UV-спектрофотометър Shimadzu UV1280. В кювети се отпипетирват 0,3 ml буфер, 0,1 ml ензимен разтвор и 2,1 ml разтвор на субстрат с различна концентрация. В контролната проба се отпипетирват същите количества, като вместо ензим се отпипетирват още 0,1 ml буфер.

За измерването на абсорбцията при 234nm се използват плаки и UV-спектрофотометър µQuant Biotech instruments inc. В плаките се отпипетирват 166,7µl буфер, 16,6µl ензимен разтвор и 16,6µl разтвор на субстрат с различна концентрация.

В контролната проба се отпипетирват същите количества, като вместо ензим се отпипетирват още 16,6µl буфер.

1.5. Кинетика на инхибиране

За спектрофотометричното определение на пробите се използва UV/VIS Spectrophotometer Perkin Elmer, които е настроен да измерва в UV областта с дължина на вълната $\lambda=234$ nm. Приготвените разтвори на избраните инхибитори са съпоставени с естественият субстрат за липоксигеназата – линоленовата киселина. Измерването се извършва като в кюветите се внасят еднакви количества от инхибитора и субстрата, добавя се 1 ml от Ацетаният буфер с концентрация 0,1 M и pH=6,5 във всяка от кюветите. В едната от кюветите се внасят 100 µL буфер - контролна, а в другата - 100 µL 10 пъти разреден разтвор на ензима (ензим:буфер = 100 µL:900 ml Ацетатен буфер).

Реакцията се извършва като предварително се инкубират 0,8 ml предварително разреден разтвор от инхибитора, 0,1 ml предварително разреден разтвор от субстрата, и 0,3 ml разтвор на ензима. Кинетиката се следи на UV – спектрофотометър (при 234 nm) през 1 минута, в продължение на 10 минути.

1.6. Имобилизирание на ензима

Липоксигеназата беше имобилизирана чрез адсорбция към два съполимера **TMOS,CAB,PAMAM**, **MTES,CAP,PAMAM**.

Процедура за имобилизиране на ензима: имобилизацията беше проведена с разтвор на липоксигеназа с белтъчно съдържание 0,2272 mg/ml в ацетатен буфер с pH 6,5 и $t = 4^{\circ}\text{C}$. След завършване на процедурата гранулите на носителя бяха промити многократно на бюхнерова фуния с дестилирана вода и 1M NaCl до отсъствие на абсорбция при $\lambda=280\text{nm}$.

Имобилизирание на липоксигеназа върху TMOS,CAB,PAMAM и MTES,CAP,PAMAM:

5ml от пречистения ензим с белтъчно съдържание 0,2272 mg/ml се имобилизират чрез метода на адсорбцията върху 100mg съответно от **TMOS,CAB,PAMAM** и

MTES, CAP, PAMAM мембраните в 25ml 0,1M ацетатен буфер с pH6,5 за 24 часа при температура 4°C и непрекъснато разбъркване.

- Изследвания с атомно силов микроскоп (AFM)

Атомно-силовата микроскопия (AFM) е съвременен и широко приложим в полето на нанотехнологиите метод за изследване на повърхностната структура и топография на различни проби, осигуряващ постигане на висока прецизност и разделителна способност в нанометричната скала. Това обаче, което прави AFM уникален, е, че с него, освен че се получават изображения, разкриващи подредбата и структурата на разнообразни молекулни архитектури, микроскопът успява да „улови“ участието на жизненоважни биомолекули при процеси, протичащи в тяхната естествена среда. Атомно-силов микроскоп е микроскоп с висока разделителна способност, основан на взаимодействието на сонда (тънко острие) с повърхността на изследвания образец. Това взаимодействие се изразява в привличане или отблъскване на сондата от повърхността, дължащо се на силите на Ван дер Ваалс. Чрез използването на специални остриета могат да бъдат изучавани електрическите и магнитните свойства на повърхностите. За разлика от сканиращия тунелен микроскоп, с помощта на AFM могат да се изследват както проводящи, така и непроводящи повърхности.

Принципът на AFM много напомня този на грамофона, но с множество модификации, елементи и компютърно управление, които позволяват микроскопът да постига висока прецизност при измерванията в нанометричната скала. Някои от тези „нови“ AFM елементи включват специално модифицирани AFM остриета, гъвкави микроконзоли, високочувствителен сензор, отчитащ нанометрични деформации, висока резолюция на електронното управление и на позициониране на AFM острието и т. н.

Метод за изследване на матриците с помощта на AFM: атомно-силовият микроскоп се настройва в динамичен (безконтактен) режим. Ниво на шум - 0,5 nm, латерална разделителна способност – 2,5 nm, вертикална разделителна способност – 500 nm, диапазон на сканиране по X и Y - 48 nm, 8 nm по Z.

Образецът от полимерната матрица с размери 5 на 5 mm се поставя върху равна метална повърхност. Така подготвената проба се захваща на предметната масичка на микроскопа. Острието се закрепва към държача и се инициира процеса на изследване на топографията на матрицата.

- 10 ml 0,1M ацетатен буфер с $\text{pH} = 6,5$
- 2 ml разтвор на линоленова киселина с концентрации в диапазона 1-4 mM
- 100 mg матрица с имобилизирана липоксигеназа

Измерванията се извършват, като субстратният разтвор се смесва с буфера и електрода на апарата престоява 5 минути в сместа при непрекъснато разбъркване. След това се прибавят матриците и показанията на апарата се отчитат на всяка минута в продължение на 10 минути

1.8. Кондуктометрия



Фиг. 4. Кондуктометър (WTW InoLab Cond Level 2)

Изисква се разтворите да имат ниска проводимост и адекватна буферна сила, за тази цел се използват само буфери, които поддържат 0-1 нетни единици заряд в техния буферен обхват, и които се срещат като свободни киселини или основи. Това включва целия обхват от „добри“ буфери, мастни киселини и основни/алкални буфери: Трис, имидазол, етаноламин и 2-амино-2метил-пропан-1,3-диол.

В техния буферен обхват буферите са или положително заредени (например Трис, имидазол), или отрицателно заредени (например „Добри“ буфери). Положително заредените буфери увеличават проводимостта си при реакция с протон, докато отрицателно заредените буфери намаляват проводимостта си. Това не се определя от катионната или анионната природа на йонизиращата се група. Буфер с правилен нетен заряд трябва да се използва за да усили промяната на проводимостта, появяваща се при

реакция, а това означава, че положително заредените буфери за естеразни реакции, а отрицателно заредените за деаминазни реакции.

Измерване на електрическата проводимост в присъствие на липоксигеназа от авокадо:

- 0,2 ml 0,1M ацетатен буфер с рН = 6,5
- 4,2 ml разтвор на линоленова киселина с концентрации в диапазона 1-4 mM
- 0,6 ml ензимен разтвор с концентрация 20µg/ml

Измерванията се извършват, като субстратният разтвор се смесва с буфера. След това се прибавя ензимният разтвор и показанията на аппарата се отчитат на всяка минута в продължение на 10 минути.

Изменението на проводимостта, беше измерено на апарат: WTW InoLab Cond Level 2 с клетка TetraCon325 - температурен диапазон 23-25°C, обхват 0 – 1999 µS/cm, константа на клетката 0,98 cm⁻¹.

1.9. Изолиране и пречистване на липоксигеназа от авокадо

Предвид на резултатите на осъществения от нас литературен обзор, ние съставихме схема за изолиране и пречистване на липоксигеназа от авокадо, описана подробно в раздел Материали и методи, включваща отделните етапи: обезмасляване и екстракция, утаяване, ултрацентрифугиране, афинитетна хроматография.

Резултатите от процеса на изолиране и пречистване на ензима са обобщени в таблица 2. Процедурата на афинитетно пречистване е представена на фигура 30. Както личи от данните посочени в таблица 1, парадоксално общият добив получен след утаяването, който е изчислен като функция от общата ензимна активност на суровият екстракт, надвишаваше 200%. Подобно парадоксално наблюдение, може да бъде обяснено единствено посредством хипотезата за елимиране на потенциални инхибитори на липоксигеназата, в хода на този етап на пречистване. Както може да бъде установено от литературата, някои нискомолекулни съединения, по специално фенолни съединения като епикатехина са установени като инхибитори на липоксигеназата. Фенолните съединения, обикновено са свързани с протеините посредством водородни връзки, хидрофобни или йонни взаимодействия, което затруднява тяхното елиминиране от суровите екстракти. Добре известно е, че фенолни

съединения в значителни количества са открити в авокадото. Вследствие на присъствието на подобен тип ендегенни инхибитори, данните за общата активност на суровия екстракт са ненормално занижени, поради което при оценка на ефекта на пречистване използвахме и втори подход, при който като база оценка на ефекта на отделните етапи на пречистване използвахме не суровият екстракт, а разтворът получен след премахването на инхибиращите вещества. По този начин можем да твърдим, че при последващите два етапа ултрацентрифугиране и афинитетна хроматография постигнахме 4 – кратно и 2 - кратно пречистване. Успоредно с това добивът представляваше съответно 53 % след ултрафилтрацията и се понижи до 23,9 % след процеса на афинитетна хроматография. Подобно рязко понижение на добива в две стъпки, макар да беше допустимо за целите на нашето лабораторно пречистване, е възможно процесът да бъде оптимизиран. Така пречистеният след афинитетната хроматография продукт беше охарактеризиран с помощта на различни методи.



Фиг. 5. Афинитетна хроматография на липоксигеназа, изолирана от авокадо. Абсорбцията в присъствие на 0,2mM линолова киселина беше измерена спектрофотометрично при 234nm, за определяне съответно на активността. Абсорбцията при $\lambda=280\text{nm}$ беше използвана за определяне на наличието на белтъчно вещество в пробите.

Таблица 2. Изолирането и пречистването на липоксигеназа от авокадо

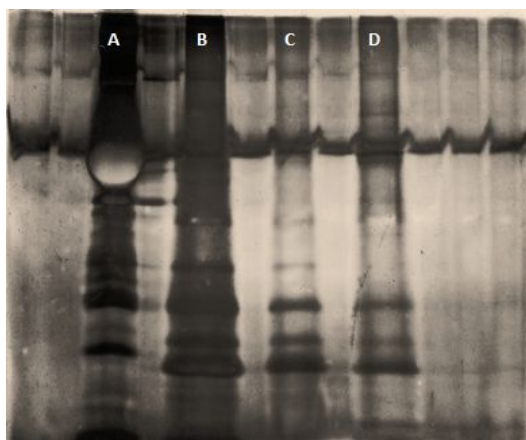
<i>Етап на получаване</i>	<i>Общ обем на разтвора, ml</i>	<i>Белт. съдържа ние, mg/ml</i>	<i>Активн ост, U/ml</i>	<i>Обща активност , U/общ обем</i>	<i>Специфична активност, $\mu\text{mol/min/mg}$</i>	<i>Добив*, %</i>	<i>Степен на пречиства не *</i>
<i>Обезмасляване и екстракция</i>	1500	0,5732	0,0034	5,1	0,006	100	-
<i>Утаяване</i>	800	0,3242	0,0162	13,0	0,050	254,9 (100)	8,3 (1)
<i>Ултрацентрифугиране</i>	300	0,2272	0,0230	6,9	0,100	135 (53,1)	17 (2)
<i>Афинитетна хроматография</i>	100	0,1532	0,0310	3,1	0,202	60,1 (23,9)	34 (4,04)

* - в скоби са посочени стойностите за добива и степента на пречистване, изчислени по отношение на освободения от инхибиращи компоненти ензимен разтвор, получен след фракциониране с амониев сулфат.

1.10. Охарактеризиране на пречистена липоксигеназа от авокадо

- *Определяне на молекулната маса на ензима*

Пречистеният от нас ензим беше изследван електрофоретично, както да бъде проверена неговата чистота, така и да се определи неговата приблизителна молекулна маса. За целта беше използван белтък с предварително определена маса и беше построена калибрационна права позволяваща определянето на молекулната маса, представена на фиг. 7. Резултатите от електрофоретичните изследвания са показани на фиг. 6 и фиг. 7.

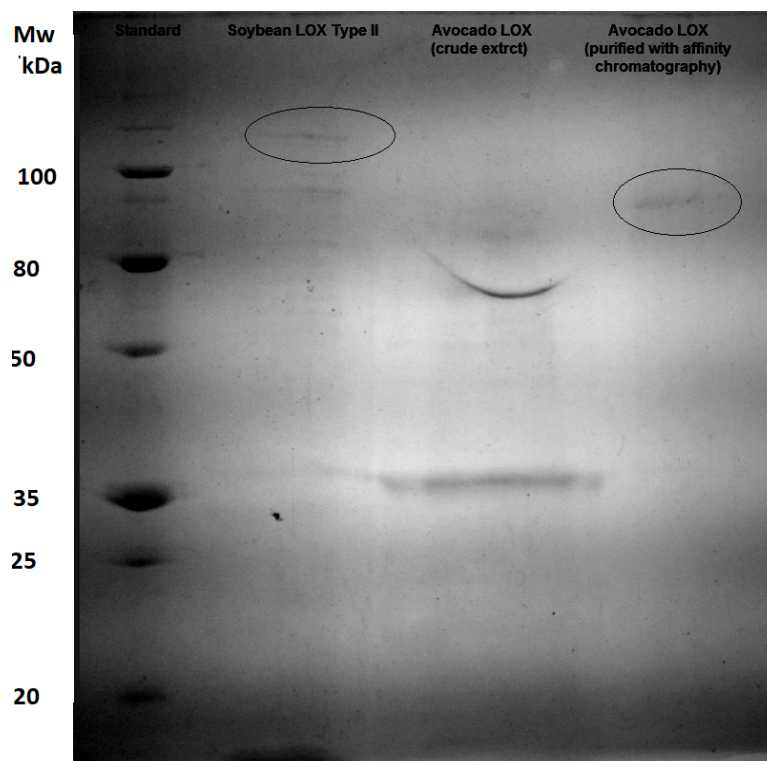


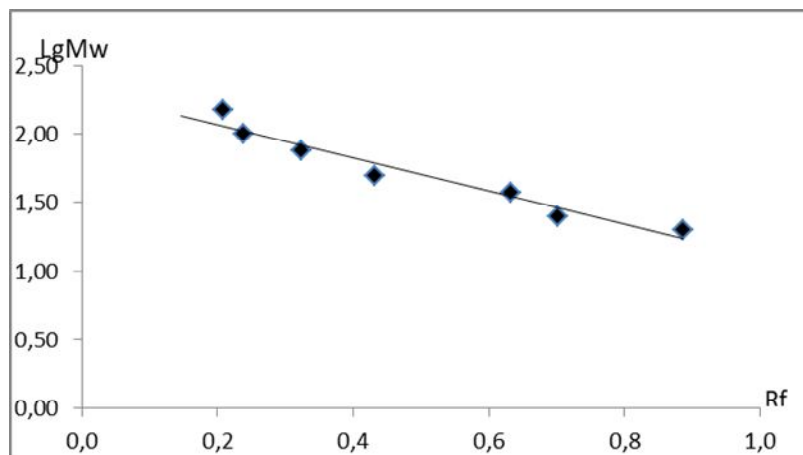
Фиг. 6. Електрофореза, оцветена чрез метода със сребърен нитрат, на различните фракции от пречистването чрез афинитетна хроматография. А - стандарт – говежди серумен албумин; В – фракция 4, елуирана при пречистването чрез афинитетна

хроматография; C – фракция 12, елуирана при пречистването чрез афинитетна хроматография; D – фракция 14, елуирана при пречистването чрез афинитетна хроматография. При фракция 14 се наблюдава наличието на белтък с молекулна маса над 66 kDa (сравнение с говежди серумен албумин). За по-точно определяне на молекулната маса разтворът беше концентриран и беше проведена електрофореза със стандарт от 10 – 250 kDa.

SDS-PAGE – полиакриламидната електрофореза беше използвана за фракционно анализиране на белтъчните разтвори по метода на Laemmli. Бяха използвани 4.44% концентриращ гел и 12% разделящ гел.

За оцветяването на геловите със сребърен нитрат и Coomassie brilliant blue бяха използвани стандартни процедури.





Фиг. 7. Стандартна права за определяне молекулната маса на липоксигеназа изолирана от авокадо

Масата на липоксигеназата, изчислена от кривата е 104 kDa.

- *Определяне на рН оптимум на свободния ензим*

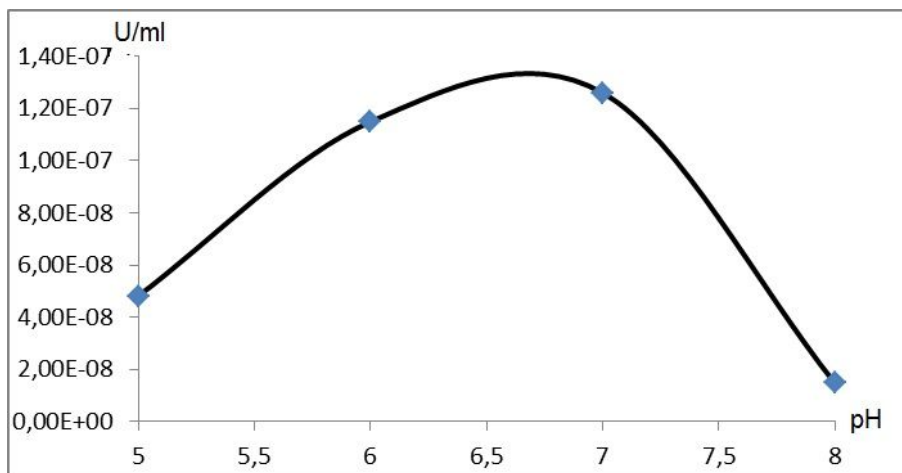
Влиянието на рН на реакционната среда, върху каталитичния капацитет на ензима се дължи на настъпилите промени в третичната структура на белтъчната молекула, свързани с преразпределение на електрическите заряди върху нейната повърхност, както и с настъпили промени в геометрията на адсорбционния участък. Освен изменение на йонизацията на полярните групи на ензима, настъпват промени и в йонизацията на функционалните групи на субстрата. Изменението на ензимната активност в зависимост от величината на рН на средата графически се изразява с крива, имаща форма на камбана.

рН оптимумът на изолираната от нас липоксигеназа беше изследван в диапазона от 5 до 8, в присъствие на субстрат линоленова киселина. Като резултатите от въздействието на рН на средата върху ензимната активност са демонстрирани на фиг. 8.

Установихме, че рН оптимума е около 6,5, което съвпада с естественото рН на плода от авокадо, от който е изолирана липоксигеназата.

В нашият случайт на ензимът прояви сравнително висока толерантност към рН в средата, като ензимна активност беше детектирана и при рН 5 и дори в по-малка степен при рН 8. Ензимът се дезактивира едва при стойности надвишаващи рН 8. В литературата се срещат и описания за липоксигеназа

изолирана от авокадо, които се отличават с доста тесен рН диапазон на активност (рН=5,0 – 8,0).

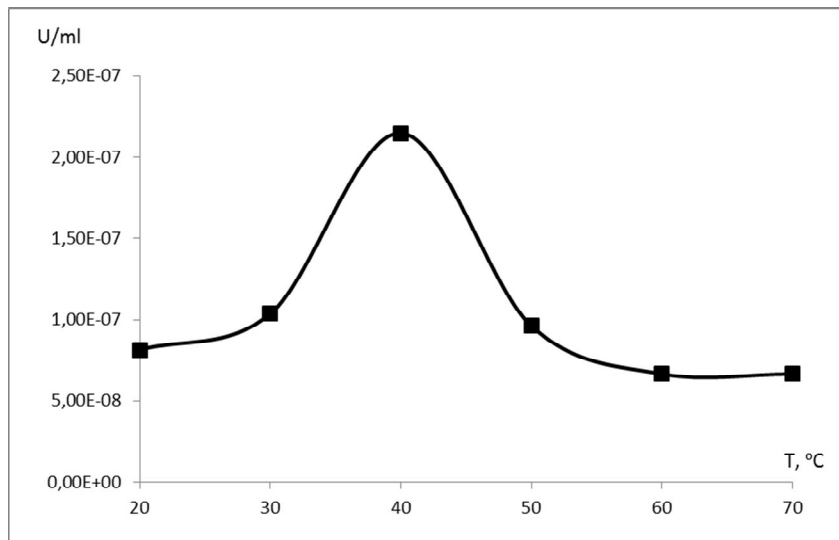


Фиг. 8. pH оптимум на липоксигеназа изолирана от авокадо.

- *Определяне на температурен оптимум на свободния ензим*

Температурният профил на действие на ензима има характерна форма, наподобяваща несиметрична камбана. С повишаване на температурата ензимната активност равномерно нараства, до достигане на определена максимална стойност, след което тя рязко пада, т.е. кривата отразява влиянието, както на топлинното активиране, така и на топлинното инактивиране.

Температурният оптимум на пречистеният ензим беше установен, като изследванията обхващат диапазона 20°C – 70°C. Установихме, че температурният оптимум на ензима е 40°C. Ензимната активност намаляваше чувствително, както при понижение на температурата до 30°C, така и при повишение до 50°C, след което извън тези граници, зависимостта на активността от температурата има по плавен характер.



Фиг. 9. Температурен оптимум на липоксигеназа изолирана от авокадо.

Наблюдаваният от нас температурен оптимум е потвърден в изследванията на различни автори, както за липоксигеназа от авокадо, така и за липоксигеназа от други източници. Куо и сътрудници докладват за температурен оптимум от 40°C на липоксигеназа изолирана от бананови листа, докато Daglia и сътрудници декларираят оптимум от 38,5°C. Установеният от нас температурен оптимум се потвърждава и в изследванията на Daniel A. Jacobo-Velázquez и сътрудници. От друга страна Kuribayashi и сътрудници докладват за значително по-нисък оптимум (25°C) за липоксигеназа изолирана от кладница (*Pleurotus ostreatus*). Може да се каже, че температурните оптимуми, докладвани в литературата, сравнително добре съвпадат с температурите, при които съответният източник расте. Доколкото авокадото расте в тропични и полутропични климатични условия, с висока влажност и температура е логично да се очаква, че температурният оптимум на липоксигеназата изолирана от този източник ще е между 30°C и 40°C, както е и установено в настоящото изследване.

Сравнително високият температурен оптимум оправдава използването на кратковременната високотемпературна обработка за премахването на по-лабилните белтъци.

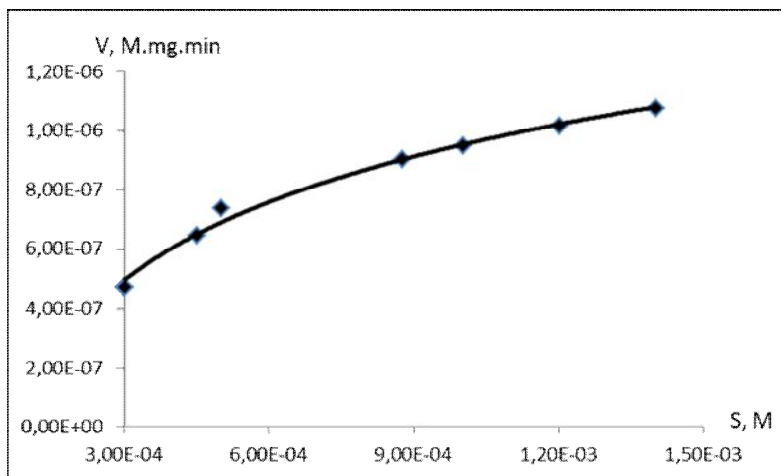
- Изследване на кинетичните параметри на изолирания ензим

Кинетичните параметри на изследвания ензим бяха определени посредством проследяване на кинетиката на трансформация на различни концентрации на субстрат – линоленова киселина. Общия вид на кинетичната крива при субстратна концентрация

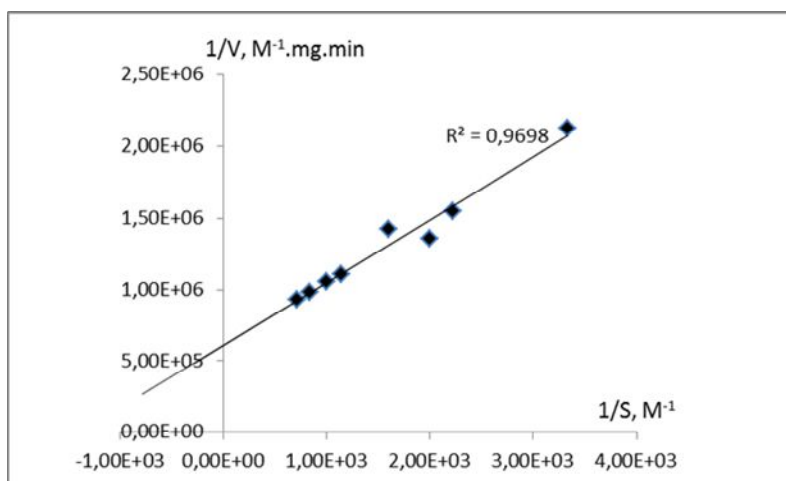
(0,25mM) е представен на фиг. 10. Стойностите на двата параметъра характерни за кинетиката на Михаелис-Ментен, съответно K_m и V_{max} бяха изчислени с помощта на метода за линеализиране в координатите на Лайнуивър-Бърк. Резултатите от тази трансформация са представени на фиг. 48. от уравнението на правата могат да се изчислят стойности: $K_m 7,22 \cdot 10^{-4}$ M и $V_{max} 1,64 \cdot 10^{-6}$.

Коефициента на корелация получен при линеализирането по метода на Лайнуивър-Бърк беше висок (0,9698), което показва, че този метод на линеализация е подходящ за интерпретация на експерименталните резултати.

Авторите в различни изследвания, съобщават за различни стойности на K_m , характерни за липоксигеназата изолирана от авокадо, когато като субстрат е използвана линоленовата киселина. Докладвали са стойност за $K_m = 2,1 \cdot 10^{-4}$ M, като са използвали същият тип линеализация на Лайнуивър – Бърк. Докато Marcus и сътрудници докладва значително по-ниската стойност от $0,72 \cdot 10^{-4}$ M. Подобни различия могат да се дължат, както на различия в конкретния сорт на изходния материал, така и на използваната в различните случаи методика на пречистване, както и условията използвани за конкретният ензимен анализ.



Фиг. 10. На фиг. 47 е представен графичният израз на уравнението на Михаелис-Ментен, при субстратна концентрация 3mM на линоленовата киселина, за определяне на липоксигеназна активност на свободения ензим след пречистване с афинитетна хроматография. Активността като стойност е посочена в таблица 2.



Фиг. 11. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк за свободна липоксигеназа от авокадо пречистена с фракционно утаяване при субстрат линоленова киселина

От уравнението на Лайнуивър – Бърк изчислените стойности за K_m и V_{max} , са както следва: $7,22 \cdot 10^{-4}$ M и $1,64 \cdot 10^{-6}$ M/min/mg. При сравнение кинетичните параметри от литературното проучване (Таблица 2), можем да направим извода, че получените от нас резултати са близки до тези получени от други автори при изолирането на липоксигеназа от авокадо.

1.11. Инхибиране на липоксигеназа пречистена от авокадо

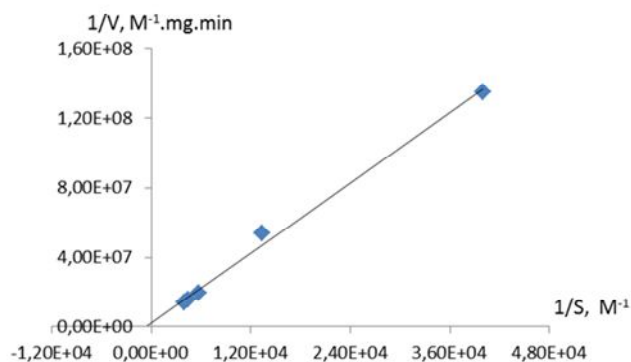
Според Steele et al., наличието на първични amino или хидроксилна група в структурата на съединенията, може да окаже инхибиторен ефект върху липоксигеназата.

Rioux N. et al., докладват, че алкохоли и първични амини са добри липоксигеназни инхибитори.

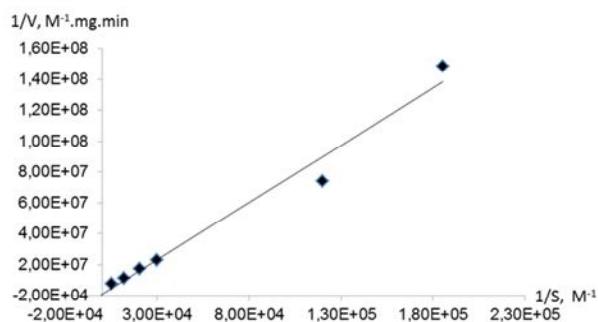
Във връзка с това и нашите усилия бяха насочени към изследването на серия съединения, с потенциално инхибиращо действие върху липоксигеназата. В резултат на тези изследвания установихме, че по специално три от анализиранияте продукти, а именно Z-серин, N-Z-L-серин и L-каналин, оказаха инхибиращо действие върху изолираният от нас ензим. Процедурата на изследване е описана подробно в раздел материали и методи.

На фиг. 12, фиг. 13 и фиг. 14, са показани графичните изрази за хода на реакцията в присъствие на трите аналога на L-серинът, в координати на Лайнуивър-Бърк. От получените уравнения на права, успяхме да изчислим кинетичните параметри на реакцията (K_m и V_{max}). Линейната зависимост във времето е показател за висок

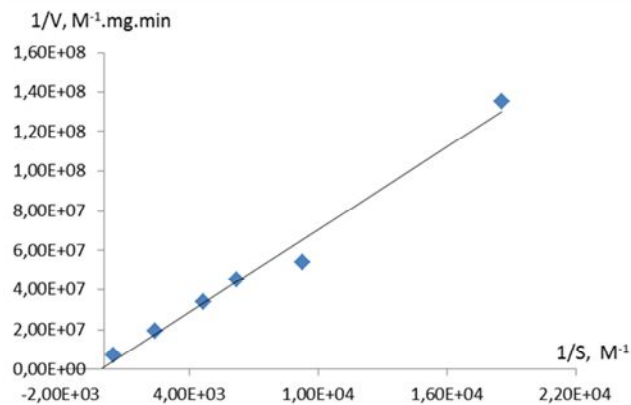
афинитет на ензима към субстрата, при което се очаква стойността на K_m да е ниска. Кинетичните параметри зависят от вида и концентрацията на буфера.



Фиг. 12. Графично представяне на уравнението на Лайнуивър-Бърк липоксигеназа в присъствие на инхибитор Z-серин с концентрация 3 mM



Фиг. 13. Графично представяне на уравнението на Лайнуивър-Бърк липоксигеназа в присъствие на инхибитор N-Z-L - серин с концентрация 0,647 mM



Фиг. 14. Графично представяне на уравнението на Лайнуивър-Бърк липоксигеназа в присъствие на инхибитор L – каналин с концентрация 0,647 mM

Кинетичните параметри на инхибираната и неинхибираната реакция са обобщени в таблица 3.

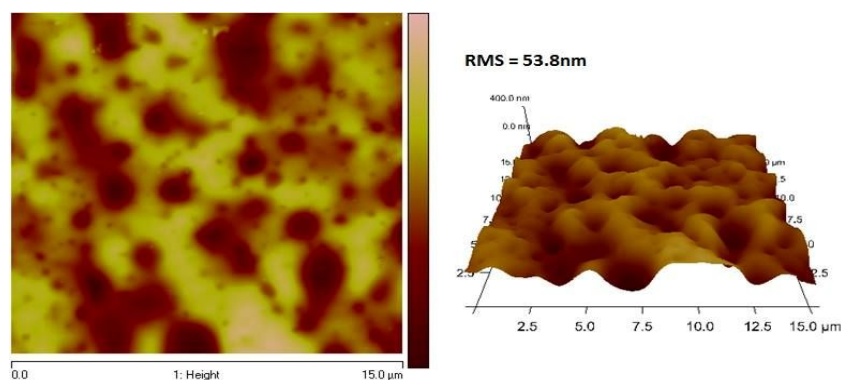
Таблица 3. Сравнение на параметрите на неинхибираната реакция с тези на инхибираните реакции

	Реакция без инхибитор	Реакция с Z-серин, 3mM	Реакция с N-Z-L-серин, 0,647mM	Реакция с L-каналин, 0,647mM
Km, M	7,22.10 ⁻⁴	1,43.10 ⁻³	8,32.10 ⁻⁴	2,96.10 ⁻³
Vmax, M/min/mg	1,64.10 ⁻⁶	4,25.10 ⁻⁷	1,12.10 ⁻⁶	4,25.10 ⁻⁷

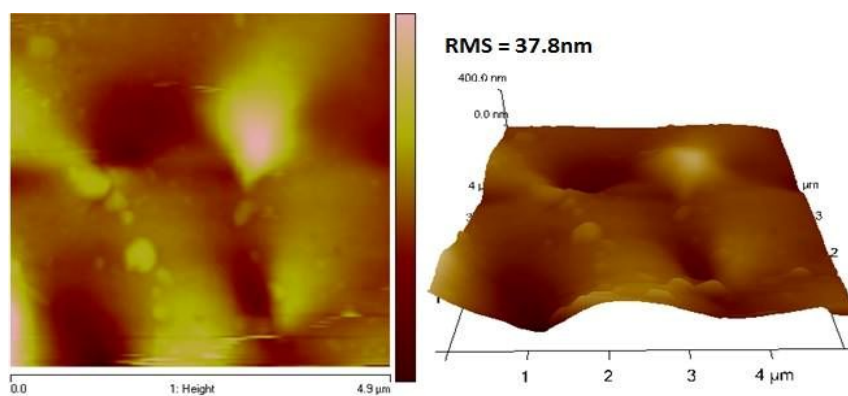
При сравнение на стойностите на кинетичните константи определени при различните процеси на инхибиране и съответните концентрации на инхибиторните съединения се налага заключението, че най-сериозен инхибиращ ефект върху липоксигеназата упражнява L-каналина. Подобен първоначален извод би могъл да намери потвърждение при по нататъшни изследвания. Изхождайки от наблюдаваната при инхибираните реакции тенденция, а именно за нарастване на Km и понижаване на Vmax, бихме могли да предположим, че и в трите случая наблюдаваме вариант на инхибиране от смесен тип. Тези три потенциални инхибиторни съединения заслужава да бъдат подложени на по задълбочени изследвания, за да бъде категорично остановен характера на тяхното въздействие върху нашият ензим.

1.12. Имобилизирание на липоксигеназа от авокадо

Предвид на така проверените качества на полимери TMOS, CAB, PAMAM и MTES, CAP, PAMAM, бе решено да ги използваме като матрици носители при имобилизирането на изследваната от нас липоксигеназа от авокадо. Първоначално получените съгласно описаната в материали и методи процедура, матрици, бяха охарактеризирани с помощта на атомно силов микроскоп (AFM), което позволи по детайлно изследване на тяхната повърхност. Резултатите от тези изследвания са посочени на фиг. 15 и фиг. 16.



Фиг. 15. Снимка на хибридна матрица TMOS,CAB,PAMAM, направена на AFM-VeecoMultimode V5



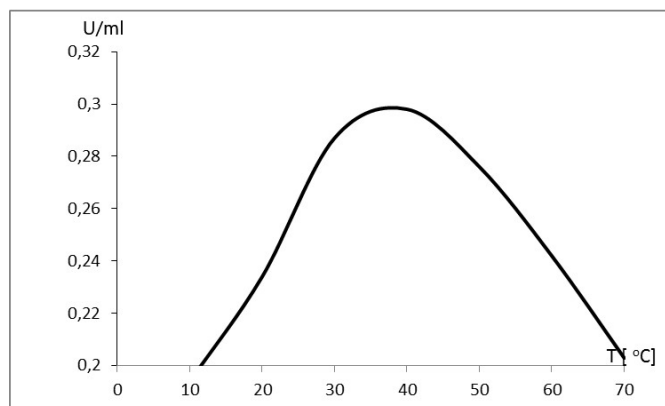
Фиг. 16. Снимка на хибридна матрица MTES,CAP,PAMAM, направена на AFM-VeecoMultimode V5

Както личи от двете фигури, хибридната матрица TMOS,CAB,PAMAM, притежава значително по-развита и порьозна повърхност, което се потвърждава допълнително от стойността за RMS 53,8nm.

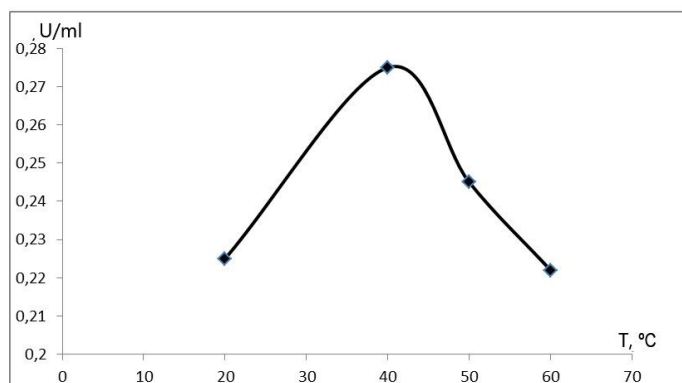
Липоксигеназата от авокадо беше имобилизирана съгласно процедурата описана в материали и методи, върху два полимерни носителя на базата на дендримери - TMOS,CAB,PAMAM и MTES,CAP,PAMAM. Продължителността на имобилизационната процедура беше 24 часа, след което добре промитите матрици с имобилизиран ензим бяха подложени на охарактеризиране, с цел да установим температурният оптимум на имобилизирания ензим, както и неговите кинетични характеристики.

- Температурен оптимум на имобилизираната липоксигеназа

Температурният оптимум на изследваният върху двете матрици ензим, беше изследван в температурният диапазон от 20 до 60°C, като резултатите от тези изследвания са показани на фиг. 17 и фиг. 18.



Фиг. 17. Температурен оптимум на имобилизирана LOX върху TMOS,CAB,PAMAM



Фиг. 18. Температурен оптимум на имобилизирана LOX върху MTES,CAP,PAMAM

Както става очевидно от демонстрираните на двете фигури резултати, имобилизацията не повлиява на неговият температурен оптимум, който се запазва 40°C, както за матрица TMOS,CAB,PAMAM, така и за матрица MTES,CAP,PAMAM.

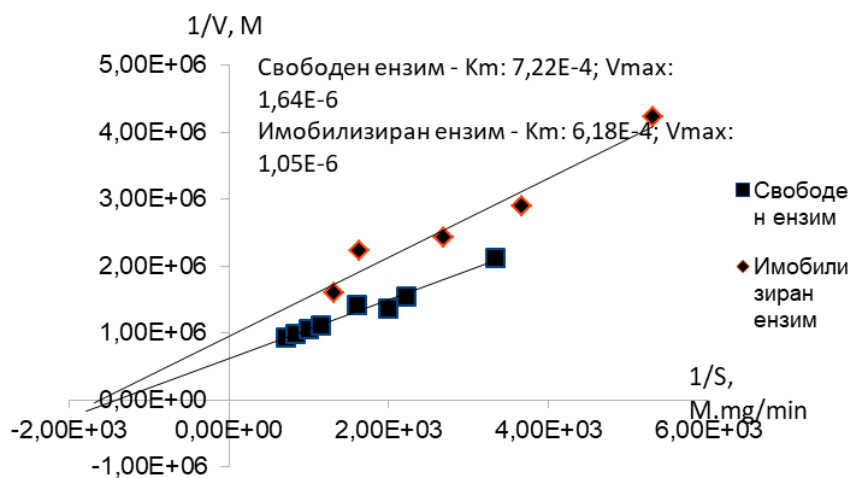
- Активност на имобилизираните върху различни носители ензим

С помощта на описаната в материали и методи процедура, беше изследвана активността на имобилизираните, чрез адсорбция върху двете хибридни матрици ензим, при което беше установено, че активността на ензима имобилизиран върху TMOS,CAB,PAMAM (0,035 E/mg), надвишаваше приблизително 2 пъти активността на имобилизираните върху MTES,CAP,PAMAM (0,017 E/mg). Анализът на белтъчното

съдържание, съгласно модифицираният метод на Лоури, показва че върху матриците е имобилизирано еднакво количество ензим - TMOS,CAB,PAMAM (0,018mg/100mg) и MTES,CAP,PAMAM (0,019mg/100mg). Сравнението на данните получени за ензимната активност, показват значително намаление в следствие на процедурата на имобилизация, което е възможно да се дължи на ефекта на микрообкръжението на ензима, която предполага, както наличието на дифузионни ограничения, така и на пречещи взаимодействия между хидрофилна повърхност и субстрат с хидрофобен характер.

- *Изследвания на кинетичните параметри на имобилизирания ензим*

Беше изследвана кинетиката на реакцията на имобилизираният върху двете матрици ензим, при което ензимът имобилизиран върху MTES,CAP,PAMAM показва по-добри резултати, докато този имобилизиран върху TMOS,CAB,PAMAM показва двусмислени резултати, което може да бъде обяснено с възникнали пространствени ограничения от страна на матрицата. Този извод се потвърждава и от направените топографски снимки на атомно-силов микроскоп (AFM). Резултатите от кинетичните изследвания на имобилизираният върху MTES,CAP,PAMAM са представени на фиг.19 в сравнение на тези за свободният ензим.



Фиг. 19. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк за свободна и имобилизирана липоксигеназа от авокадо, при субстрат линоленова киселина

Определените с помощта на Лайнуивър – Бърк линеализацията K_m и V_{max} за имобилизираният ензим бяха съответно $K_m=6,18 \cdot 10^{-4}$ M; $V_{max}=1,05 \cdot 10^{-6}$ M/min/mmg.

Тези стойности, както личи и на графиката бяха достатъчно близки със стойностите за свободния ензим ($K_m=7,22 \cdot 10^{-4}$ M; $V_{max}=1,64 \cdot 10^{-6}$ M/min/mg).

Тези резултати потвърждават, че ензимът не губи активност и афинитет към субстрата – линоленова киселина, въпреки имобилизацията. Опитно е установено, че активността на имобилизираният ензим се запазва във времето, което говори, че начина на свързване на ензима към матрицата е достатъчно надежден и не се наблюдават пространствени ограничения.

1.13. Кислородна консумация в присъствие на липоксигеназа

В опит да бъдат преодолените проблемите, които възникнаха при охарактеризирането на ензима с помощта на спектрофотометричния метод, поради лошата разтворимост на субстрата при условията на реакцията, беше изследвана възможността липоксигеназната активност да бъде определяна посредством консумацията на кислород в хода на окислението на полиненаситените мастни киселини.

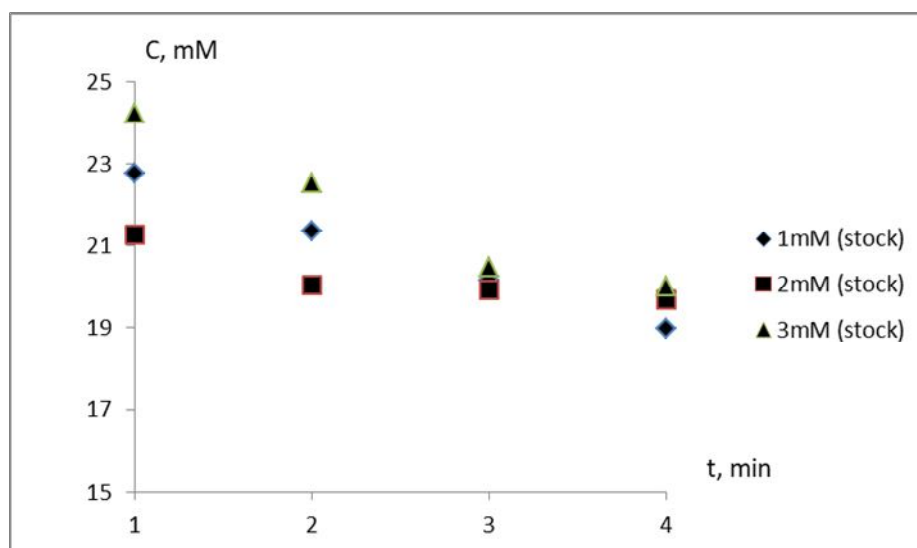
Този метод е високо чувствителен, подобно на метода на спрегнатия диен, обаче, резултатите от тези два различни анализа не винаги се съгласуват добре. Holman отбелязва, че когато са налице вторични реакции както в случая със суров екстракт от соево брашно спектрофотометричните анализи не могат да достигнат теоретичния добив определен на база на кислородната консумация. Подобен наблюдаван феномен се дължи на реакции които консумират хидроксипипидите в хода на катализираната реакция и съответно те не могат да бъдат отчетени, когато се използва спектрофотометричния анализ. Следователно изследването на активността на липоксигеназата базирано на кислородна консумация може да се приеме като по-добро по отношение на точността. На базата на изискванията и ограниченията произтичащи от използваното оборудване обаче, методът има само ограничена ценност, като средство за анализ, тъй като поради ниската си аналитична пропускливост не е подходящ за измерването на голям брой проби.

Въпреки този недостатък обаче, взехме решение да изследваме възможността за определяне на липоксигеназната активност на базата на отчитането на консумирания в хода на ензимокатализираната реакция кислород.

За целта бе конструирана затворена лабораторна система на базата на апарат Hanna HI2400, която е демонстрирана в раздел „Материали и методи”.

Системата позволяваше интензивно разбъркване на реакционната смес в отсъствие на контакт с кислород от въздуха, както и въвеждане на различни реагенти в нея в точно дефиниран момент.

С помощта на тази лабораторна система бе проследена кинетиката на консумиране на кислород след въвеждане на едни и същи количества ензим в субстратни разтвори съдържащи три различни концентрации на субстрата. Кинетиката на тези процеси е представена на фигура 20.



Фиг. 20. Изчерпване на кислорода в реакционната смес

Резултатите, от това изследване позволиха да бъде установена ефективността и принципната приложимост на метода. Едновременно с това, обаче бяха отчетени и редица ограничения на методиката, произтичащи значителен брой разнообразни фактори. Спектърът на тези пречещи фактори, варираше от установената известна нестабилност в показанията на самия кислороден електрод, до проблеми с изолацията елиминираща достъпа на кислород до реакционната смес в обема на клетката. В резултат на това, получените стойности за скоростите на ензимно катализираните реакции при трите различни субстратни концентрации, можеха да се приемат само като приблизително достоверни.

Поради възникналите трудно, преодолими практически затруднения при разработването на методика за определяне на липоксигеназна активност посредством консумацията на кислород, бе взето решение да изследваме и друг подход за реализиране на тази цел.

Макар и все още рядко прилагана при кинетични изследвания на ензимно-катализирани реакции, кондуктометрията е един доста обещаващ метод, който по предварителната ни преценка можеше да даде добри резултати специално в случая на изследвания от нас ензим. По тази причина, като финален етап от нашето изследване насочено към оптимизиране на процедурата за определяне на липоксигеназна активност, бе предприет опит за разработване на кондуктометричен метод позволяващ реализирането на тази цел.

1.14. Кондуктометрия

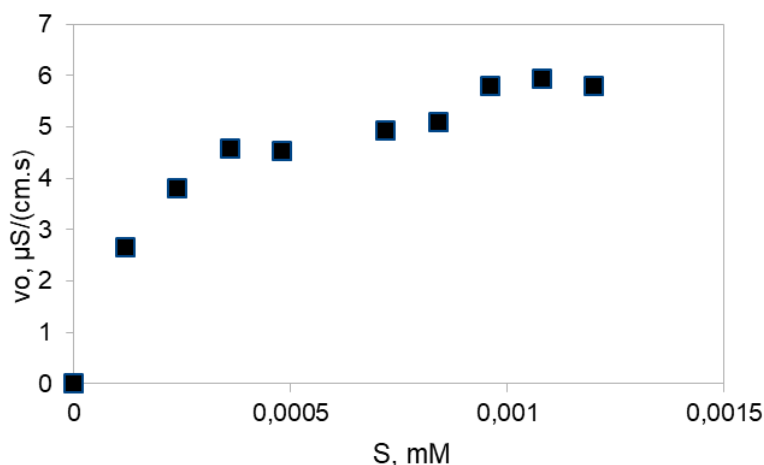
Съгласно уравнението на Henderson-Hasselbach:

$$\frac{[HO]_2}{[O_2^{-1}]} = 10^{4.88-6.4}$$

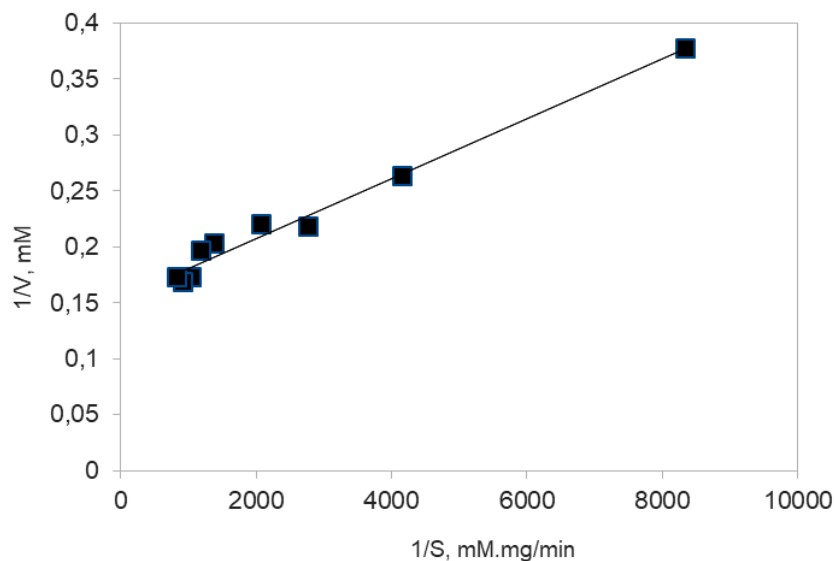
, при оптимални за ензима условия (pH = 6,4), ще преобладава йонизираната форма: $[HO_2] \approx 0.03 [O_2^{-1}]$

Измерването на специфичната електропроводимост, би трябвало да отчете повишението на концентрацията на протони в разтвора, в следствие на реакцията катализирана от липоксигеназа от авокадо.

В хода на реакцията, катализирана от липоксигенатаза от авокадо, се наблюдава изменение в проводимостта на разтвора. Бяха проведени редица експерименти при pH 6,5, при което се получиха следните резултати:



Фиг. 21. Графичен израз на уравнението на Михаелис - Ментен за липоксигеназа от авокадо при субстрат линоленова киселина



Фиг. 22. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк за липоксигеназа от авокадо при субстрат линоленова киселина

След обработка на получените експериментални данни от кондуктометричните измервания, параметрите на ензимната реакция имат следните стойности: K_m : $2,68 \cdot 10^{-5}$ mM, V_{max} : $6.51 \mu S.(cm/s)$.

Линейната зависимост във времето е показател за висок афинитет на ензима към субстрата, при което се очаква стойността на K_m да е ниска. Кинетичните параметри зависят от вида и концентрацията на буфера. Ниската концентрация на буфера повишава чувствителността на буфера, което позволява да се определи K_m .

Определените по този метод привидни константи K_m и V_{max} , показаха че е възможно създаването и верификацията на метод за определяне на ензимна активност.

Ограничение на метода, е че може да се използва при рН по-малко или близко до изоелектричната точка на ензима. При по-високо рН, групите в ензимната молекула, които могат да имат заряд са депротонирани. В алкална среда се получава протониране на хидропероксидният йон, при което резултатите са адекватни.

2. Заключение

Изследванията с ензими и самите ензими, се радват на голям интерес през последните десетилетия. Липоксигеназите от различни източници, като част от това огромно семейство биомолекули са обект на изследвания още от началото на миналият век.

Много изследователски групи са опитвали и се опитват да проучат сложната им структура и начин на действие, но този вид ензими не се подчиняват на стандартните методи за интерпретация на резултатите.

В този дисертационен труд, са описани и използвани няколко от добре познатите методи за охарактеризиране на ензимите, като метода на Лоури, определянето на ензимната активност за единица време, определянето на кинетичните параметри на ензимно-катализираната реакция (K_m и V_{max}), чрез интерпретация на резултатите в координати на Михаелис-Ментен и Лайнуивър-Бърк. В същото време са направени опити да се оптимизира метода за определяне на активността, като се използват методи като кондуктометрията и измерването на консумацията на кислород.

Инхибирането на ензимите, също е сериозна тема за изследователите, тъй като голяма част от ензимите включително и липоксигеназата, в резултат от действието си дават продукти, които вредят, както на растенията така и на хората. Нуждата от разработване на иновативни лекарствени препарати, които да намаляват или блокират напълно действието им, налага тенденцията да се търсят все повече нови инхибитори.

Имобилизирането на липоксигеназата, освен че спомага за по-дългото запазване на активността на ензима, като го предпазва от външни неблагоприятни влияния, също така дава възможност за разработване биосензори с различно приложение в медицината и фармацията.

Въз основа на получените от нас резултати, можем да твърдим, че постигнахме поставените цели.

3. Приноси

1. Изследвана е кинетиката на инхибиране на реакцията, катализирана от липоксигеназа от авокадо, в присъствието на три потенциални инхибиторни съединения. Въз основа на получените резултати са направени изводи, относно силата на инхибиращият ефект, според съдържаща се аминокислоти- или хидроксилна група.
2. Изолираният и пречистен ензим – липоксигеназа от авокадо е имобилизиран, чрез адсорбция върху два съполимера на базата на дендримери. От обобщените резултати, които показва системата ензим-носител, може да се направи заключението, че ензимът запазва активността си.
3. Получени са резултати, доказващи възможната употреба на нов метод за определяне на липоксигеназна активност, чрез измерване на електрическата проводимост на реакционната среда.

4. Изводи

1. Осъществено е изолиране и пречистване на липоксигеназа от авокадо в хода на четириетапен процес, при което е постигната степен на пречистване 4,04 определена по отношение на освободения от ендогенни инхибитори изходен ензимен разтвор и добив от 23,9%. Активността на пречистения ензимен препарат достигна $0,202 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$.

2. При охарактеризирането на пречистеният ензимен препарат бяха получени резултати сходни с тези докладвани от други автори по отношение на изследвания ензим, а именно: температурен оптимум – 40°C , рН оптимум 6,5 и $K_m = 7,22 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

3. Установени са три съединения с потенциално инхибиторно действие върху липоксигеназа от авокадо, а именно: Z-серин, N-Z-L-серин и L-каналин, при което последния демонстрира най-висок инхибиторен потенциал оценен според съотношението ефект: концентрация. И в трите случая промяната на кинетичните параметри при инхибираната реакция следваше тенденцията характерна за инхибиране от смесен тип.

4. Липоксигеназата от авокадо беше имобилизирана, върху два полимерни носителя на базата на дендримери - TMOS,CAB,PAMAM и MTES,CAP,PAMAM. От направените спектрофотометрични анализи установихме, че температурният и рН оптимуми на ензима не се променят (40°C и 6,5), в резултат от имобилизацията.

Сравнението на данните получени за ензимната активност (TMOS,CAB,PAMAM ($0,018\text{mg}/100\text{mg}$) и MTES,CAP,PAMAM ($0,019\text{mg}/100\text{mg}$)), показват значителното ѝ понижаване вследствие на процедурата на имобилизация. Този факт вероятно се дължи на ефекта на микрообкръжението на ензима. Определените с помощта на Лайнуивър – Бърк линеализацията K_m и V_{max} за имобилизираният ензим бяха съответно $K_m=6,18 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $V_{\text{max}}=1,05 \cdot 10^{-6} \text{ M}/\text{min}/\text{mg}$. Тези стойности, бяха достатъчно близки със стойностите за свободния ензим, което потвърждава, че ензимът не губи активност и афинитет към субстрата – линоленова киселина, въпреки имобилизацията.

5. Проучени са две алтернативни възможности за определяне на ензимната активност на липоксигеназа и кинетични изследвания на катализираните от нея реакции. Определянето на ензимната активност посредством измерване на кислородната консумация в реакционната среда, бе съпроводен с трудности основно от апаратурно естество. Въпреки тях обаче бяха определени кинетични параметри на

реакцията сходни с тези установени с помощта на спектрофотометричния метод и по-конкретно: $K_m = 1,77 \cdot 10^{-4}$ М и $V_{max} = 2,75 \cdot 10^{-5}$ М/min/mg. При определянето на ензимната активност посредством измерване на промяната в проводимостта на реакционната среда бяха получени адекватни резултати само за анализи осъществени в киселата област (рН 6,5). Кинетичните параметрите на ензимно катализираната реакция в този случай имаха следните стойности: $K_m = 2,68 \cdot 10^{-5}$ М и $V_{max} = 6.51 \mu S \cdot (cm/s)$.

Списък на научните публикации по дисертационния труд

➤ Статии в списания с импакт фактор

R.N. Raykova , E. Carvalho , L.S. Manovski , D.L. Danalev , D.A. Marinkova , T.I. Pajpanova , S.A.Yaneva4 , L.K. Yotova, Kinetic of inhibition of lipoxygenase in presence of natural amino acid serine, Bulgarian Chemical Communications, Special Edition E, 2017, (pp. 107 – 112)

➤ Статии в списания без импакт фактор

Lachezar Manovski, Vera Smedzieva, Lubov Yotova, INVESTIGATION ON ISOLATED AND PURIFIED LIPOXYGENASE FROM AVOCADO IN THE PRESENCE OF LINOLENIC ACID, Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 50, 3, 2015, 249-254

Списък на постерните доклади по дисертационния труд, изнесени на научни конференции и постерни сесии

XI научна постерна сесия, ХТМУ, 2014, Isolation and purification of Lipoxygenase from Avocado, L. S. Manovski , H. Farahat , V. Semerdzhieva, L. K. Yotova

Първа Национална конференция по биотехнология, „30 години биотехнология в България“, 17-18 октомври 2014г., БУ на СУ „Св. Климент Охридски“, Applications of lipoxygenase from avocado, L. Manovski, L. Yotova

Първа национална конференция по реинтродукция на консервационно значими видове. Младежка научна конференция „Климентови дни“, 18-20 ноември 2015г., БУ на СУ „Св. Климент Охридски“, Kinetic investigation of lipoxygenase immobilized on MTES/CAP/PAMAM and TMOS/CAB/PAMAM carriers, Vera Semerdzhieva, Lachezar Manovski, Spaska Yaneva, Lubov Yotova

„7-МИ БЪЛГАРСКИ ПЕПТИДЕН СИМПОЗИУМ“ 2016, KINETIC OF INHIBITION OF LIPOXYGENASE IN PRESENCE OF NATURAL AMINO ACID SERINE AND LINOLENIC ACID, L. MANOVSKI, TZ. BANCHECVA, R. RAYKOVA, L. YOTOVA, T. PAJPAANOVA, D. DANALEV

Участия в постерни сесии и конференции:

XI научна постерна сесия, ХТМУ, 2014

Isolation and purification of Lipoxygenase from Avocado, L. S. Manovski , H. Farahat , V. Semerdzhieva, L. K. Yotova - постер

Investigations on new synthetic inhibitors of soybean lipoxygenase, R. Raykova, L. Manovski, D. Danalev, D. Marinkova, L. Yotova - постер

Multienzyme system for constructing optical biosensors, S. Yaneva, L. Manovski, Y. Pasheva, Ts. Katsarova, K. Petrova, L. Yotova - постер

Първа Национална конференция по биотехнология, „30 години биотехнология в България“, 17-18 октомври 2014г., БУ на СУ „Св. Климент Охридски“

Applications of lipoxygenase from avocado, L. Manovski, L. Yotova - постер

Investigations on soybean lipoxygenase, Raya Raykova, Lachezar Manovski, Dessislava Marinkova, Lyubov Yotova, Dancho Danalev – постер

International Pulp Bleaching Conference, 29-31 October 2014, Grenoble

Biotechnological Processes for Pulp Bleaching, L. Yotova, I. Valchev, N. Georgieva, L. Manovski, R. Betcheva - постер

XII научна постерна сесия, ХТМУ, 2015

Biosensor based on immobilized lipoxygenase for determination of leukotrienes and lipoxins, L. Manovski, L. Yotova – постер

Първа национална конференция по реинтродукция на консервационно значими видове. Младежка научна конференция „Климентови дни“, 18-20 ноември 2015г., БУ на СУ „Св. Климент Охридски“

Kinetic investigation of lipoxygenase immobilized on MTES/CAP/PAMAM and TMOS/CAB/PAMAM carriers, Vera Semerdzhieva, Lachezar Manovski, Spaska Yaneva, Lubov Yotova - постер

XIII научна постерна сесия, ХТМУ, май 2016

Fluorescence Spectroscopic Study on Resveratrol as Lipoxygenase Inhibitors

Lachezar Manovski, Raya Raykova, Lubov Yotova - постер

International Biomedical congress – Sofia, 2016

Purification and immobilization of lipoxygenase. Production of anti-inflammatory and antibacterial agents, Vera Semerdzhieva, Lachezar Manovski, Lubov Yotova - постер

European Biotechnology Conference, Riga, 2016

Purification and Immobilization of Lipoxygenase for Production of Anti-inflammatory and Antibacterial Agents Lubov Yotova, Lachezar Manovski, Vera Semerdzhieva, Spaska Yaneva - постер

„7-МИ БЪЛГАРСКИ ПЕПТИДЕН СИМПОЗИУМ“ 2016

KINETIC OF INHIBITION OF LIPOXYGENASE IN PRESENCE OF NATURAL AMINO ACID SERINE AND LINOLENIC ACID, L. MANOVSKI, TZ. BANCHEVA, R. RAYKOVA, L. YOTOVA, T. PAJANOVA, D. DANALEV. – постер

Участия в проекти:

Съвместен проект с ИБИР-БАН: ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ, СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ УЧЕНИ В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ И ИНОВАЦИОННИ БИОТЕХНОЛОГИИ, Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд”.

НИС, 2015

Изолиране, пречистване и характеризиране на L-Аспарагиназа от *Pisum sativum* L.