



Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

Биологически факултет
Катедра „Биохимия и Микробиология“



АНГЕЛ ИЛИЕВ ПЕШКОВ

**ИЗСЛЕДВАНЕ СВОЙСТВАТА НА ОКСИДОРЕДУКТАЗИ,
ИМОБИЛИЗИРАНИ В БИОСЪВМЕСТИМИ МАТРИЦИ**



АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“
Област на ВО: 4. Природни науки, математика и информатика
Професионално направление: 4.3. Биологически науки;
Докторска програма: **Биохимия**

Научни ръководители:
Проф. д-р Илия Николов Илиев
Доц. д-р Нина Димитрова Димчева

Пловдив, 2025



Пловдивски университет

„Паисий Хилендарски“

Биологически факултет

Катедра „Биохимия и Микробиология“



АНГЕЛ ИЛИЕВ ПЕШКОВ

**ИЗСЛЕДВАНЕ СВОЙСТВАТА НА ОКСИДОРЕДУКТАЗИ,
ИМОБИЛИЗИРАНИ В БИОСЪВМЕСТИМИ МАТРИЦИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за придобиване на образователна и научна степен **„Доктор“**

Област на ВО: **4. Природни науки, математика и информатика**

Професионално направление: **4.3. Биологически науки;**

Докторска програма: **Биохимия**

Научни ръководители:

Проф. д-р Илия Николов Илиев

Доц. д-р Нина Димитрова Димчева

Пловдив
2025

Дисертационният труд съдържа 137 страници, 1 схема, 14 таблици, 28 фигури и 238 литературни източника.

Експерименталните изследвания са проведени в катедра „Биохимия и микробиология“ към Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и в лабораториите на Център по технологии към ПУ „Паисий Хилендарски“.

Докторантът е автор и съавтор в общо 3 статии по тематиката на дисертационния труд, реферирани и индексирани в международните бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus).

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на катедра „Биохимия и микробиология“ при Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски“, проведен на 12.05.2025 г.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на .. 07.2025 г. от ... часа в зала „Компас“ на ПУ „П. Хилендарски“.

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на заинтересуваните се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Автор: Ангел Илиев Пешков

Заглавие: Изследване свойствата на оксидоредуктази, имобилизирани в биосъвместими матрици

Научно жури:

Проф. д-р Велизар Костадинов Гочев
Проф. д.б.н. Искра Витанова Иванова
Проф. д.б.н. Мария Богомилова Ангелова-Дянкова
Доц. д-р Тотка Михайлова Додевска
Доц. д-р Димитър Георгиев Божилов

Резервни членове:

Проф. д-р Георги Тодоров Добрев
Доц. д-р Елена Димитрова Апостолова

ВЪВЕДЕНИЕ

Нарастващото население и бързото индустриално развитие на света е пряко свързано със замърсяването на околната среда с различни замърсители, както нововъзникващи такива, така и микро- и нано пластмаси, фармацевтични продукти, опасни багрила, хормони и органични замърсители, добре познати от разнообразните индустриални процеси. Установено е, че те причиняват различни странични ефекти и заболявания като рак, невротоксични и мутагенни ефекти, стомашно-чревни разстройства, загуба на периферно зрение, влошена координация на движенията и отслабени мускули, както и редица други дегенеративни заболявания.

Наличието на тези замърсители в околната среда и водоизточниците, засяга всички живи организми и нарушава екологичното равновесие, за това отстраняването им от околната среда е насочено към интелигентна, по-зелена и екологосъобразна технология, превърнала се в основна цел в борбата със замърсители от всяко естество.

Огромна част от замърсителите са изключително стабилни и отстраняването им е сериозно предизвикателство. За това употребата на ензими в процесите на детекция на токсични вещества са важна част от съвременните биотехнологичните процеси за пречистване на околната среда.

Оксидоредуктазите са поставени в Клас I в номенклатурата на ензимите, чийто окислителни свойства проявяват завиден положителен ефект върху разграждането на различни замърсители. Уникалните свойства на този клас ензими по отношение на селективност и каталитични характеристики ги правят стабилни кандидати за биокаталитично третиране. Тъй като много химични и биохимични трансформации включват тези процеси, разработването на практически биокаталитични приложения на оксидоредуктазите е важна цел в биотехнологиите.

В процесите на детоксикация, широко се използват оксидоредуктазите лакказата (EC 1.10.3.2) и каталазата (EC 1.11.1.6). Каталазата има една от най-високите стойности на каталитичната скоростна константа (K_m), като една молекула ензим катализира разлагането на над милион молекули водороден пероксид за секунда. Основният механизъм на действие на този ензим включва диспропорционирането на две молекули водороден пероксид (H_2O_2) до кислород и вода, при това без да се образуват реактивни кислородни частици. Лакказата най-често се продуцира от нишковидни гъби, както и от някои бактерии и висши растения. Ензимът има потенциал за множество биотехнологични приложения, като разграждане на лигнин, както и много екологични приложения за биоразграждане на органични замърсители, като лакказните ензими могат да трансформират различни видове, трудни за унищожаване замърсяващи съединения, в това число фармацевтични замърсители като антибиотици, хлорофеноли и багрила.

Лакказата и каталазата са ензими, които играят значителна роля в биосензорната технология поради техните каталитични свойства и потенциал за специфични взаимодействия със субстрати. Базираните на лакказа биосензори могат да откриват фенолни замърсители, като тези, открити във вода или промишлени отпадъци, чрез окисляване на фенолни групи, осигурявайки прост и рентабилен метод за мониторинг на околната среда. В биоелектрохимични сензори, лакказата може да бъде интегрирана в биогоривни клетки или сензори за околната среда,

където служи като биокатализатор за пренос на електрони, подпомагайки преобращуването на химическата енергия в електрически сигнали.

Каталазата заедно с глюкозооксидазата и пероксидазата са биологичната част на биосензори за количествено отчитане на глюкоза в кръвта при човека. Разработен е биосензор, базиран на холестерол оксидаза и каталаза, съвместно имобилизирани върху графенов/йонен течностно-модифициран стъкловъглероден електрод, за да се разработи високочувствителен амперометричен биосензор за холестерол. Каталазата често се използва като компонент на хранителни и козметични емулсии за предпазване на окислението на маслената фракция и удължаване срока на съхранение.

Перспективността на използването на каталаза и лакказа при конструиране на биосензори с множество приложения предполага научните изследвания за разработване на нови методи за имобилизиране на ензимите и включването им в нови биосензори.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се изследва капацитета на ензимите каталаза и лакказа, получени от различни източници за включване в биосензори за провеждане каталитични реакции в условия на хетерогенна биокатализа и в присъствие на органични разтворители.

За постигане на целта са поставени следните задачи:

1. Да се изследват кинетичните параметри на нативна и имобилизирана форма каталаза от различен произход (плесенна, бактериална и говежда) в хетерогенна среда в присъствие на органичен разтворител;
2. Да се изследват кинетичните параметри на нативна и имобилизирана форма лакказа от *Trametes versicolor* в хетерогенна среда в присъствие на органичен разтворител;
3. Да се оптимизират електрохимичните методи за определяне на ензимната активност на нативна и имобилизирана форма от изследваните ензими каталаза и лакказа в хетерогенна среда в присъствие на органичен разтворител;
4. Да се изследват параметрите на биосензори, изработени с участието на имобилизирани форми от изследваните ензими каталаза и лакказа;
5. Да се изследва приложимостта на конструирания лакказен биосензор за количествен анализ на фенолни киселини и полифеноли в билкови екстракти.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Биохимични методи

1.1. Извличане, концентриране, пречистване и сушене на ензима каталаза *Pen. chrysogenum*

Плесенната каталаза е продуцирана от мутантен щам *Pen. chrysogenum* и е изолирана и пречистена по патентована технология. Пречистената форма на ензимният препарат, бе щедро предоставена за целите на текущият дисертационен труд от проф. д-р Илия Илиев.

1.2. Определяне ензимната активност на каталаза от различни източници в хомогенна и хетерогенна среда

Каталазна активност в хомогенна и хетерогенна среда на ензими от *Pen. chrysogenum*, *Micrococcus lysodeicticus* и каталаза от говежди черен дроб се определи съгласно процедурата за анализ на Worthington, накратко: 100 μ l ензимен разтвор се добавя към 2,9 ml разтвор на субстрата γ (50 mM водороден пероксид в 20 mM буфер, pH 7,00) при постоянна температура от 20°C в 4,5 mL кварцова кювета. Ензимната кинетика се проследява при 240 nm, при която дължина на вълната се регистрира промяната в абсорбцията на светлина. Изменението на концентрацията на субстрата – водороден пероксид, се изчислява въз основа на отчетената светлинна абсорбция по закона на Буге-Ламбер-Бееер, като се приема коефициент на екстинкция $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ mol.l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. За определяне на каталитичната активност на каталазите бяха проведени 3 до 5 измервания с всеки ензим. Използван е термостатиран спектрофотометър Shimadzu UV-VIS 2600.

1.3. Титриметричен метод за определяне на ензимната активност на каталаза от различни източници в хомогенна среда (Chaga, G., *et al.*, 1992)

1.4. Определяне ензимната активност на лакказа от различни източници чрез спектрофотометричен метод

Активността на лакказа се определи чрез измерване на окисляването на ABTS. Нарастването на абсорбцията за 3 минути се измерва спектрофотометрично (Shimadzu UV-VIS 2600) при 420 nm дължина на вълната. Реакционната смес съдържа: 100 μ l 50 mM ABTS, 800 μ l 20 mM Na-ацетатен буфер (pH 4.5) и 100 μ l подходящо разреден ензим (Patel, H., *et al.*, 2014). Измерването се провежда при стандартни условия спрямо контрола. Една единица ензимна активност се определя като количество ензим, което окислява 1 μ M субстрат на минута при стайна температура.

1.5. Определяне ензимната активност на лакказа в присъствие на органични разтворители

Първоначално ензимната активност се определи в отсъствие на органични разтворители, а получените резултати бяха зачетени като контрола. В този случай лакказа от *Trametes versicolor* се разтваря в 20 mM Na-ацетатен буфер с pH 4.5 и ензимната реакция с 50 mM ABTS се наблюдава в продължение на 3 минути. След това анализът се повтори, следвайки същата процедурата, като към реакционната смес се добави 10% и 20% в последователни измервания от всеки органичен разтворител – ацетон, диметилсулфоксид (DMSO), метанол и етанол. Измерването се провежда 5 минути след добавянето на всеки разтворител. За да се проследи влиянието на всеки от

разтворителите върху ензимната молекула и как се променя ензимната активност, въз основа на първоначалните резултати, инкубацията на ензима протича за един и два часа в присъствието на органични разтворители с концентрация 10% и 20%, където активността на ензима се наблюдава веднага след инкубирането.

1.6. Количествено определяне на белтък по Bradford, M.M. (1976)

1.7. Трис-глицинова SDS-полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE)

1.8. Трис-глицинова нативна-полиакриламидна гел електрофореза (Native-PAGE)

2. Електрохимични методи

2.1. Получаване на модифицирани електродни материали

Преди да бъдат модифицирани, всички стъкловъглеродни повърхности бяха полирани със суспензии от γ - Al_2O_3 с размер на частиците 0.3 и 0.05 μm върху полиращи подложки (LECO, Plzeň, Чешка република и Hereus Kreuz, Германия) и промити с ултрачиста вода. Всяка стъпка на полиране е последвана от двукратно почистване чрез ултразвук в ултрачиста вода за 1–2 минути.

Ензимната имобилизация на ензим лакказа се извършва по следния начин: 2 μl ензимен разтвор се отлагат под формата на капка върху повърхността на електрода. След това се добавя 4- μl капка от свързващото вещество (Nafion 117, разреден с ултрачиста вода до 0,2%). Повърхността се изсушава при стайна температура (RT). Двата вида лаккази са имобилизирани на повърхностите на електродите идентично и количеството на ензима по отношение на ензимните единици е идентично. След електрохимичните измервания ензимните електроди се изплакват с ултрачиста вода и се съхраняват при 4°C, когато не се използват. Регенерацията на работните ензимни електроди може да се извърши след механично отстраняване на ензимно-полимерния слой след процедура на полиране и следване на горните стъпки.

2.2. Иmobилизация на ензим каталаза върху стъклени подложки

За целта се използват стъклени подложки за микроскопски препарати, които преди ензимната имобилизация се почистват чрез промиване с етанол, промиват се с ултрачиста вода и се подлагат на ултразвукова обработка за 3 минути, след което се изсушават на въздух. Върху подготвените подложки се нанася чрез накапване пряко приготвен разтвор на каталаза с концентрация 5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ във фосфатен буфер с рН 7.0 и престояват в хладилник при 4°C в продължение на 2 часа до трикратно намаляване на обема на течността. След това върху третираната с каталаза подложка се добавя 0.5 mM глутаров алдехид, като се спазва съотношение с ензимния разтвор 2:1 (на всеки 10 μl ензимен разтвор се добавя порция от 5 μl омрежващ агент). Получената реакционна смес се оставя да прореагира в хладилник при 4°C в продължение на 24 часа.

2.3. Електроприсаждане на ензим каталаза върху златен електрод

Използва се златен електрод предварително почистен съгласно точка 2.1, след което е необходимо неговата повърхност да бъде модифицирана с нитрофенилни групи, съобразено в следващите стъпки.

За прикрепване на нитрофенилни групи върху златният електрод, протича циклична волтаперометрия от 0.6V до -0.6V срещу Ag/AgCl (3 M KCl) и скорост 0.2 V/s в разтвор на 0.1 M BF_4NBu_4 и 2mM диазониева сол разтворени в безводен

ацетонитрил. Електрохимичната модификация се повтаря двукратно, за да могат нитрофенилните групи да се отложат на повърхността на златния електрод, след което електродът се промива с вода и протича нова циклична волтамперометрична редукция с 0.1 M разтвор на KCl в етанол/вода (1:9) от 0 до -1.4 V и скорост 0.1 V/s. По този начин нитрофенилните групи от първата редукция на златния електрод се трансформират в аминифенилни групи и се формира аминифенилен модифициран златен електрод.

Необходимо е модифицираният електрод да се потопи в 1 mM разтвор на меркаптохексанол (МН) в етанол за една нощ, за да могат местата, които са останали немодифицирани на повърхността на електрода да се модифицират с така наречения „спейсър“ и да се генерира аминифенил-МН слой.

2.4. Ковалентно имобилизиране на каталазата върху електрохимично модифицираният златен електрод

Ковалентно имобилизиране на каталазата върху електрохимично модифицираният златен електрод се постига чрез образуване на амидни връзки между групите на карбоксилната киселина на ензима и аминогрупите на функционализираната повърхност на златния електрод. В този случай 10 μ L разтвор на ензима (8,9 μ g/ml) в 0.1 M фосфатен буфер, pH=6.0) се добавят към 400 μ l 10 mM разтвор на 2-(N-морфолино) етансулфонова киселина (MES) (pH=6.0), съдържащ 36 mM 1-(3-диметиламинопропил)-3-етилкарбодиимид хидрохлорид (EDC) и 17 mM N-хидроксисукцинимид (NHS). Електродът се потапя в този разтвор за 2 часа след което се промива с 10 mM разтвор на 2-(N-морфолино) етансулфонова киселина и вода.

3. Електрохимично характеризиране на модифицираните стъкловъглеродни или златни електроди

За целта три-електродна електрохимична клетка състояща се от: 1) работен (немодифициран или модифициран стъкловъглерод; или златен електрод с електроприсадена каталаза); 2) сравнителен- ($Ag/AgCl$, sat. KCl); и 3) спомагателен електрод (Pt пластина) и съдържаща 10 ml фонов електролит (0.1 M фосфатен буфер, pH = 7.0, или 0.05 M цитратен буфер съдържащ 0.1 M $NaClO_4$, pH = 4.0), се свързва към електрохимичната станция Autolab 302N. Посредством специализирания софтуер на апарата се задава метод „циклична волтамперометрия“ и се задават конкретни работни стойности на параметрите: начален и краен потенциал, брой сканирания, скорост на сканиране и работен диапазон на тока. Регистрират се цикличните волтампърни криви – зависимостта на тока от потенциала на работния електрод, като последния се изменя по линеен закон с времето в права и обратна посока (циклично). След установяване на фоновите зависимости, в клетката се добавя определен обем (μ l) от разтвора на изпитваното електрохимично активно вещество (0.12 M H_2O_2 , или 10 mM разтвори на катехол, пирогалол, резорцинол, кафеена или галова киселина) и волтампърните криви на електрода при тези условия се регистрират отново по гореописания начин. При необходимост, електролитът се продухва с химически чист аргон (99.99%) преди измерванията.

Експерименталната постановка за извършване на изследванията с диференциална импулсна волтамперометрия е аналогична, с тази разлика, че се задават допълнително скорост на сканиране ($v = 0.07 \text{ V.s}^{-1}$), амплитуда ($E = 25 \text{ mV}$) и продължителност на импулса ($t = 50 \text{ ms}$) и работен диапазон на тока. Регистрира се волтамперна крива – зависимостта на ΔI (разликата между тока, регистриран

преди налагането на импулса и тока регистриран в края на наложения импулс) от потенциала на работния електрод.

Стационарните концентрационни зависимости се получават при аналогични условия. Задава се постоянен работен потенциал, E (V) и се изчаква установяване на стационарен фонов ток, I_0 (μA). След неговото стационариране, в клетката се добавя определен обем (μl) от разтвора на изследваните вещества ($0.12 M H_2O_2$; или $10 mM$ разтвори на катехол, пирогалол, резорцинол, кафеена или галова киселина) и се отчита новата стойност на стационарния ток I_s (μA) в резултат от добавянето на анализа. Хроноамперометричните измервания се извършват при постоянно разбъркване с ротиращ дисков електрод (500 rpm за изследвания с лакказен биосензор или 2000 rpm при изследване каталитичната активност на имобилизирана каталаза) при стайна температура от $20 \pm 1^\circ C$. Когато е необходимо, буферите се продухват или с химически чист аргон (99.99%), или с въздух по време на измерванията.

4. Сканираща електронна микроскопия (SEM)

Повърхностната морфология на имобилизираната с помощта на свързващ полимер Nafion каталаза върху стъклени подложки, беше изследвана със сканираща електронна микроскопия. На характеризиране са подложени два вида образци, на които са направени микроскопски фотографии и извършен елементарен анализ

- образец от имобилизирана каталаза, която не е използвана за каталитични експерименти;
- образец от имобилизирана каталаза, която е използвана за каталитично разлагане на H_2O_2 .

Образците бяха нанасяни чрез накапване върху стъклени подложки с приблизителни размери $2,5 \times 1,2$ cm. Преди микроскопското наблюдение бяха покрити със слой от катодно изпарено злато за осигуряване на висока проводимост на повърхността.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изследване кинетичните параметри на каталаза с различен произход

1.1. Ензимната активност на каталази от различни източници в хомогенна и хетерогенна среда

С оглед конструиране на биосензора, е необходимо да се определи подходящия тип каталаза въз основа на нейните каталитични характеристики. В тази връзка се изследва каталитичната активност на каталази, изолирани от различни източници – от плесени (*Pen. chrysogenum*), от бактерии (*Micrococcus lysodeictikus*) и една от черен дроб на бозайник. В настоящото изследване е използвана каталаза получена посредством биотехнологичен процес при култивиране на мутантен щам от *Penicillium chrysogenum*, предоставена от проф. Илия Илиев. Другите два ензима – каталаза от говежди черен дроб и каталаза от *Micrococcus lysodeictikus*, са търговски продукти, закупени от Sigma-Aldrich.

Проведе се сравнителен анализ на активностите на нативните ензими, които впоследствие са имобилизирани с оглед получаване на хетерогенен биокатализатор за многократна употреба. В таблица 1 са показани резултатите от определянето на ензимната активност на всички изследвани ензими в хомогенна и хетерогенна среда.

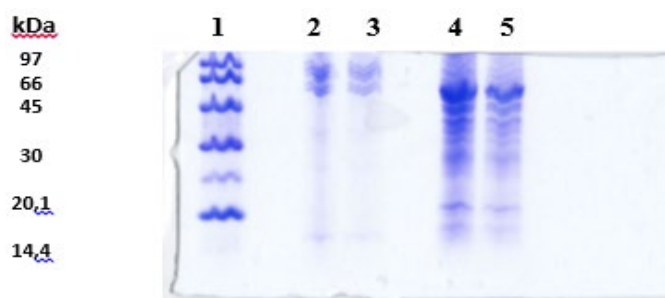
Таблица 1. Изходна ензимната активност на ензимни препарати на каталаза от три различни източници (U/mg продукт).

Каталаза	Активност в ензимния препарат	Специфична ензимна активност (U/mg белтък)
Плесенна (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	258 550 ± 50 U/mg	5910(U/mg белтък)
От говежди черен дроб (Bovine liver)	1 146 427 ± 30 U/mg	18650(U/mg белтък)
Бактериална (<i>Micrococcus lysodeictikus</i>)	130 700 ± 50 U/ml	191(U/mg белтък)

След извършения сравнителен анализ на каталитичната активност на ензимите, двата най-активни ензима – каталаза от животински произход и каталаза от плесенен източник, бяха подложени на електрофореза с оглед определяне на техните молекулни маси, прилики и разлики в субединиците им. Третият изследван ензим – каталаза от бактериален произход (*Micrococcus lysodeikticus*), под формата на ензимен разтвор (Sigma-Aldrich), не беше подлаган допълнително на електрофоретични изследвания и беше използван във вида, в който е закупен.

И двата ензима бяха получени в кристално състояние и анализирани с SDS-PAGE електрофореза. По този начин може да бъде оценена чистотата на протеиновите проби и може да се проследи ходът на фракционирането или процедурата за пречистване.

От представените резултати (Фиг. 1) е видно, че двата ензимни препарата се различават по своята хомогенност: плесенната каталаза има еднороден състав, в който се различават две високомолекулни фракции – с молекулни маси съотв. ок.60 кДа и ок. 50 кДа, съответстващи приблизително на масата на една каталазна субединица (обичайната структура на каталазата е тетрамер). Животинската каталаза се състои от поне 4 различни фракции, като преобладаващо присъствие има фракцията с молекулна маса от ок. 55 кДа, т.е. отново се наблюдава „разпадането“ на каталазния тетрамер до отделни субединици. Останалите по-нискомолекулни фракции вероятно се дължат на наличието на други белтъци в ензимния препарат (напр. изоензими или др. протеини).



Фигура 1. Трис-трицинова SDS-PAGE на каталази от *Penicillium chrysogenum* и говежди черен дроб при 4 % концентриращ гел и 12 % разделящ гел.

Легенда: 1 – маркер (5 µl); 2 – 50 кратно разреждане на *Pen. chrysogenum*; 3 – 100 кратно разреждане *Pen. chrysogenum*; 4 – 50 кратно разреждане каталаза от говежди черен дроб; 5 – 100 кратно разреждане на каталаза от говежди черен дроб.

Маркер (Amersham – LMW): фосфорилаза b – 97 kDa; говежди серумен албумин – 66 kDa; яйчен албумин – 45 kDa; анхидраза – 30 kDa; трипсинов инхибитор – 20,1 kDa; α-лакталбумин – 14,4 kDa.

Електрофоретичният анализ на ензимния препарат от *Penicillium chrysogenum* е повторен и с по-ниски разреждания и по-ниска концентрация на разделящият гел, за да могат да се повиши чувствителността на анализа, но резултатът остана без промяна.

2. Сравнителен анализ на кинетичните параметри на три типа каталаза, плесенна, бактериална и каталаза от говежди черен дроб

За определянето на кинетичните константи на трите изследвани ензима ($V_{\max}$ и K_m), се извърши по-задълбочен анализ на кинетичните криви. Получените зависимости на скоростта на реакцията от концентрацията на субстрата следват хиперболична тенденция, типична за кинетиката на Михаелис-Ментен. Константите бяха изчислени чрез регресионен анализ на зависимостите, нанесени в двойно-реципрочни координати (графика на Lineweaver-Burk), т.е. реципрочните скорости на ензимно-каталитичния процес спрямо реципрочната концентрация на субстрата и определените стойности на кинетичните константи са представени в таблица 2.

Таблица 2. Сравнение на кинетични параметри на каталази от различен произход.

Каталаза (хомогенни условия)	K_m (mM)	$V_{\max}$ (mol l ⁻¹ s ⁻¹)	Специфична ензимна активност, ×10 ³ Mmol l ⁻¹ min ⁻¹ mg ⁻¹
Плесенна (<i>Penicilium chrysogenum</i>)	112	9.90×10 ⁻⁴	5.91
Говежди черен дроб (Bovine liver)	121.32	9.02×10 ⁻³	18.65
Бактериална (<i>Micrococcus lysodeikticus</i>)	77.39	2.77×10 ⁻⁴	0.191

Спектрофотометричният метод е приложим за концентрации на H₂O₂ в микромолярния диапазон, докато титриметричният метод може да бъде приложен при по-високи концентрации на пероксида. В тази връзка се определи ензимната активност на каталазата в отсъствие и в присъствие на алифатни алкохоли. Получените резултати от това изследване са представени в таблица 3. Каталитичните активности на трите изследвани каталази са приети за еталонни. Към реакционната смес се добавят нискомолекулни алкохоли – метанол или етанол, и се проследява ефекта им върху ензимната активност.

Изследванията са проведени в присъствието на 1, 3, 5 или 10% алкохол. Установено е, че каталазата от *Micrococcus lysodeikticus* губи своята активност при добавянето на всеки алкохол, а каталазите от *Penicillium chrysogenum* и биволски черен дроб показват, че и двете каталази – плесенна и говежди черен дроб, запазват своята ензимна активност в значителна степен в присъствието на ниски концентрации на алкохоли (1% етанол или метанол), но с нарастващи концентрации, двата алкохола имат денатуриращ ефект върху ензимите и те губят своята активност.

Аналогично, зависимостта на хомогенната каталитична активност на каталаза от говежди черен дроб беше изследвана като функция от концентрацията на етанол и метанол в реакционната среда. Експерименталните резултати показаха по-ниска стабилност на говеждата каталаза в сравнение с плесенната.

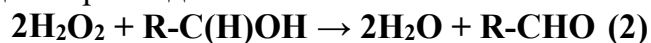
Таблица 3. Ензимна активност на каталаза от плесенен произход (*Pen. chrysogenum*) в присъствие на етанол и метанол в реакционната среда.

Каталаза <i>Pen. chrysogenum</i>	Асп U/mg протеин, контрола	Контрола, %	Асп U/mg протеин	Ензимна активност при 1% алкохол	Асп U/mg протеин	Ензимна активност при 3% алкохол	Асп U/mg протеин	Ензимна активност при 5 % алкохол	Асп U/mg протеин	Ензимна активност при 10 % алкохол
Етанол	8.57	100	7.41	86.50	7.07	82.46	5.43	63.44	0	0
Метанол	8.57	100	8.40	98.03	6.08	70.93	4.94	57.66	4.94	57.66

От литературата е известно, че някои каталазни ензими притежават в допълнение към каталазната активност (уравнение 2):



и подобна на пероксидаза активност (уравнение 2), която се проявява чрез способността на каталазата да окислява ниски концентрации на донори на водород в присъствието на водороден пероксид:



Увеличаването на каталитичната активност на плесенната каталаза в разтвор до 83% в присъствието на 1% метанол е проява на пероксидазна активност на този ензим, която обяснява забележимото повишаване на каталитичната активност. От друга страна, получените данни за каталазата от говежди черен дроб предполагат, че тя не проявява пероксидазна активност при еквивалентни експериментални условия. Активностите на двете каталази намаляват с увеличаване на процента на различни алкохоли, но каталаза от *Pen.chrysogenum* е по-стабилна от каталазата от говежди черен дроб. Остатъчната активност на плесенната каталаза нативен ензим е установено, че се запазва приблизително 83%, докато за каталазата от говежди черен дроб 58% в присъствието от метанол спрямо изходната активност. Ситуацията е различна, когато към реакционната смес се добави етанол – активността на каталаза от *Pen. chrysogenum* е 64% спрямо изходната, а тази на каталазата от говежди черен дроб е 60%, което предполага, че плесенната каталаза проявява по-голяма стабилност при наличието на алкохоли, отколкото каталаза от говежди черен дроб.

В следващите ни изследвания на каталитичната активност на ензима в хетерогенна среда беше избрана плесенната каталаза, която беше имобилизирана върху полизахариден биополимер – водонеразтворим глюкан URE 13-300, като резултатите са представени в таблица 4. Представена е остатъчната ензима активност на плесенна каталаза имобилизирана върху водонеразтворим глюкан след

експозиция на ензима за 30 минути под влияние на 1 и 5 процента, респективно метанол и етанол.

Таблица 4. Ензимна активност на плесенна каталаза от *Pen. Chrysogenum*, имобилизирана върху глюкан URE13-300 в присъствието на метанол или етанол.

Алкохол	Концентрация на алкохол, %		
	0	1	5
	Остатъчна ензимна активност, %		
Етанол	100	100	76.1
Метанол	100	98	63.5

В нашето изследване резултатите показват, че при концентрация над 5% етанол плесенната каталаза напълно губи своята активност, а при експозиция на 10 % метанол я запазва до около 60%. По-различна е ситуацията с каталаза от говежди черен дроб. Резултатите ясно показват, че ензимът трудно запазва активност дори при концентрации на органичен разтворител до 3%, което води до загуба на активност около 50%.

В други проучвания също се наблюдава значително инхибиране при третиране на каталаза с органични разтворители. В своето изследване Агтез и Каракус (2022) докладват, че изолираната и пречистена от тях каталаза от *Aspergillus fumigatus* запазва своята каталитична активност до около 80% спрямо изходната на неимобилизиран ензим, при 5% етанол, както е и в нашето изследване. С нарастване на концентрацията на органичен разтворител, се наблюдават съществени разлики. В научният труд на Агтез и Каракус (2022), каталазата от *Aspergillus fumigatus* запазва каталитична активност до около 70% и за двата органични разтворителя. За каталазата от *Aspergillus fumigatus* се докладва, че запазва каталитична активност дори в присъствие на 20% органичен разтворител, запазвайки между 40 и 80% активност.

Наблюдава се съществена разлика в кинетичните параметри. При каталаза от *Aspergillus fumigatus*, авторите докладват стойности на K_m и V_{max} определени съответно като 7,4 mM и 1250 $\mu\text{mole min}^{-1} \text{L}^{-1}$, докато данните от нашето изследване показват по-високи стойности на K_m и V_{max} за каталаза от *Pen.chrysogenum* съответно 112 mM и $9.90 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

3. Имобилизирание на каталаза върху полизахарид URE 13-300

Полизахаридът URE 13-300 е хомополизахарид от глюканов тип, водонерастворим. Получен е в резултат на ензимна реакция с помощта на гликозилтрансфераза URE13 300 с молекулна маса 300 kDa. Методът е описан в патент №67404B1, като резултат се получава водонерастворим глюкан, който може да се използва като носител на биологично-активни вещества (БАВ) при получаване на продукти с пролонгиращо действие.

Изследваните плесенна каталаза, каталаза от говежди черен дроб и бактериална каталаза се имобилизираха върху водонерастворимия глюкан URE13-300 по следната процедура: приготвя се разтвор на всяка от изследваните ензими с изходна активност между 100 и 200 U/mg сух ензимен препарат в 50 mM натриево фосфатен буфер с pH 7,5. Към различни количества от пречистен и лиофилизиран

водонерастворим глюкоза (от 0,5% до 5%) се прибавя разтвора на каталаза при тотална ензимна активност от 50-100 U/ml. Композицията се хомогенизира и инкубира за 24 часа при 4°C. Успоредно се приготвя контрола, която не съдържа изследвания полизахарид. Глюкозата със свързаната каталаза се отделя от пробите чрез центрофугиране при 3000 об/мин. за 10 минути. Количеството имобилизирана каталаза се определя по остатъчната ензимна активност в надутаечната течност при субстрат H_2O_2 по титриметричния метод описан в дисертационния труд.

Най-добри резултати за имобилизираната каталаза се регистрираха за плесенната каталаза. Постигната е физична имобилизация на каталаза върху 3% концентрация на водонерастворимия полизахарид от 35%. При тестване активността на имобилизираната каталаза се установи, че над 95% от активността се запазва след съхранение при 4°C за 30 дни и над 70% от активността се запазва за 60 дни при същите условия на съхранение.

При допълнителни проучвания, проведени с имобилизирана плесенна каталаза разкриват, че поради обратимия характер на имобилизацията, пероксидазно-подобната активност на плесенната каталаза се наблюдава само в присъствието на 1% метанол, докато същата концентрация на етанол причинява значителна загуба на каталитична активност на ензима (Таблица 5)

Таблица 5. Кинетични константи на имобилизирани върху URE 13 300 каталази от плесенен, говежди черен дроб и бактериален произход.

Каталаза (имобилизирана в/у URE 13 300)	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Плесенна (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	109.4	14.42
Говежди черен дроб (Bovine liver)	16.4	454.00
Бактериална (<i>Micrococcus lysodeikticus</i>)	24.4	75.73

Получените резултати показват, че ензимът, изолиран от плесени, е по-устойчив в среда с алкохол от ензимите, получени от еукариотни организми. Така имобилизираната каталаза показва забележителна стабилност на денатурация в присъствието на агресивни химични агенти като етанол и метанол.

Биохимичната характеристика на изследваните каталази показва, че:

- Бактериалната каталаза не толерира присъствието на двата алкохола, докато ензимът от плесенен произход показва активност, подобна на пероксидаза, най-забележима в присъствието на до 1% добавен метанол. При същите условия каталазата от говежди черен дроб запазва известна активност.
- Иmobилизираната плесенна каталаза е по-стабилна в присъствието на алкохоли, отколкото разтворения ензим, и задържа около 76% в присъствието на 5% метанол, докато в присъствието на същата концентрация на етанол, остатъчната хетерогенна активност на ензима е 63,5%.

4. Електрохимично изследване на каталитичната активност на имобилизирана каталаза с различен произход

Електрохимичните методи са подходящи за изследване на окислително-редукционни процеси, като измерената сила на тока е пропорционална на скоростта на изследвания процес. При това, за разлика от спектрофотометричните и титриметричните методи, електрохимичните методи предоставят достатъчно висока чувствителност на определянията на аналити с концентрации в микро- и суб-микромолярния диапазон.

Експериментите бяха проведени в електрохимична клетка с работен обем от 20 ml в триелектродна конфигурация с Ag|AgCl, KCl sat. като сравнителен и Pt-фолио като противоелектрод. Концентрацията на H₂O₂ беше проследявана в хода на експериментите с помощта на чувствителен към водороден пероксид електрод, който по-нататък ще бъде обозначаван като каталитичен пероксиден електрод, използван като индикаторен (работен) електрод. Измерванията бяха извършени при постоянен потенциал от -0,2 V (спрямо Ag|AgCl), при който електроредукцията на водороден пероксид протича със значителна скорост и без съществено влияние на конкурентната реакция на електрохимична редукция на кислород и при непрекъснато разбъркване с 2000 об/мин.

Електрохимичното определяне на активността на имобилизираната катализа се извършва на два етапа: абиотичен и биотичен. В първия етап, сигналът на работния електрод, беше регистриран като функция от концентрацията на водороден пероксид, която се увеличава постепенно чрез добавяне на аликвоти от изходен 0,1 M разтвор на H₂O₂. Резултатите от измерванията бяха използвани за построяване на калибровъчна графиката на пероксидния каталитичен електрод. Етапът на калибриране е обозначен в текста като абиотичен етап от експеримента.

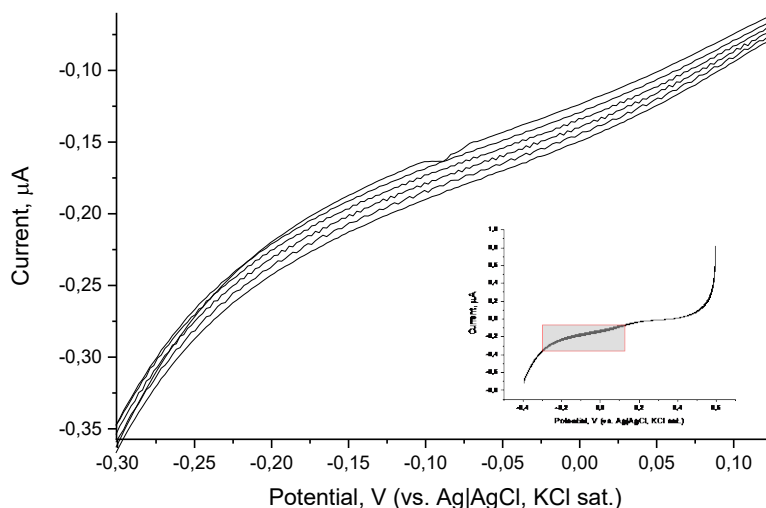
Във втория етап от изследването, наречен биотичен, експериментът се осъществи по идентичен начин, но в присъствието на стъклена подложка с имобилизирана катализа, поставена на дъното на електрохимичната клетка на ок. 0,8 cm разстояние от индикаторния електрод. Биотичната стъпка може да се повтори толкова пъти, колкото е необходимо в рамките на същия ден.

Известно е, че катализата е един от най-ефективните биокатализатори с брой на оборотите (каталитична ефективност) до 40 милиона в секунда (Smejkal, G. B., & Kakumanu, S. 2019). Широко приет метод за анализиране на неговата ензимна активност както в разтворено, така и в имобилизирано състояние, е проследяване на намаляване на концентрацията на H₂O₂ в стационарни разтвори, където пероксидът се разлага каталитично под дифузионен контрол, което потенциално може да доведе до подценени нива на ензимната активност. Имайки това предвид, за определяне на активността на имобилизираната катализа електрохимичните изследвания бяха провеждани при хидродинамични условия (разбъркване на разтвора с ротиращ дисков електрод, RDE).

Фигура 2 изобразява хидродинамичните линейни волтамограми, записани в присъствието на 0,46 mM водороден пероксид. Може ясно да се види, че в областта на потенциали от -0,3 V до + 0,2 V електрохимичната редукция на H₂O₂ преминава под дифузионен контрол. Очевидно редукционният ток се увеличава с увеличаване на скоростта на въртене на RDE от 500 до 3000 rpm. Установено е, че когато каталитичният електрод се върти при 2000 rpm, чувствителността на определянето на водороден пероксид се увеличава с около 25% в сравнение с определеното в статични условия. Освен това, увеличението на чувствителността не води до значително нарастване на нивото на шума. По-нататъшното повишаване на скоростта на въртене до 3000 rpm не доведе до значителни подобрения на чувствителността, но нивата на шум бяха много по-високи в сравнение с резултатите, получени при 2000 rpm.

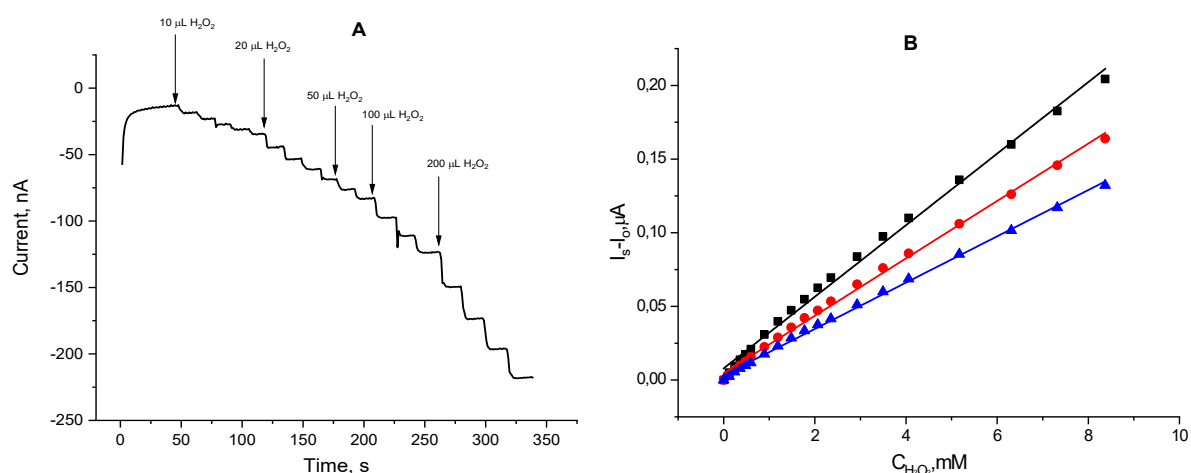
По време на хроноамперометричните експерименти, имащи за цел да определят каталитичната активност на имобилизирана катализа, извършена в неподвижни разтвори, не са отбелязани видими разлики между стойностите на тока, регистри-

рани в отсъствие и присъствие на каталаза до концентрация 4 mM H_2O_2 . Трябва да се спомене, че разликите в сигналите на електродите, получени в абиотичните и биотичните етапи, стават очевидни само ако работният електрод се върти със значителна скорост, като по този начин намалява ефекта от дифузията на H_2O_2 през електролита. Този факт несъмнено показва, че дифузията на ензимния субстрат е скоростоопределящ етап на разлагането на H_2O_2 , катализирано от имобилизирана каталаза. Всички обсъждани по-нататък резултати бяха извършени при 2000 rpm скорост на въртене на работния електрод.



Фигура 2. Хидродинамични линейни волтамограми, записани в присъствието на 0,46 mM водороден пероксид върху каталитичния пероксиден електрод; скорост на въртене, об/мин: 500; 832; 1248; 1748; 2332 и 3000; електролит: 0.1 M фосфатен буфер, pH = 7.0; температура: 21 ± 1 градуса.

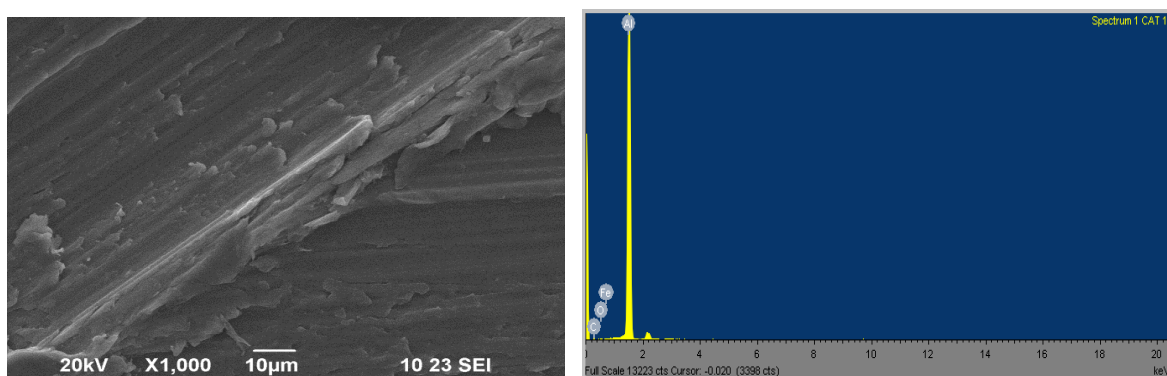
Зависимостта на реакцията на каталитичния пероксиден електрод от концентрацията на пероксид е представена на Фиг. 2 В. Може да се види, че сигналът при една и съща концентрация на пероксид е по-нисък, когато по време на измерванията присъства имобилизирана каталаза (фиг. 3 В, синя и червена серия).



Фигура 3. А) Автентичен запис на текущата промяна с времето при добавяне на аликвотни части от водороден пероксид; работен потенциал: -0,20 V (спрямо Ag|AgCl, наситен KCl), РВ, pH = 7,0; **В)** Зависимост на реакцията на каталитичен пероксиден електрод от концентрацията на водороден пероксид в електрохимичната клетка в отсъствие (черна серия) и в присъствието на 0,25 mg каталаза, имобилизирана във филм от Nafion (червена серия) и омрежена с глутаров алдехид (синя серия).

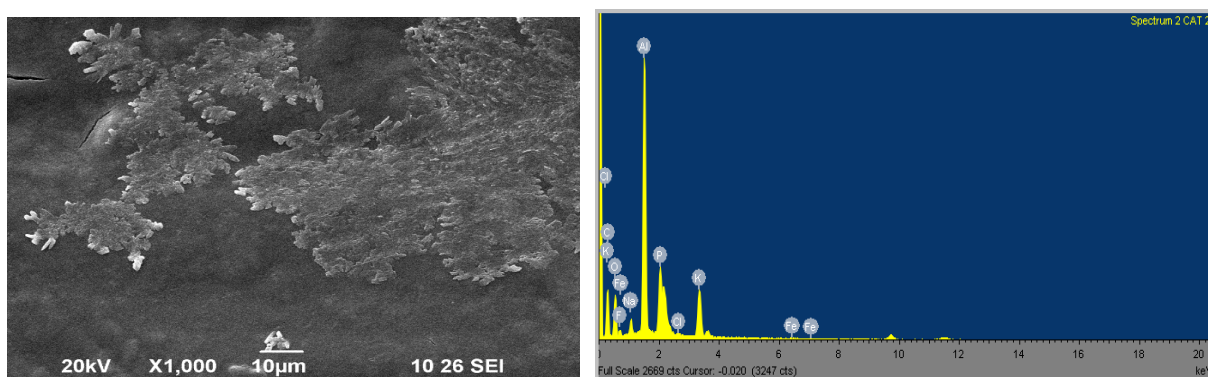
Наблюдаваният ефект е резултат от намалената концентрация на H_2O_2 в непосредствена близост до повърхността на електрода поради каталитичното диспропорциониране на последния. Разликата между тока, регистриран в абиотичната и биотичната фаза при еквивалентни други условия, е право пропорционален на скоростта на диспропорциониране на H_2O_2 , катализирано от имобилизирана каталаза.

Имобилизираният ензим не може да бъде използван повторно, поради значителна загуба на ензимна активност при повторен цикъл от биотични експерименти. Проучвания със сканираща електронна микроскопия, комбинирана с енергийно дисперсионна рентгенова спектроскопия (SEM-EDX), потвърдиха, че след един експеримент количеството ензим, задържано в полимерния филм, е незначително. На Фигура 4 са представени SEM микрографии на имобилизирана каталаза с продуцент *Penicillium chrysogenum* в полимерен слой от Nafion върху проводима подложка и съответният EDX спектър.



Фигура 4. SEM изображение на имобилизирана каталаза (ляво) преди употреба при каталитично диспропорциониране на H_2O_2 и съответният EDX спектър (дясно), показващ присъствието на желязо от активния център на ензима.

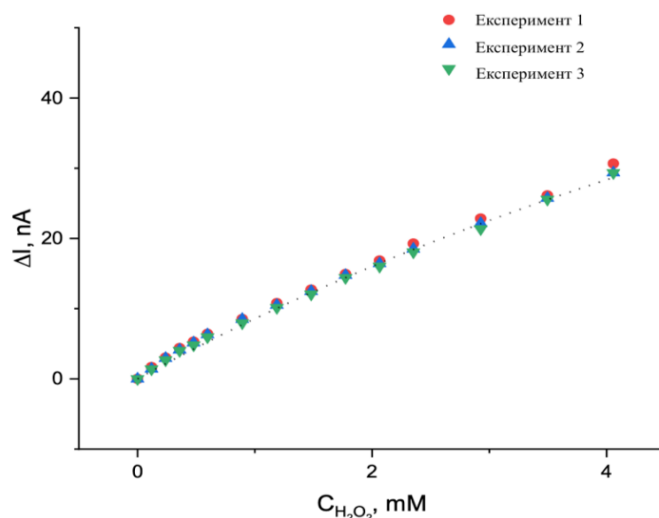
Чрез сравнение на Фиг. 4 и Фиг. 5 става очевидно, че полимерният слой с имобилизираната каталаза се разрушава по време на каталитичното действие и се превръща в напукан и с дендритни образувания слой, както се вижда от фиг. 4. Анализът на EDX спектрите разкрива, че присъствието на каталаза – Fe-съдържащ ензим, може да се визуализира в спектъра чрез Fe – пика, представящ 0,7 атомни % в случай на неизползвана имобилизирана каталаза (фиг. 4), а само следи от Fe без възможност за количественото му определяне могат да се наблюдават в случай на вече използван хетерогенен биокатализатор (фиг. 5).



Фигура 5. SEM изображение на имобилизирана каталаза (ляво) след един цикъл на каталитично диспропорциониране на H_2O_2 и съответният EDX спектър (дясно), показващ отсъствието на ензим.

Най-вероятно ензимът преминава в разтвора по време на каталитичния експеримент. Като се има предвид това, може да се предположи, че по-високата каталитична активност, наблюдавана при използване на имобилизирана чрез омрежване каталаза, е кумулативен резултат от хомогенно (в разтвор) и хетерогенно разлагане на H_2O_2 , докато в случая на каталаза, имобилизирана в полимерен филм, наблюдаваната каталитична активност се дължи най-вече на хетерогенното диспропорциониране на пероксида.

Всички тези резултати поставят въпроса доколко възпроизводими са измерванията, ако всеки биотичен експеримент се нуждае от пряко приготвен хетерогенен биокатализатор. На фиг. 6 са изобразени експерименталните резултати, получени от три последователни измервания с 3 еднакво подготвени стъклени подложки с имобилизирана каталаза върху тях.



Фигура 6. Разлика между електродния сигнал, получен в абиотичен стадий и в биотична фаза като функция на концентрацията на водороден пероксид, при която е записан за 3 независими измервания. RSD = 1,96 %.

Очевидно е, че експерименталните точки практически се наслагват една върху друга, а отклонението от средната стойност не надвишава 2%.

5. Електрохимично изследване на каталитичната активност на имобилизирана каталаза в присъствие на алифатни алкохоли

В края на 90-те Магнер и Клибанов (Magner, E., and Klivanov, A. M., 1995) докладват за необичайната каталитична активност на разтворената каталаза, която имитира тази на ензима пероксидаза, като са открили, че ензимът е способен да окислява алкохоли в присъствието на водороден пероксид.

Използвайки същия електрохимичен подход, успяхме да проследим каталитичното поведение на имобилизираната каталаза в присъствието на до 1% алифатни алкохоли с ниско молекулно тегло – етанол и метанол, поради техният денатуриращ ефект върху ензима при по-високи концентрации.

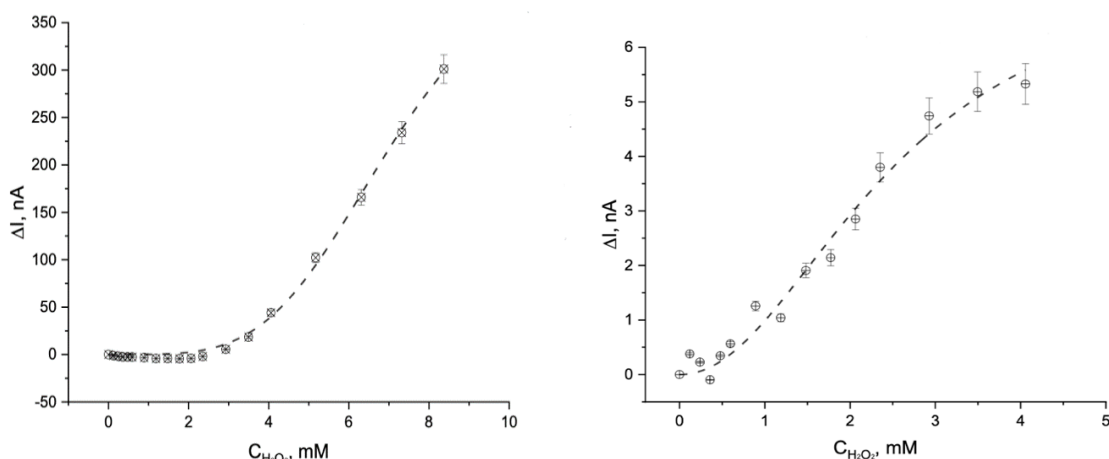
На Фиг. 7 е изобразена зависимостта на скоростта на разлагане на водороден пероксид (в наноампери) като функция от концентрацията, при която е измерена в присъствието на 0,5% и 1,0% етанол. Очевидно е, че типичната хипербола на Михаелис се превръща в сигмоидална крива, когато към електролита се добавят

малки количества алкохоли. Сигмоидната форма на зависимостта е характерна за алостеричните ензими, способни да свързват два различни субстрата в различни активни центрове, чиято кинетика се подчинява на уравнението на Хил:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]^n}{[K]_{0,5}^n + [S]^n} \quad (3), \text{ където:}$$

- V е скоростта на ензимно-катализираната реакция;
- V_{max} е максималната скорост, постижима при насищане на ензима със субстрата,
- $K_{0,5}$ е константата на Hill, която представляваща концентрацията на субстрата, при която се достига $\frac{1}{2}$ от максималната скорост,
- n е коефициентът на Hill, показателен за кооперативността на свързване на субстрата.

За $n > 1$ кооперативността е положителна, т.е. всяка свързваща субстратна молекула улеснява свързването на следващата субстратна молекула; за $n = 1$ няма кооперативно свързване на субстрата и уравнението на Хил се превръща в уравнението на Михаелис-Ментен, докато за $n < 1$ има отрицателна кооперативност, където всяка молекула на субстрата на връзката възпрепятства свързването на следващата.



Фигура 7. Разлика между електродния сигнал, получен в абиотичен стадий и в биотична фаза в присъствие на имобилизирана каталаза от *Penicillium chrysogenum*, като функция от концентрацията на водороден пероксид, при която е записан в присъствието на 0,5% (ляво) и 1,0% (дясно) етанол.

Привидните кинетични константи, изчислени от нелинейната регресия на експерименталните данни, изобразени на Фиг. 6, са представени в таблица 6. Очевидно е, че привидните кинетични константи са силно зависими от вида на ензимната имобилизация – определената привидна V_{max} при липса на алкохол е приблизително два пъти по-висока за омрежената каталаза в сравнение с тази, внедрена в полимерната мембрана. Може да се види обаче колко пагубно за ензимната каталитична активност е добавянето на алкохол към работната среда – омрежената каталаза проявява повече от 40 пъти по-ниска привидна V_{max} в присъствието на 1% етанол, което е драстична загуба на активност, особено в сравнение с каталаза, имобилизирана чрез улавяне в полимерна мембрана при еквивалентни експериментални условия. Това откритие подкрепя издигнатата по-рано хипотеза, че омреженият ензим почти не се задържа върху стъклената подложка и най-вероятно изтича в разтвора, като по този начин показва смесена активност – хетерогенна и хомогенна.

Интересно е, че наличието на 0,5 % етанол в разтвора причинява приблизително 5-кратно увеличение на привидната максимална скорост, докато привидната константа на Хил остава достатъчно близка до константата на Михаелис, определена в отсъствието на алкохол. Коефициентът на Хил се оценява на 4, което не е неочаквано, тъй като ензимът каталаза обикновено съществува като тетрамер. Чрез увеличаване на алкохолното съдържание до 1,0%, изчисленият коефициент на Хил пада до 2, привидната V_{max} намалява драстично и привидният $K_{0,5}$ намалява значително, което може потенциално да показва увреждане на протеина.

Таблица 6. Сравнение на привидните кинетични константи на имобилизираната каталаза от *Penicillium chrysogenum*, имобилизирана в Nafion мембрана или омрежена с glutaraldehyde, определени електрохимично при разлагане на водороден пероксид в отсъствието и в присъствието на 0,5% и 1% етанол.

Каталаза <i>Penicillium chrysogenum</i> имобилизирана във филм от Nafion®			
Кинетични константи	Воден буфер, pH = 7.00	0.5 % етанол	1 % етанол
K^{app} , mmol L ⁻¹	10.1 ± 0.9	7.2 ± 3.5	2.5 ± 0.5
V_{max}^{app} nA μmol.s ⁻¹	87.9 ± 5.4 3.62x10 ⁻³ ± 2.2 x10 ⁻⁴	456.6 ± 41.4 18.8x10 ⁻³ ± 1.7x10 ⁻³	7.7 ± 1.5 3.17x10 ⁻⁵ ± 0.7 x10 ⁻⁵
Коефициент на Хил, n	1.0	4.11 ± 0.27	2.06±0.36
Каталаза <i>Penicillium chrysogenum</i> , омрежена с glutaraldehyde			
K^{app} , mmol L ⁻¹	13.1 ± 0.99	n.a.	1.85 ± 0.7
V_{max}^{app} nA μmol.s ⁻¹	181.2 ± 9.7 7.46x10 ⁻³ ± 4.0 x10 ⁻⁴	n.a.	4.10 ± 0.7 1.70x10 ⁻⁴ ± 2.9 x10 ⁻⁵
Коефициент на Хил, n	1.0	n.a.	3.36±1.25

Чрез прилагане на регресионен анализ на получените експериментални данни от електрохимични измервания, беше установено, че ензимната активност на имобилизираната каталаза се, подчинява на уравнението:

$$A_{sp} = \frac{(\Delta I_{abiot} - \Delta I_{bio}) \cdot 10^6}{s \cdot t} \frac{V}{m}, \quad (4)$$

Където:

- **A_{sp}** е специфичната ензимна активност, U/mg;
- **ΔI_{abiot}** и **ΔI_{bio}**, в [A], са разликите между тока, регистриран при дадена концентрация с изваден фонов сигнал за абиотичните и биотичните експерименти, съответно;
- **s** е чувствителността на електрода с каталитичен пероксид (наклон на графиката за калибриране, в [A L/mol]);
- **t** е времето, [min]; **V** е обемът на биореактора, mL;
- **m** е количеството на имобилизирания ензим [mg].

6. Сравнение на активността на имобилизирана каталаза, определена чрез електрохимични измервания и чрез спектрофотометрия

Сравнена е специфичната ензимна активност на имобилизирана плесенна каталаза, определена чрез електрохимичен и спектрофотометричен методи, представена в таблица 8. Електрохимично определената активност (при хидродинамични условия), е приблизително 200 пъти по-висока от тази, определена в статични условия, вероятно в резултат на засиления масов транспорт по време на из-

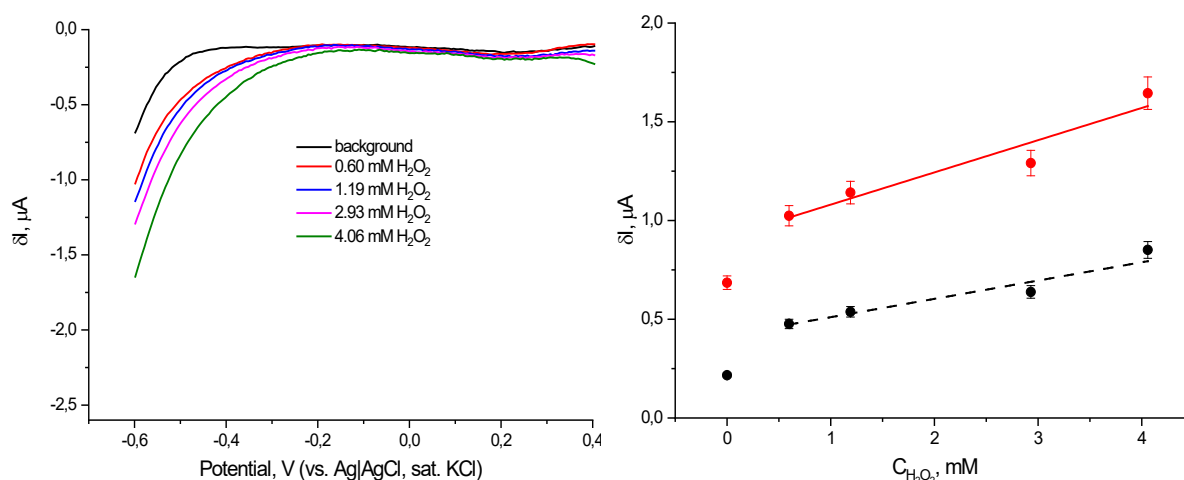
мерванията. Наличието на алкохоли усложнява процеса на измерване, тъй като етанолът и метанолът са повърхностно активни вещества, които влияят както на чувствителността, така и на прецизността на измерванията. Може да се види, че колкото по-висок е процентът на алкохол в работната среда, толкова по-голяма е дисперсията на данните. Анализът на данните показва, че наличието на 0,5% метанол повишава специфичната ензимна активност с приблизително 20%, което може да се разчете като проява на пероксидазна функция на каталазата. Такава тенденция не се наблюдава за същия процент етанол, което може да се отдаде на по-денатуриращото му действие върху протеина.

Таблица 7. Специфична ензимна активност на имобилизирана каталаза от *Penicillium chrysogenum*, определена електрохимично и спектрофотометрично, ($n \geq 3$).

	Електрохимично определяне	Спектрофотометрично определяне	Електрохимично определяне	Спектрофотометрично определяне
	Метанол		Етанол	
Алкохол, %	$A_{sp.}, \mu\text{mol. min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	$A_{sp.}, \mu\text{mol. min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	$A_{sp.}, \mu\text{mol. min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	$A_{sp.}, \mu\text{mol. min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
0	1672.6 ± 32.7	8.57	1672.6 ± 32.7	8.57
0.5	2033.8 ± 113.8	n.a.	1235.5 ± 143.0	n.a.
1.0	1076.3 ± 269.1	8.40	537.1 ± 127.5	7.41

Тук възниква и въпросът дали активността на имобилизираната каталаза може да бъде определена, ако ензимът е имобилизиран директно върху повърхността на електрод. Като се има предвид, че каталазата, за разлика от други металопротеини, се счита за електрохимично неактивна, бе избрана методика за ковалентна имобилизация върху златен електрод, за който е известно, че е електрокаталитично активен при електрохимичната редукция на кислорода, който се отделя в процеса на разлагането на водороден пероксид.

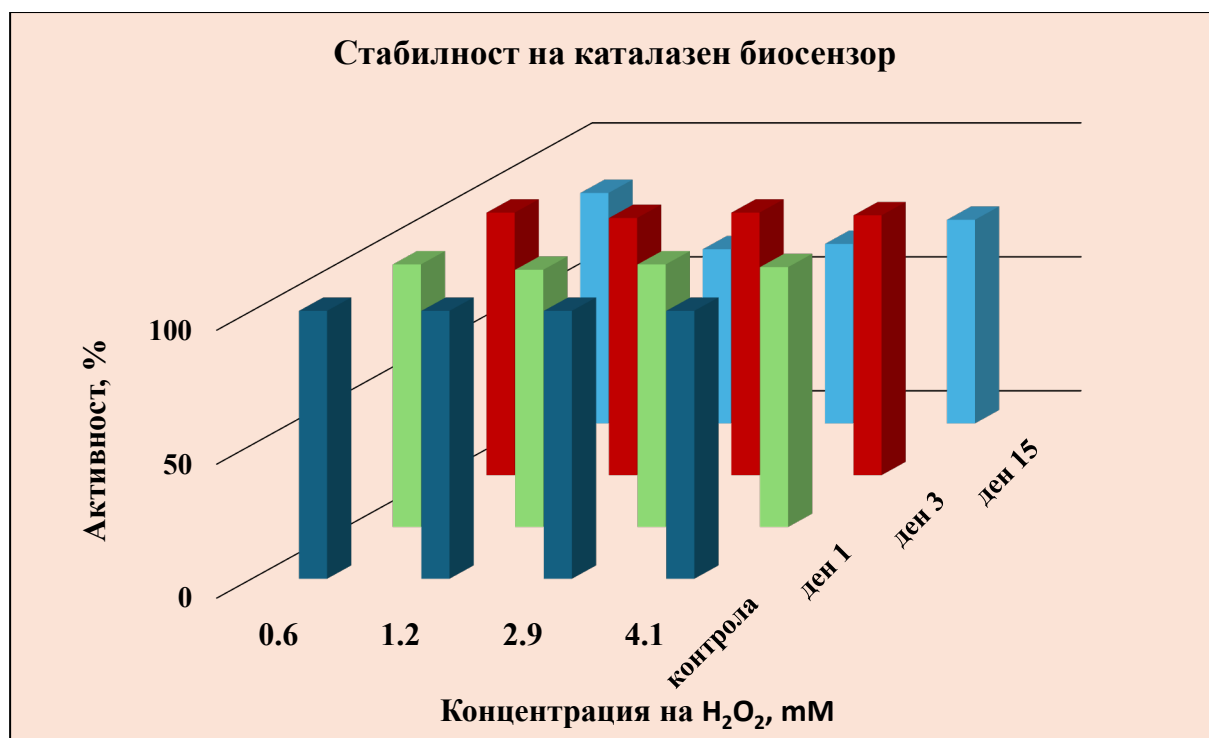
Диференциалните импулсни волтамограми на златен електрод с каталаза имобилизирана на повърхността му чрез електроприсаждане, записани в отсъствие и присъствие на H_2O_2 , са изобразени на фиг. 8.



Фигура 8. (Ляво) Диференциална импулсна волтамограма на златен електрод с ковалентно имобилизирана каталаза (чрез електроприсаждане) в присъствието на водороден пероксид при различни концентрации; (Дясно) зависимост на реакцията на електрода от концентрацията на H_2O_2 при потенциал $-0,5 \text{ V}$ (черна серия) и $-0,6 \text{ V}$ (червена серия).

Каталитичният ефект на златото при електрохимичната редукция на кислорода е ясно изразен при потенциали, по-отрицателни от -0,2 V, а увеличението на редукционния ток е очевидно при увеличаване на концентрацията на H_2O_2 в работната среда, което очевидно показва, че имобилизираната катализа е каталитично активна.

Определена е операционната стабилност на каталазен биоелектрод, представено на фиг. 9. Наблюдава се, че полученият биосензор запазва своята активност до 76 % след 15 дни на употреба и съхранение.



Фигура 9. Остатъчна ензимна активност на имобилизирана чрез електроприсаждане върху златен електрод каталаза като функция от концентрацията на водороден пероксид, измерена в деня на имобилизиране, на 3-ти и 15-ти ден.

7. Лакказа

В текущото изследване се използваха два ензимни препарата лакказа, от *Aspergillus oryzae* и *Trametes versicolor*. Предварителните данни за ензимните свойства на използваните лаккази са необходими като изходни при имобилизиране на ензима и включването му в биосензор.

Ензимът от *Aspergillus oryzae* е технически препарат с ензимна активност по спецификация на производителя Shannxi Honghao bio-tech Co., Ltd Китай не помалка от 11 000 U/g. За целите на нашето изследване се нуждаем от пречистена форма на ензима с висока специфична ензимна активност. В тази връзка приложихме различни методи за нейното пречистване и получаване.

7.1 Пречистване на техническа лакказа

7.1.1. Фракционно преципитиране с амониев сулфат

Проведе се фракционно преципитиране на лакказа от *Aspergillus oryzae* с насищане на белтъчния разтвор с амониев сулфат, отговарящи на процентно съотношение респективно 50, 60, 70, 80 и 100 %. Определена е ензимната активност

на пречистения ензим от всяка фракция в присъствието на ABTS като ензимен субстрат. Активността бе изследвана във водна среда (0,02 М Na-ацетатен буфер, pH = 4,6) при стайна температура, като се използва спектрофотометрично наблюдение, а получените резултати са представени в Таблица 8. Най-добри резултати показва пречистването на лакказа от *Aspergillus oryzae* при насищане с амониев сулфат 60%, при същите условия. Ензимът е пречистен до специфична ензимна активност от 315 U/mg протеин, като е постигнато общо 10,3-кратно пречистване, което е почти 2,5 пъти повече в сравнение с получените резултати на Kumar, R., и колегия (2016). Kumar, R., и колегия (2016), предлагат оптимизиран метод за производство на лакказа от *Aspergillus flavus*, пречистена с помощта на амониев сулфат при насищане 50 % и 60%. При тези условия, авторите докладват, че ензимната активност на 30 ml буферен разтвор на преципитат е 25,66 IU/ml с концентрация на белтък 0,048 mg/ml. Ензимът е пречистен до концентрация на белтък от 0.036 mg/ml с ензимна активност от 30.57 IU/ml, като е постигнато общо 4,24-кратно пречистване на суровия ензимен екстракт.

Таблица 8. Ензимна активност на лакказа *Aspergillus oryzae* след пречистване с амониев сулфат в присъствието ABTS като ензимен субстрат.

Амониев сулфат, %	V (ml)	А то-тал, U	Добив, %	А сп., U/mg Белтък	Добив спрямо А сп., %	Бел-тък, mg/ml	Оста-тъчна актив-ност, %	Степен на пречист-ване, U/mg
Контрола	33	2766	100	30.6	100	2.74	-	-
Изходен разтвор	10	2847	100	1409.6	100	0.202	-	-
50% насищане	16.5	660	24.0	84	6.0	0.44	23.0	2.75
60% насищане	37	933	34.0	315	22.0	0.08	33.0	10.3
70% насищане	7	129	5.0	194	14.0	0.09	4.5	6.3
80% насищане	6	76	3.0	125	9.0	0.1	2.7	4.1
100% насищане	28	484	18.0	35	2.5	0.5	17.0	1.1

7.1.2. Фракционно преципитиране с полиетилен гликол

Фракционното преципитиране с полиетилен гликол се проведе с цел да се подобри добивът на пречистен ензим с висока специфична активност. В таблица 9 са представени експерименталните данни от проведените анализ. Ние постигнахме добив от 60%, прилагайки PEG 6000 за преципитация на ензима. Въпреки, че добивът е със задоволителни резултати, се наблюдава фазово разделяне на ензима при различната степен на насищане с ПЕГ. По-голямо количество от ензима се наблюдава във фазата с ПЕГ 6000, докато при ПЕГ 1500 и 4000 ензимът е в буферната фаза. Като сравнение лакказа от *Cerena unicolor* е подложена на пречистване с полиетиленгликол с различна молекулна маса, и се докладва че добивът на възстановяване, постигнат в изследването е 97,4% след пречистване с PEG 6000 и фосфатен буфер (Antecka, A., et., al 2019).

Таблица 9. Ензимна активност на лакказа от *Aspergillus oryzae* след пречистване с полиетиленгликол.

ПЕГ, %	Разтвор	V, (ml)	A тотал, U	Добив, %	A сп., U/mg Белтък	Добив спрямо A сп., %	Степен на пречистване
Контрола	Изходен р-р на лаказа	60	12 153 424	100	2026	100	-
30 % ПЕГ 1500	Супернатант	108	899 424	7.4	833	41.12	0.4
	Преципитат	10	17 640	0.14	51	2.52	0.03
30 % ПЕГ 4000	Супернатант	105	1 665 720	13.7	793	39.41	0.4
	Преципитат	15	59 328	4.9	161	7.95	0.1
30 % ПЕГ 6000	Супернатант	60	166 935	7.35	159	7.85	0.1
	Преципитат	18	1 360 710	6.00	189	9.33	0.1
50 % ПЕГ 1500	Супернатант	125	4 275 000	35	488	24.08	0.24
	Преципитат	12.5	601 800	5	112	5.53	0.1
50 % ПЕГ 4000	Супернатант	122	792 146	6.5	130	6.42	0.1
	Преципитат	12	2 299 393	19	456	22.51	0.23
50 % ПЕГ 6000	Супернатант	65	136 500	1.12	151	7.45	0.1
	Преципитат	25	4 824 000	40	1206	59.53	0.6

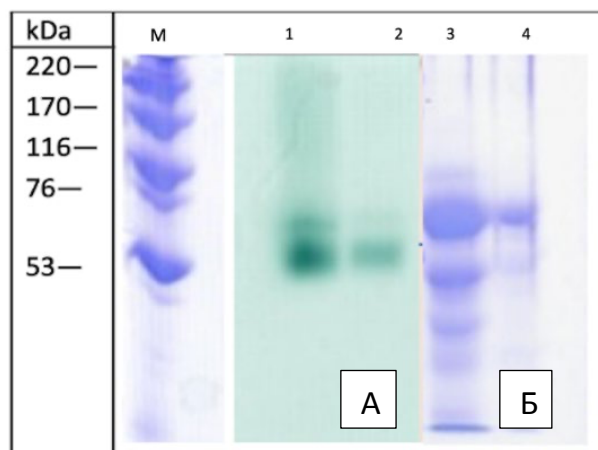
7.1.3. Определяне на молекулната маса с SDS-PAGE и провеждане на *in situ* анализ

Степента на пречистване на лакказата от *Aspergillus oryzae* се провери посредством ин ситу електрофоретичен анализ. Молекулната маса на пречистената лакказа с двата детергента е около 50 kDa.

8. Влияние на органични разтворители върху активността на лакказа

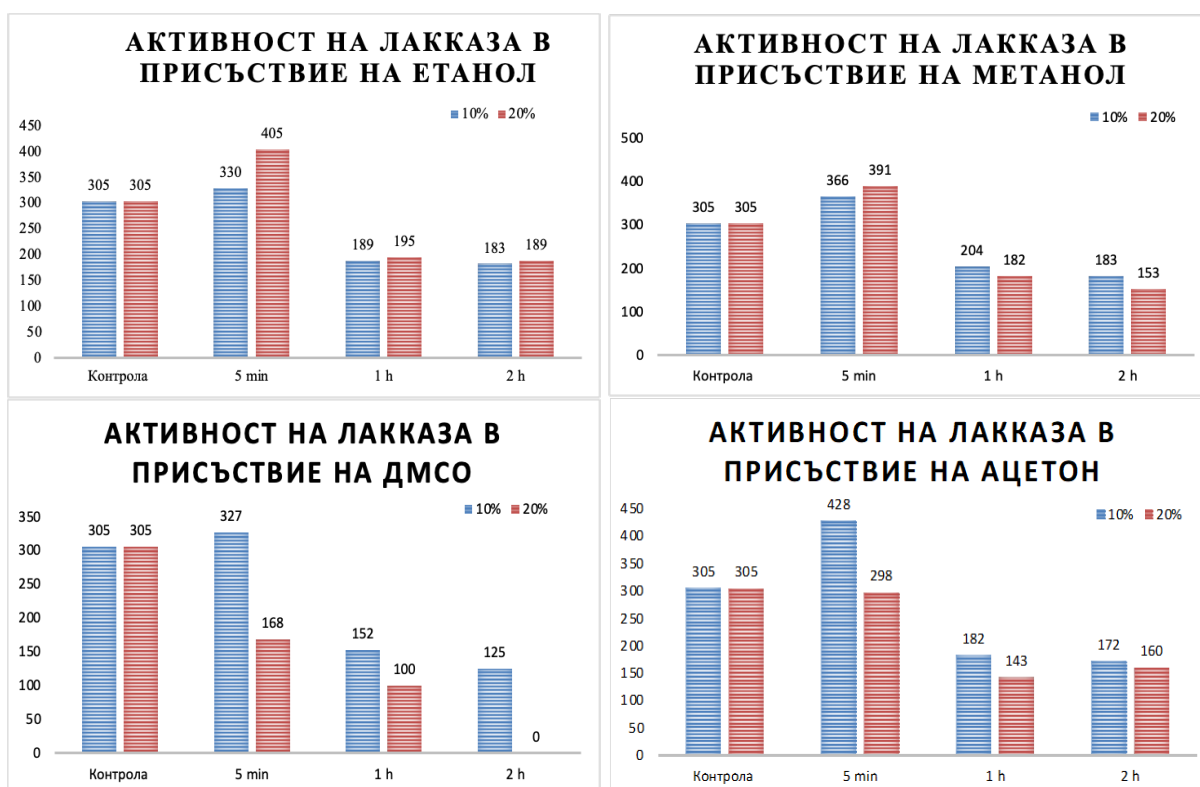
Ензимната активност на лакказа от *Aspergillus oryzae* и *Trametes versicolor* се провери в присъствие на органичен разтвор като метанол, етанол, ацетон и DMSO, за да бъде избран ензим с висока активност и стабилност за приложение в конструирането на биосензор. Установи се че лакказа от *Aspergillus oryzae* е твърде лабилна в присъствие на използваните органични разтворители като още при наличието на 1% етанол, метанол и ацетон и ДМСО тя се инактивира напълно. При проведените анализи със същите органични разтворители за лакказата от *Trametes versicolor* се установи, че тя запазва каталитичната си функция. Проведе се експеримент и в присъствие на 10 % и 20% от полярните органични разтворители, като беше варирана и продължителността на инкубирането на ензима в съответната среда.

На фигура 11 е съпоставено влиянието на всеки разтворител върху ензимната активност, като активността на лакказата, определена в отсъствие на органичен разтворител е приета за еталон.



Фигура 10. Определяне на молекулната маса на лаказа от *Aspergillus oryzae*, където: **А)** *in situ* NATIVE-PAGE на пречистена лакза от *Aspergillus oryzae* с полиетиленгликол, проявена с ABTS; **Б)** SDS-PAGE на търговски препарат на лаказа, проявена с Comassie Brilliant Blue R 250.

Легенда: – **1** – фракция на *Aspergillus oryzae* след пречистване с 50% полиетиленгликол 6000 и добив 60%; **2** – фракция на *Aspergillus oryzae* след пречистване с 30% полиетиленгликол 1500 и добив 40%; **3** – Контролна проба от търговски препарат от *Trametes versicolor* (Fluka); **4** – Контролна проба от търговски препарат от *Trametes versicolor* (Sigma); **М** – Амершам високомолекулен маркерен стандарт



Фигура 11. Влияние на органични разтворители върху активността на лаказа *Trametes versicolor* в началото на реакцията, първи и втори час от инкубацията на ензима.

Данните показват запазване на ензимната активност при добавяне на 10% или 20% от всеки органичен разтворител в първите 5 минути от реакцията. Това може да се приеме, че добавянето на органичен разтворител води до частично допълнително разхлабване структурата на ензима, която увеличава достъпа на субстрата до активния

център. Ензимната активност се редуцира до около 60% след един час на експозиция в разтвор с 10% етанол и метанол, а при ДМСО и ацетон се редуцира под 50%. Резултатите представени в таблица 10 показват, че ензимната активност на лакказа остава стабилна дори след два часа инкубация в присъствието на метанол и етанол, в сравнение с DMSO и ацетон.

Таблица 10. Влияние на времето на експозиция в органични разтворители върху активността на лакказа от *Trametes versicolor*.

Разтворител, %	Инкубационно време	Ензимна активност с етанол, %	Ензимна активност с Метанол, %	Ензимна активност с DMSO, %	Ензимна активност с Ацетон, %
10%	5 мин.	108	120	107	140
	1 час	62	67	50	60
	2 часа	60	60	41	56
20%	5 мин.	123	128	55	98
	1 час	64	60	33	47
	2 часа	62	50	0	52

Подобни са резултатите и при експозиция в 20% от изследваните органични разтворители, като се затвърждава, че DMSO е най-неприемливия разтворител за лакказата. Добавянето на ацетон и DMSO към средата в концентрация 20% причинява рязко намаляване на ензимната активност. Най-очевидният пример е инкубацията на лакказа в буфер, съдържащ DMSO в концентрация или 10% или 20%, където разтворителят има влошаващ ефект върху нея: ензимът губи между 50% и 100% от своята активност, когато се инкубира за 1 или 2 часа.

Има ограничен брой изследвания (Milstein *et al.*, 1989), които демонстрират, че имобилизираната лакказа може да понася предимно присъствието на наситени с вода хидрофобни органични разтворители. За практически цели обаче често е необходимо да се извършват изследвания в смесена водно-неводна среда (напр. отстраняване на полифеноли от бира, вино и др.).

9. Проследяване на ензимната активност на имобилизирана лакказа посредством електрохимични методи

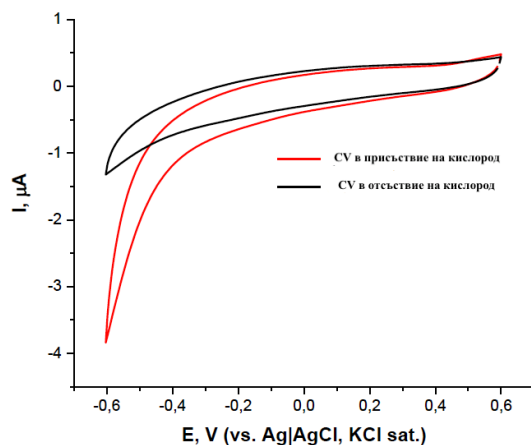
9.1. Имобилизирание на лакказа от *Trametes versicolor* в полимерен слой от Nafion и определяне на каталитичната ензимна активност в присъствие на кислород и фенолни съединения

Последващите изследвания се проведеха с *Trametes versicolor* тъй като тя показва по-стабилна активност в присъствие на органични разтворители, необходими в процеса на имобилизация.

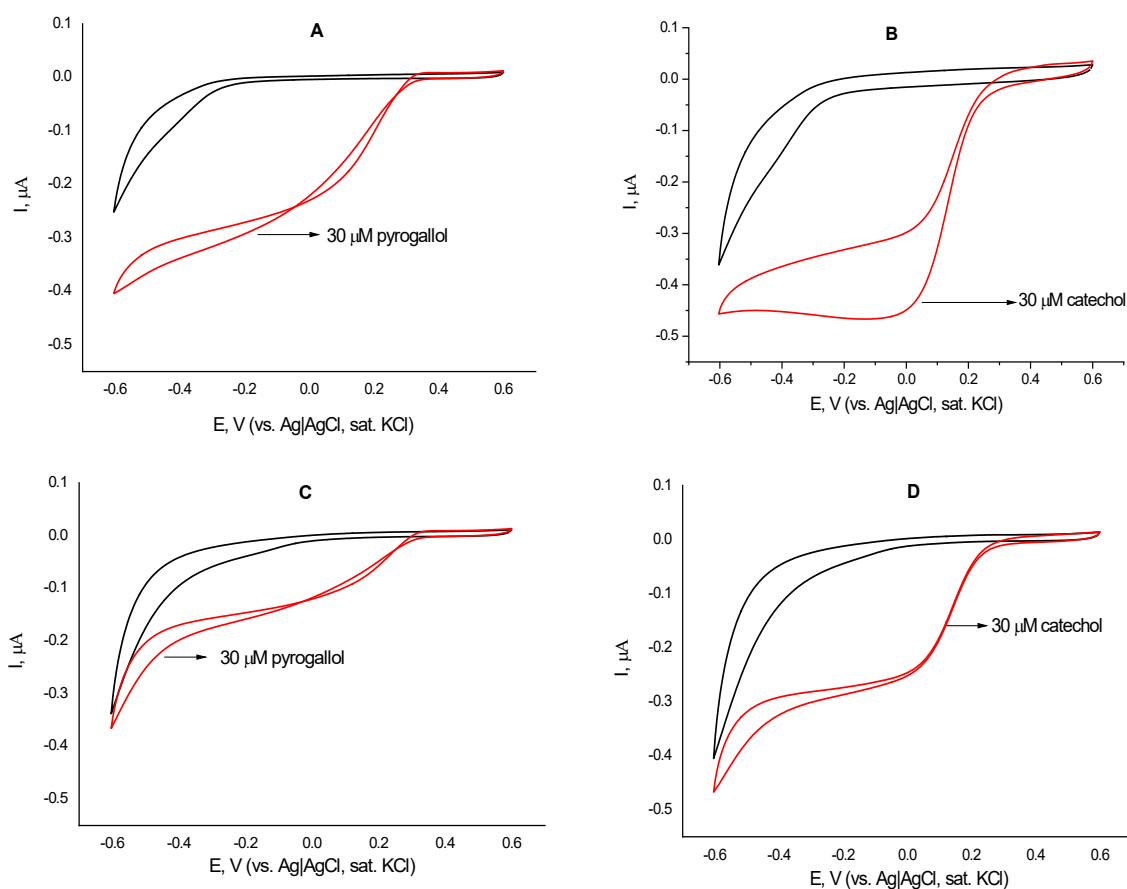
За целта, ензим лакказа от *Trametes versicolor* бе имобилизиран върху повърхността на електрод от стъкловъглерод под полупропусклива мембрана от полимера Nafion и поведението му бе сравнено с идентично приготвен с лакказа от *Trametes pubescens* биоелектрод. Електрохимичното поведение на двата биоелектрода на основата на лакказа бе изследвано чрез циклична волтаметрия (CV) в отсъствието и присъствието на двата субстрата на лакказа – кислород и фенолни съединения. Волтаперометричните изследвания показват, че и за двата вида лакказни биосензори, в аерирани буферни разтвори (т.е. в наличие на кислород) се наблюдава редукционна вълна, започваща при потенциали, по-отрицателни от -0,25 V, което не се наблюдава

в деаерирани разтвори (Фиг. 11, черни линии). Тези наблюдения свидетелстват, че имобилизираната лаказа катализира електрокаталитичната редукция на O_2 до вода, като по този начин доказват, че ензимите са електрохимично активни.

Сравнението на CV на ензимния електрод, записани в аерирани разтвори в отсъствието и присъствието на пирогалол и катехол като субстрати (фиг. 12), разкрива катализирано от лаказа окисление на двата фенола до полухинони, последвано от електрохимична регенерация на окислените продукти.



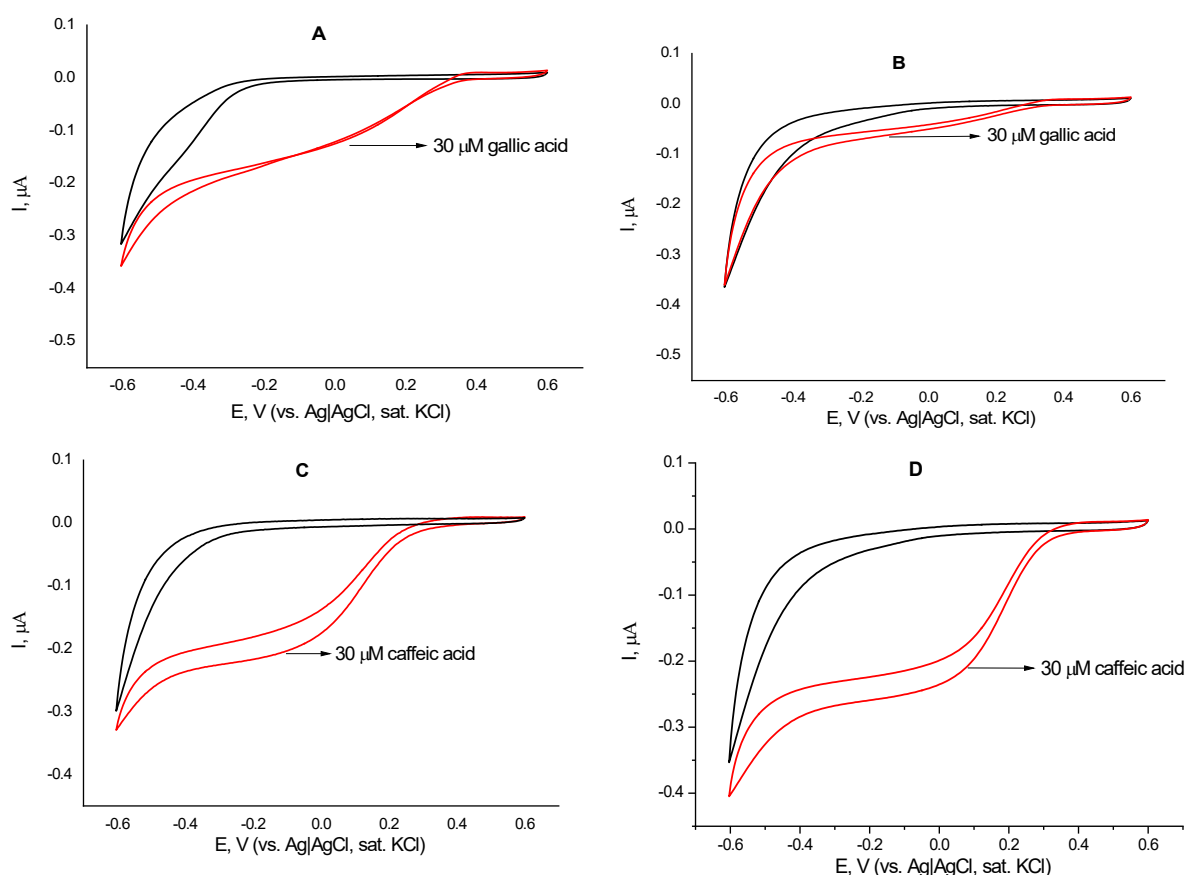
Фигура 11. Циклични волтамограми на лакказен електрод записано в присъствие (червено) и в отсъствие (черно) на разтворен O_2 , в цитратен буфер, pH = 4.



Фигура 12. Циклични волтамограми на ензимни електроди, модифицирани с лаккази от: *Trametes pubescens* (A, B) и *Trametes versicolor* (C, D) във фонов електролит (черни плътни линии) и в присъствието (червени плътни линии) на 30 μM субстрати на лакказа: пирогалол (A, C) и катехол (B, D).

9.2. Каталитичната ензимна активност на имобилизирана лакказа в присъствие на фенолни киселини

Кафеената и галовата киселина могат да се разглеждат като производни на катехол и пирогалол фенолни съединения. Тяхното структурно сходство с горните ди-хидроксилни и три-хидроксилни ароматни съединения, както и фактът, че те са обичайните съставки на полифенолния комплекс в различни природни продукти, определи интереса ни към изследване на волтаметричното поведение на получените биосензори в присъствието на двете фенолни киселини. На волтаперните криви, записани в отсъствие на фенолни съединения (фиг. 11, черни линии), се появява редукционна вълна при потенциали, по-отрицателни от $-0,3$ V, което е резултат от електрохимичната редукция на разтворения молекулен кислород, катализирана от имобилизирания ензим, което несъмнено доказва, че и двете лаккази са не само електрохимично, но и каталитично активни. Цикличните волтамограми, записани в присъствието или на галова, или на кафеена киселина (Фиг. 12, червени линии), показват ясно изразена редукционна вълна, започваща много по-рано – под $+0,1$ V, което се дължи на факта, че двете фенолни киселини медирират електрохимичната редукция на разтворения кислород и следователно значително намаляват свръхпотенциала на редукция на кислород върху електроди с имобилизирана лакказа. Както се вижда от представените графики, взаимодействията на двете лаккази с двете фенолни киселини наподобяват формите на волтамограмите, записани в присъствието на катехол и пирогалол.



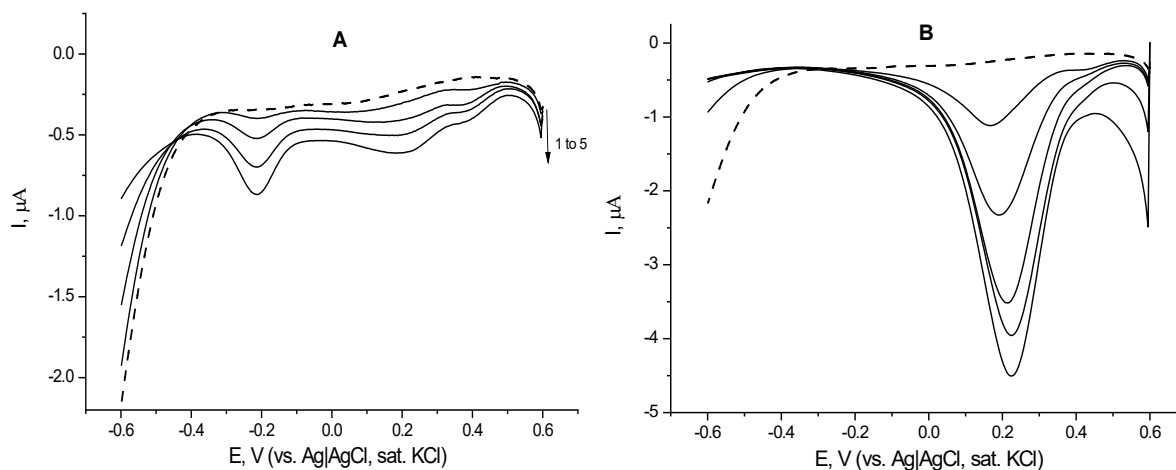
Фигура 13. Циклични волтамограми на ензимни електроди, модифицирани с лакази от: *Trametes pubescens* (A, C) и *Trametes versicolor* (B, D) във фонов електролит (черни плътни линии) и в присъствието на $30 \mu\text{M}$ (червени плътни линии) галова киселина (A, B) и кафеена киселина (C, D).

Очевидно е, че ефективността на ензимното взаимодействие с двете фенолни киселини е различна и е много по-висока в присъствие на кафеена киселина, както може да се заключи от ясно изразените редукиционни вълни (фиг. 13 C, D). Взаимодействието между двете лаккази (*Trametes versicolor* и *Trametes pubescens*) с галова киселина е с по-нисък интензитет, вероятно като резултат от електростатично отблъскване на нейната анионна форма, генерирана при работно рН = 4,0 и повърхността на електрода, която също носи отрицателни заряди поради покритието с фина мембрана от Nafion.

9.3. Изследване на биосензори на базата на лакказа от *Trametes pubescens* и *Trametes versicolor* с метода диференциална импулсна волтаметрия (DPV)

Диференциални импулсни волтамограми (DPV) на същите лакказни електроди са изобразени на Фигура 14. На фоновите криви (Фиг.14, А, В, пунктирани криви) не се наблюдават пикове, а рязкото увеличаване на редукиционния ток при потенциали, по-отрицателни от -0,4 V, свидетелства, че редукцията на кислород протича на повърхността на биоелектрода.

Последващото регистриране на DPV кривите в присъствието на увеличаващи се концентрации на галова киселина (фиг. 14, А, плътни линии), показва забележимо увеличение на тока с пик с нарастваща височина при -0,2 V. Не се забелязва изместване на позицията на пика при повишаване на концентрацията на галова киселина. По подобен начин, при наличие на кафеена киселина (фиг. 14, В, плътни линии), беше установен ясно изразен пик при потенциал по-положителен от този, наблюдаван за галова киселина.



Фигура 14. Диференциални импулсни волтамограми на ензимни електроди, модифицирани с лаказа от: *Trametes versicolor* във фонов електролит (черни пунктирани линии) и в присъствието на различни концентрации на (плътни линии) галова киселина (А) и кафеена киселина (В).

Аналогично, височината на пика нараства пропорционално на концентрацията на субстрата. Разликата в поведението на лакказния биосензор в присъствието на кафеена киселина като ензимен субстрат е, че редукиционният пик се появява при потенциал от + 0,2 V, а потенциалът на пика леко се измества положителна посока с увеличаване на концентрацията на субстрата. Вероятно е, че проникването на галовата киселина е възпрепятствано от депротонирането на нейната карбоксилна

група при работното рН поради електростатичното отблъскване между отрицателно заредената мембрана от Nafion и анионната форма на галова киселина, което води до значително изместване на редукционния потенциал към по-отрицателни стойности от тези, забелязани за кафеената киселина. Последната не се депротонира при работното рН на средата и поради това молекулите ѝ по-лесно проникват през мембраната. Подобно поведение на втората лаказа – от *Trametes pubescens*, се забелязва при еквивалентни експериментални условия.

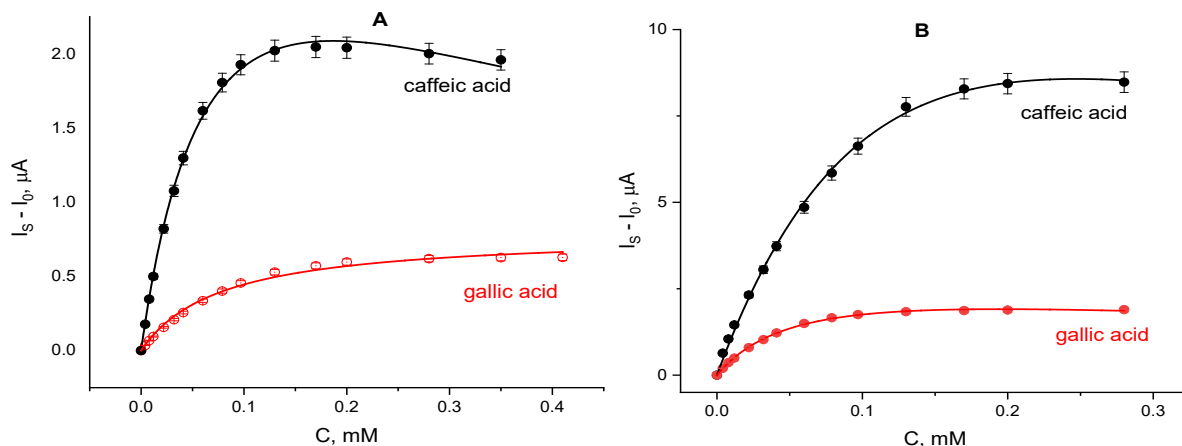
9.4. Анализ на галова и кафеена киселина с биосензори на основата на лакказа от *Trametes versicolor* и *Trametes pubescens* чрез амперометрия при постоянен потенциал

Информацията, получена от изследванията с метода DPV ясно показва, че тази електрохимична техника трудно може да се използва за анализ на смеси от целевите ди- и три-фенолни съединения.

На фигура 15 са изобразени зависимостите на електродния сигнал от концентрацията на галова и кафеена киселина, определени с двата типа електроди на базата на лакказа при работни условия, избрани като оптимални: работен потенциал -0,2 V и рН = 4,0. Приликата във формата на кривите е очевидна – и за двата типа електроди зависимостта на електродния сигнал от концентрацията на субстрата има хиперболичен ход. Въпреки това, привидните кинетични константи за двете имобилизирани лакази, определени чрез нелинеен регресионен анализ на експериментални данни, показват забележими разлики. Привидните константи на Михаелис за имобилизирана лакказа *Trametes versicolor* (Фиг. 13, А) по отношение на кафеената и галовата киселина са много сходни (Таблица 12), докато съответните привидни максимални скорости на ензимно катализираната реакция се различават значително с V_{max}^{app} за кафеената киселина, която е почти 5 пъти по-висока от тази за галова киселина. За разлика от тях, K_M^{app} за имобилизираната лаказа от *Trametes pubescens* (Фигура 13, В) по отношение на кафеената и галовата киселина е установено, че се различават повече от 3 пъти (0,19±0,03 mM и 0,06±0,04 mM, съответно, Таблица 12), докато привидните максимални скорости на реакцията се различават дори повече от изчислените за *Trametes versicolor*. Тези разлики в привидните кинетични константи на двата идентично имобилизирани ензима предполагат, че въпреки биохимичното сходство на двете лакази, има забележими разлики в ензимния афинитет към ди-хидроксиди и три-хидроксиди ароматни съединения.

Таблица 11. Привидни кинетични константи на двата типа лакказни биосензори при взаимодействие с галова и кафеена киселина и коефициент на регресия (R^2). Кинетичните константи бяха определени чрез нелинеен регресионен анализ на експерименталните данни.

Кинетични константи	<i>Trametes pubescens</i>		<i>Trametes versicolor</i>	
	Кафеена к-на	Галова к-на	Кафеена к-на	Галова к-на
V_{max}^{app} , μA	21.90± 2.70	3.11 ± 0.12	3.77 ± 0.17	0.79 ± 0.02
K_M^{app} , mM	0.191 ± 0.030	0.061 ± 0.004	0.075 ± 0.056	0.077 ± 0.006
K_I^{app} , mM	0.319 ± 0.083	0.621 ± 0.088	0.464 ± 0.055	–
R^2	0.999	0.999	0.999	0.993



Фигура 15. Зависимост на сигнала на биосензора от концентрацията на субстрата за електроди на базата на лакказа от: А) *Trametes versicolor* и В) *Trametes pubescens* в присъствието на галова киселина (червена серия) и кафеена киселина (черна серия). Графиките бяха построени въз основа на хроноамперометрични записи при -0.2 V спрямо Ag|AgCl (наситен KCl), в цитратен буфер, съдържащ 0.1 M NaClO₄, pH = 4.0; стайна температура.

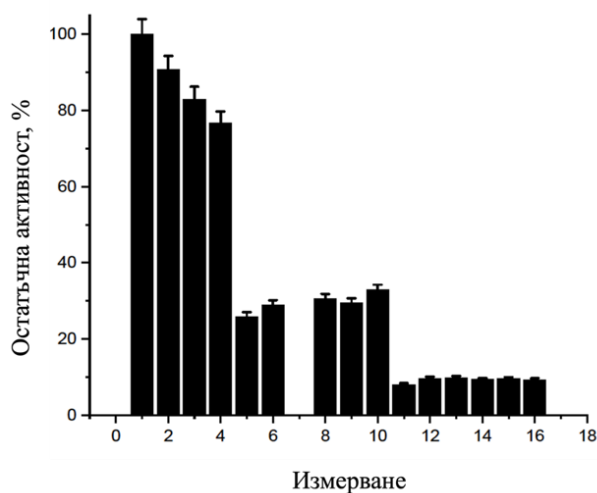
Таблица 12. Сравнение на съдържанието на феноли, изразени в милиграм еквиваленти на галова киселина за грам сухи билки (GAE.DW⁻¹), анализирани с биосензор на лакказа от *Trametes pubescens* и анализ с високоефективна течна хроматография на съдържанието на фенолна киселина.

Билков екстракт	Определяне с биосензор (GAE.DW ⁻¹)	Определяне на общо количество полифеноли* (GAE.DW ⁻¹)	Аналитичен добив, %
1	214.2	216.0	99.0
2	131.0	189.0	69.3
3	48.3	56.5	85.4

* Определя се чрез HPLC като сума от всички фенолни киселини.

10. Операционна стабилност

Операционната стабилност на лаказните електроди е тествана за период от 5 дни и получената остатъчна активност като функция от броя на измерванията, извършени със същия електрод, е изобразена на Фиг. 16.



Фигура 16. Остатъчна активност на електрода като функция от броя на измерванията.

Може да се види, че при първите четири измервания електродът постепенно губи около 7% от своята активност, но запазва около 30% от първоначалната си активност след 10 измервания. Това се обяснява със загуба на каталитична активност на ензима, дължаща се както на изтичане на ензим в буфера, така и на инактивиране на ензима поради продължителното му излагане на стайна температура.

10.1 Приложение на лакказните биосензори

Разработените лакказни биосензори бяха приложени при анализа на общото фенолно съдържание на три различни билкови екстракти. Беше установено, че биосензорът, базиран на лакказа от *T. pubescens*, реагира приблизително три пъти по-интензивно от аналогичния на базата на лакказа от *T. versicolor*. Количественият анализ на билковите екстракти е извършен чрез амперометрия при постоянен потенциал (амперометрична детекция), използвайки методът на стандартната добавка като основен аналитичен похват. Методът на стандартната добавка (MSA) обикновено се извършва чрез добавяне на малки обеми от концентриран разтвор на анализа към пробата. Основното му предимство е възможността практически да се елиминират ефектите от сложната матрица в реалните проби. Като външен стандарт бяха избрани 10 mM разтвори на галова киселина.

Резултатите от анализа с лакказния биосензор са съпоставени с тези от HPLC анализи на трите вида екстракти (Таблица 12). Както беше установено от HPLC анализа, изследваните билкови екстракти включват галова, кафеена, хлорогенова, р-кумарова и транс-ферулова киселина. Определените чрез MSA количества на фенолните съединения, бяха допълнително умножени по фактор на разреждане и получените стойности бяха преизчислени в еквиваленти на галова киселина отнесени към грам сухо тегло на билките. Изчисленият аналитичен добив (в %) е в рамките на допустимото само за билковия екстракт 1, докато за другите два екстракта биосензорният метод показва значителни отклонения от приемливите стойности (от 95 до 105%). Това може да се дължи на наличието на значителни количества *m*-бензендиоли (напр. резорцинол и неговите производни) и/или други видове полифеноли, които не реагират с лакказа.

Въпреки това, биосензорният метод осигурява две важни предимства пред хроматографския анализ – може да се извърши бързо с минимална предварителна обработка на пробата и с оборудване, което е много податливо на миниатюризация, което позволява анализ на място.

Изводи:

Въз основа на получените резултати могат да се направят следните изводи:

1. При изследване ензимната активност на каталази от различен произход както в отсъствие, така и в присъствие на нискомолекулни алифатни алкохоли се установи, че най-устойчива на въздействието на органичния разтворител е каталазата от *Penicilium chrysogenum*. Тя запазва 83% и 98% съответно от активността си в присъствие съответно на 1% етанол и 1% метанол, като при увеличаване на съдържанието им до 5%, се запазва съответно 63% и 57% от активността на нативния ензим.
2. При аналогично изследване на каталази от различен произход в хетерогенна среда се установи, че каталаза от *Penicilium chrysogenum*, имобилизирана върху глюкан тип URE13-300 запазва до 76% от изходната си активност в присъствие на 5% етанол и 63,5% от изходната активност в присъствие на 5% метанол.
3. Разработен е електрохимичен метод за определяне на ензимната активност на имобилизирана каталаза от *Penicilium chrysogenum* в отсъствие и в присъствие на метанол и етанол и е изведена формула за определяне на ензимната активност. Установено е, че кинетиката на ензимната реакция в отсъствие на алкохоли се описва от уравнението на Михаелис – Мен-тен, докато в присъствие на етанол или метанол се подчинява на уравнението на Хил за алостерични ензими.
4. Получени са два вида електрохимични биосензори чрез имобилизиране на ензим лакказа от *Trametes versicolor* и *Trametes pubescens* в полимерен филм и са охарактеризирани с помощта на електрохимични техники като циклична и импулсна волтамперометрия, както и хроноамперометрия при постоянен потенциал. Изследвано е електрохимичното поведение на биосензорите в присъствие на ди- и трихидрокси феноли, като е установено, че:
 - като най-подходящ електрохимичен метод за изследване на ензимната активност е определена хроноамперометрия при постоянен потенциал от -0.2 V. Операционните условия на биосензора гарантират ниска консумация на енергия от биосензора и минимални пречещи влияния при анализ на сложни матрици;
 - двата лакказни ензима показват значителна разлика в хетерогенната си биокаталитична активност, като ензимът от *Trametes pubescens* се характеризира с многократно по-висока специфична активност;
 - привидните кинетични константи на двата имобилизирани ензима, определени чрез нелинеен регресионен анализ в присъствие на галова и кафеена киселини, значително се различават;
5. Биосензорният метод е приложен за определяне на общото фенолно съдържание в билкови екстракти. При съпоставяне с хроматографски анализ на фенолното съдържимо на пробите е установена добра корелация на резултатите от хроматографския и биосензорния анализи.

Приноси:

1. Разработен е електрохимичен метод за проследяване на каталитичното действие на каталаза от *Penicilium chrysogenum* в имобилизирано състояние и е изведена формула за определяне на ензимната ѝ активност по електрохимични данни.
2. Разработена е методика за имобилизиране на ензим лаккази от *Trametes versicolor* и *Trametes pubescens* и е приложена при създаването на електрохимични биосензори за анализ на ди- и трихидрокси фенолни съединения. Показано е, че така получените биосензори са стабилни в продължение на 5 дни. Получените биосензори са приложени при определяне на общото фенолно съдържание на билкови екстракти.

Публикации свързани с темата на научния труд:

1. **Peshkov, A.,** Angelova, S., Avesque, C., Iliev, I., Dimcheva, N. „Determination of kinetic parameters of catalase of different origin immobilized on water-insoluble glucan synthesized by recombinant glycosyltransferase URE13-300“. Ecol. Balk., 15(2) за 2023г. ,(Q4)
2. Shukri, M., Cherneva, T., **Peshkov, A.,** Nikolova, M., Iliev, I., & Dimcheva, N. (2025). „Comparison of Two Laccase Enzymes from *Trametes versicolor* and *Trametes pubescens* for the Assessment of Phenolic Acids Content Using Laccase-Based Biosensor“. Applied Food Biotechnology, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.22037/afb.v12i1.46955> ,(Q3)
3. **Peshkov, A.,** Shukri, M., Pimpilova, M., Iliev, I. & Dimcheva, N. (2025). „Electrochemical approach for monitoring the catalytic action of immobilized catalase“. Open Chemistry, 23(1), 20250143. <https://doi.org/10.1515/chem-2025-0143> , (Q3)

Участие в научни форуми:

1. Angelova, S., **Peshkov, A.,** Vasileva, T., Iliev, I., Bivolarski, V. Comparison study on the effect of organic solvents on different types of glucanases in heterogenic catalysis. 13-та международна конференция Protein Stabilization (ProtStab 2021), online, **07 – 09 Октомври** 2021. Постер и абстракт, стр. 61.
2. **Peshkov, A.,** Angelova, S., Avesque, C., Iliev, I., Dimcheva, N. Determination of kinetic parameters of catalase of different origin immobilized on water-insoluble glucan synthesized by recombinant glycosyltransferase URE13-300. 13-та международна конференция Protein Stabilization (ProtStab 2021), online, **07 – 09 Октомври** 2021. Постер и абстракт, стр. 67.
3. Определяне на кинетични параметри на каталаза с различен произход, имобилизирана върху водонерастворим глюкан, синтезиран от рекомбинантна глюкозилтрансфераза URE13-300. Студентска научна сесия по органична химия. Пловдив, **15-16 Април** 2022. Устен доклад и абстракт, стр. 12.
4. **Peshkov, A.,** Dimcheva, N., Iliev, I. Study of the influence of organic solvents on the activity of the enzyme laccase. THIRD NATIONAL YOUNG SCIENTISTS CONFERENCE ON BIOLOGY. Пловдив, **1-ви Ноември** 2022. Постер и абстракт стр. 47.
5. **Peshkov, A.,** Pimpilova, M., Iliev, I., Dimcheva, N. ELECTROCHEMICAL APPROACH FOR THE MONITORING OF IMMOBILIZED CATALASE ACTIVITY. 7-ма интернационална конференция за нови ензими Новел Ензаймс '23, Грейсвалд, Германия, **28-31 Март** 2023. Постер и абстракт стр.100. ISBN 978-3-9504809-4-8
6. **Peshkov, A.,** Iliev, I., Dimcheva, N. Electrochemical method for assaying immobilized catalase activity in the presence of alcohol. БелХим'24, Хасково, България, **25-28 Септември** 2024. Постер и абстракт стр. 49.
7. **Peshkov, A.,** Dimcheva, N., Iliev, I. OXIDOREDUCTASES – PROPERTIES, FUNCTIONS AND POTENTIAL APPLICATION IN BIOTECHNOLOGY, BIOREMEDIATION AND BIOSENSORS. 2-ра Национална научна конференция Физика-Инженерство-Технологии, Пловдив, България, **27-28 Ноември** 2024. Устен доклад и абстракт, стр. 57.

8. **Peshkov, A.,** Dimcheva, N., Shukri, M., Stoynova, T., Nikolova, M., Iliev, I. DETERMINATION OF GALLIC ACID IN DIFFERENT HERBAL EXTRACTS VIA ELECTROCHEMICALLACCASE-BASED BIOSENSOR. 12-та интернационална конференция по хранене и разстеж, Атина, Гърция, **20-22 Февруари 2025**. Постер и абстракт стр. 18
9. Dimcheva, N., Shukri, M., Stoynova, T., **Peshkov, A.,** Nikolova, M., Iliev, I. Evaluation of phenolic acids in herbal extracts with laccase-based biosensors. 8-ми международен симпозиум за нови ензими Новел Ензаимс'25, Будапеща, Унгария, **25-28 Март 2025**. Постер и абстракт стр. 80.

ЛИТЕРАТУРА

Aggez, C., & YZUGULLU KARAKUS, Y., (2022). Production, Purification and Characterization of Catalase from *Aspergillus Fumigatus*. Open Access Journal of Microbiology & Biotechnology (OAJMB), vol.7, no.4, 1-9.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Chaga, G. S., Medin, A. S., Chaga, S. G., & Prath, J. O. (1992). Isolation and characterization of catalase from *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Chromatography A*, 604(1), 177–183. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85542-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85542-2)

Kumar, R., Kaur, J., Jain, S., & Kumar, A. (2016). Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.05.006>

Magner, E. and Klibanov, A.M. (1995). The oxidation of chiral alcohols catalyzed by catalase in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 46(2): 175–179.

Milstein O, Gersonde R, Huttermann A, Chen MJ, Meister JJ.1992.Fungal biodegradation of lignopolystyrene graft copolymers. *Appl Environ Microbiol*58. <https://doi.org/10.1128/aem.58.10.3225-3232.1992>

Antecka, A., Blatkiewicz, M., Boruta, T. et al. (2019) Comparison of downstream processing methods in purification of highly active laccase. *Bioprocess Biosyst Eng* 42, 1635–1645 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02160-3>

Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M., Gupte, A., (2014) Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. *3 Biotech*. Feb;4(1):77-84. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0129-1>

Smejkal, G. B., & Kakumanu, S. (2019). Enzymes and their turnover numbers. *Expert review of proteomics*, 16(7), 543–544. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1630275>