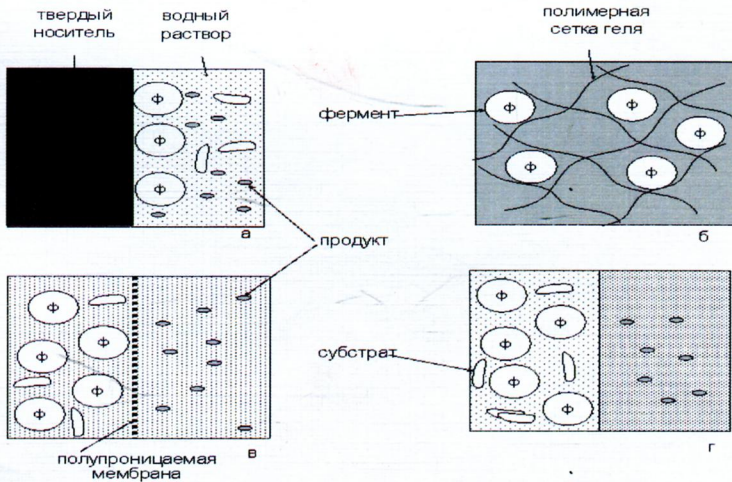


Г. П. Лапина

О СПЕЦИФИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЯХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ОКСИДАЗ РАСТЕНИЙ



Федеральное агентство по образованию
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
“Тверской государственный университет”

Г. П. Лапина

**О СПЕЦИФИЧЕСКИХ
ОСОБЕННОСТЯХ
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
ОКСИДАЗ РАСТЕНИЙ**

МОНОГРАФИЯ

ТВЕРЬ 2008

УДК 581.19
ББК Е 572.53
Л 24

Лапина Г. П.

Л 24 О специфических особенностях функционирования оксидаз растений: Монография. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2008. – 124 с.
ISBN 978-5-7609-0452-2

В монографии представлено экспериментальное исследование различных типов ферментативных систем (пероксидазы льна и хрена, а также полифенолоксидазы льна и хрена), имеющих общность типа химической реакции и различающихся субстратной специфичностью и структурой активного центра. Сравнительное исследование функционирования ферментов в объеме водной фазы и в иммобилизованном состоянии позволило установить ряд их физико-химических характеристик, выявить общие и специфические закономерности молекулярных механизмов функционирования активных центров ферментов из класса оксидоредуктаз, определить типы активации и ингибирования ферментов, рассчитать и проанализировать интегральные параметры с использованием представления кинетических ферментативных характеристик в $K_m' - V'$ системе координат, построить и проанализировать особенности течения каталитического процесса на основе геометрических “портретов”, характеризующихся дополнительным набором физико-химических параметров.

Монография предназначена для химиков, биологов, биохимиков, экологов, а также научных сотрудников других специальностей, изучающих иммобилизованные ферменты растительного происхождения, их физико-химические и каталитические свойства.

Автор выражает сердечную благодарность аспирантам Ю. В. Козловской, Н. С. Шарилыной и П. С. Лихуше, принимавшим участие в проведении и обработке части экспериментальной программы данной работы.

УДК 581.19
ББК Е 572.53

ISBN 978-5-7609-0452-2

© Лапина Г.П., 2008

© Тверской государственный университет, 2008

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	27
1. Метод и методология проведения работы.....	27
2. Экспериментальная часть.....	28
2.1. Приготовление реактивов.....	28
2.1.1. Приготовление стандартных концентраций перекиси водорода (H_2O_2).....	28
2.1.2. Приготовление раствора бензидина в ацетатном буфере.....	29
2.1.3. Приготовление раствора пероксидазы хрена.....	30
2.1.4. Приготовление раствора пероксидазы льна.....	30
2.1.5. Приготовление раствора пирокатехина.....	30
2.1.6. Приготовление раствора о-фенилендиамина.....	30
2.1.7. Приготовление ацетатного буфера.....	30
2.1.8. Приготовление биуретового реактива.....	31
2.1.9. Приготовление экстракта полифенолоксидазы из биотканей льна.....	31
2.2. Объекты, методы и методики исследования.....	31
2.2.1. Объекты исследования.....	31
2.2.2. Методы и методики исследования.....	32
2.2.2.1. Метод иммобилизации ферментов на фильтровальной бумаге.....	32
2.2.2.2. Методика определения изменений величины оптической плотности (D) пероксидазной и полифенолоксидазной реакций (метод Бояркина) (Бояркин, 1951).....	34
2.2.2.3. Метод определения параметров ферментативной активности пероксидаз и полифенолоксидаз.....	35
2.2.2.4. Метод векторных диаграммных построений в ферментативной кинетике.....	36

3. Полученные экспериментальные результаты и их обсуждение.....	39
3.1. Peroксидазы льна и хрена.....	39
3.1.1. Изучение субстратной специфичности пероксидазы льна и пероксидазы хрена.....	39
3.1.2. Определение зависимости скорости пероксидазной реакции от концентрации перекиси водорода.....	39
3.1.3. Сравнительное исследование специфики ферментативного поведения пероксидазы хрена и пероксидазы льна в объеме водной фазы и в иммобилизованном состоянии	50
3.1.4. Определение константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости реакции (V_{max}) для ПОХ и ПОЛ в объеме и на границе раздела фаз.....	54
3.2. Полифенолоксидазы льна (ПФОЛ) и хрена (ПФОХ).....	67
3.2.1. Определение концентрации фермента полифенолоксидазы льна (ПФОЛ)- в водном растворе.....	67
3.2.2. Определение зависимости скорости реакции ПФОЛ при варьировании концентрации субстрата (перекиси водорода) и при различных значениях рН среды.....	69
3.2.3. Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции.....	70
3.2.4. Определение оптимальной концентрации ПФОЛ для иммобилизации фермента.....	78
3.2.5. Определение оптимальных условий для иммобилизации ПФОЛ.....	81
4. Соотнесение полученных ферментативных характеристик с целью выявления типа эффектирования биокатализатора на основе новой классификации ферментативно-активных белков. Расчет констант активации.....	84
5. Диаграммное представление активируемых при иммобилизации ПОХ и ПОЛ.....	86

6. Векторные построения данных по ферментативной кинетике в трехмерной $K_m^*V^*$ – реакции системе координат, расчет и анализ интегральных ферментативных параметров.....	91
РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАБОТЫ.....	96
СТЕПЕНЬ ВНЕДРЕНИЯ.....	100
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	101
ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.....	102
ПРОГНОЗНЫЕ ПРЕДПОЛОЖЕНИЯ О РАЗВИТИИ ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЯ.....	103
Список использованной и рекомендуемой литературы.....	104
Приложения.....	121