

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Макарова Екатерина Леонидовна

ЗАКОНОМЕРНОСТИ АДсорбЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ
ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА БИОПОЛИМЕРАХ И УГЛЕРОДНЫХ
НАНОТРУБКАХ

Специальность 03. 01. 02. – Биофизика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
доктор биологических наук,
профессор Т.А. Ковалева

ВОРОНЕЖ 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Основные представления о структуре и физико-химических свойствах амилолитических ферментов	11
1.2. Применение амилолитических ферментов в различных промышленных производствах и медицине	22
1.3. Методы иммобилизации амилолитических ферментов	26
1.4. Носители для иммобилизации энзимов	39
Глава 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1. Объект исследования	50
2.2. Методы исследования	51
2.2.1. Методика сорбционной иммобилизации глюкоамилазы	51
2.2.2. Определение содержания белка в препарате стандартным методом Лоури	51
2.2.3. Подготовка коллагена, выделенного из соединительной ткани крупного рогатого скота и дермы прудовых рыб, к иммобилизации	52
2.2.4. Выделение пищевых волокон их свекловичного жома	53
2.2.5. Глюкозооксидазный метод определения каталитической активности глюкоамилазы	54
2.2.6. Подготовка исследуемых образцов к анализу методом ИК-спектрофотометрии	55
2.2.7. Методика определения различных типов вторичных структур в молекуле глюкоамилазы	56
2.2.8. Определение размеров молекул методом динамического светорассеивания	58
2.2.9. Методика атомно-силовой микроскопии	59
2.2.10. Статистическая обработка результатов экспериментов	60

Глава 3. РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА	61
3.1. Исследование условий адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене	
3.2. Физико-химические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене	63
3.3. Кинетические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене	67
3.4. Воздействие УФ-излучения на физико-химические свойства иммобилизованной глюкоамилазы	70
Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ПРОЦЕССА ТЕРМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА КОЛЛАГЕНЕ	74
4.1. Изучение кинетических особенностей процесса термической инактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы	74
4.2. Термодинамические аспекты процесса термической инактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы	82
Глава 5. РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА УГЛЕВОДНЫХ ПОЛИМЕРАХ	85
5.1. Подбор оптимальных условий для наиболее эффективной иммобилизации глюкоамилазы на углеводных носителях	85
5.2. Физико-химические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на альгинате натрия и пищевых волокнах	86
5.3. Исследование кинетических параметров глюкоамилазы, иммобилизованной на углеводных полимерных носителях	89
5.4. Термостабильность свободной и иммобилизованной глюкоамилазы на альгинате натрия и пищевых волокнах	93
Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ С КОЛЛАГЕНОМ И УГЛЕВОДНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ	97

6.1. Исследование структуры глюкоамилазы при адсорбционной иммобилизации на коллагене	97
6.2. Исследование структуры глюкоамилазы при адсорбционной иммобилизации на углеводных полимерах	105
6.3. Исследование механизма взаимодействия глюкоамилазы с носителями с помощью компьютерных программ Maestro 9.6, Mole 2.0, GRAMM-X	113
Глава 7. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ АДСОРБЦИОННЫМ МЕТОДОМ НА УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБКАХ	126
7.1. Исследование процесса адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на УНТ	126
7.2. Исследование физико-химических свойств глюкоамилазы, иммобилизованной на нанотрубках	132
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	136
ВЫВОДЫ	141
ПРИЛОЖЕНИЕ	143
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	167

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ,
СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АСМ - атомно-силовая микроскопия
ИК-спектр – инфракрасный спектр
КРС – крупный рогатый скот
ПААГ- полиакриламидный гель
ПЭГ- полиэтиленгликоль
УНТ-углеродные нанотрубки
УФ-излучение – ультрафиолетовое излучение
Ala - аланин
Arg - аргинин
Asn - аспарагин
Asp - аспарагиновая кислота
Gln - аспарагин
Glu - глутаминовая кислота
Gly - глицин
Ile - изолейцин
Leu - лейцин
Lys - лизин
Phe - фенилаланин
Pro - пролин
Ser - серин
Thr - треонин
Trp - триптофан
Val - валин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В настоящее время прогресс в исследовании кинетико-термодинамических аспектов ферментативных процессов должен сопровождаться независимым изучением структуры и физико-химических свойств белка, а в случае мембраносвязанных ферментов - исследованием иммобилизации на соответствующих носителях.

Особую значимость приобретают работы по изучению взаимодействия ферментов с различными соединениями на молекулярном уровне, способствующие изучению систем регуляции активности клетки и механизмов действия полиферментных систем.

Амилазы распространены в клетках животных, растений, микроорганизмов, катализируют гидролиз резервных полисахаридов путем расщепления гликозидных связей, занимают ключевые позиции в регуляции обмена веществ. Эти ферменты регулируют метаболические пути в ответ на изменения рН среды клетки или сигналы других клеток, обеспечивают структурно-функциональную интеграцию компонентов и поддержание клеточного гомеостаза.

Исследование механизма действия амилолитических ферментов, осуществляющих гидролиз природных биополимеров, позволяет создать теоретическую базу ферментации возобновляемого природного сырья и получить ферментативные лекарственные препараты пролонгированного действия. Адсорбционный метод иммобилизации не только отличается простотой, но и может быть одновременно способом моделирования ассоциации-диссоциации важнейших биоструктур клетки. Поэтому актуальным остается решение ряда теоретических и практических вопросов, связанных с пониманием закономерностей реакции гидролиза полисахаридов свободными и иммобилизованными амилолитическими ферментами и определением типов взаимодействия между энзимом и матрицами биополимеров и углеродных нанотрубок.

Цель и задачи исследования. Целью работы является изучение структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств глюкоамилазы, иммобилизованной на биополимерах и углеродных нанотрубках, исследование закономерностей гидролиза полисахаридов свободной и иммобилизованной глюкоамилазой.

Задачи работы: 1) разработка метода адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на природных биополимерах и углеродных нанотрубках; 2) исследование кинетико-термодинамических аспектов реакции гидролиза крахмала иммобилизованными ферментными препаратами; 3) исследование механизмов фото- и термоинактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы; 4) изучение закономерностей взаимодействия молекулы фермента с матрицами носителей.

Научная новизна. С помощью программ (Maestro 9.6, Mole 2.0, GRAMM-X) описаны детали третичной структуры глюкоамилазы. Показано, что в состав гидрофобного ядра входят 5 пор, 9 полостей, 10 туннелей. Изучены механизмы образования комплекса глюкоамилаза – носитель при адсорбционной иммобилизации. Рассчитаны длины связей, образующихся между глюкоамилазой и коллагеном.

Разработана методика получения гетерогенных биокатализаторов на основе глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*, иммобилизованной на коллагене, альгинате натрия, пищевых волокнах, а также углеродных нанотрубках. Установлено, что наиболее высокой каталитической активностью обладает глюкоамилаза, иммобилизованная на углеродных нанотрубках (153 %), иммобилизация на природных биополимерах приводит к снижению каталитической активности фермента. Выявлены оптимальные условия функционирования иммобилизованных ферментных препаратов. Исследованы закономерности фото- и термоинактивации свободного и иммобилизованного биокатализатора в интервале температур 50-70 °С, рассчитаны константы термоинактивации свободной и иммобилизованной

глюкоамилазы. Изучен процесс термической инактивации глюкоамилазы, который удовлетворяет требованиям теории диссоциативной инактивации.

Исследованы основные закономерности иммобилизации биологически активных веществ на различных носителях, способствующие выявлению механизмов регулирования каталитической активности мембранносвязанных ферментов *in vivo* и созданию гетерогенных препаратов пролонгированного действия.

Практическая значимость. Результаты проведенных исследований надмолекулярной организации, термо- и фотоинактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* позволяют расширить и углубить представления о молекулярных механизмах ферментативного гидролиза полисахаридов.

В ходе исследований были разработаны методы адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на биополимерах и углеродных нанотрубках, которые можно рекомендовать для создания ферментных препаратов пролонгированного действия, открывающих широкие возможности для биомедицинских и биосенсорных приложений.

Выявлены закономерности процесса термической инактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы, что является необходимым условием для разработки технологии промышленного получения глюкозы из крахмала, а также для конструирования биореакторов периодического и непрерывного действия.

Показана принципиальная возможность использования отходов сельскохозяйственного производства в качестве носителей для иммобилизации глюкоамилазы, что способствует сокращению экономических затрат при создании гетерогенных препаратов на основе глюкоамилазы.

Апробация работы. Основные результаты исследований по теме диссертации были представлены на Международных, Всероссийских и Региональных конференциях и симпозиумах: Международной научной

студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2009), Международном конгрессе «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2009), Всероссийской школе-семинаре для студентов, аспирантов и молодых ученых «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы» (Белгород, 2009), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2009), Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Приоритетные направления современной российской науки глазами молодых ученых» (Рязань, 2009), Всероссийской с международным участием конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Поиск новых физиологически активных веществ» (Воронеж, 2010), Международной научной конференции «Биотехнология начала III тысячелетия» (Саранск, 2010), IV Международной научной конференции молодых ученых-медиков (Курск, 2010), Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи (Белгород, 2010), XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «ЛОМОНОСОВ», (Москва, 2011), Всероссийском конгрессе с международным участием студентов и аспирантов-биологов (Воронеж, 2011), Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2011), Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием (Санкт-Петербург, 2012), Международной школе-конференции "Анализ сложных биологических систем. Математические модели субклеточных систем. Радиационная биофизика и спектрофотометрия" (Дубна, 2012), Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика 12» (Пушино, 2012), Международной конференции «Dny Vedy-2013» (Чехия, 2013), 17-ой Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века» (Пушино, 2013).

Публикации. По теме диссертационной работы имеется публикации: 20 статей и тезисов, в том числе 5 статей в журналах из «Перечня ВАК РФ».

На защиту выносятся следующие положения:

1. С помощью компьютерных программ Maestro 9.6, Mole 2.0 в молекуле глюкоамилазы выявлены детали третичной структуры фермента: 10 туннелей, 9 полостей, 5 пор, которые могут участвовать в создании специальной микроструктуры активного центра.
2. При адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене возникают гидрофобные взаимодействия, «слабые и сильные» водородные связи, одиночные ионные связи (Protein-Protein Docking программа GRAMM-X).
3. Адсорбционный способ иммобилизации глюкоамилазы на коллагене приводит к изменению внутренней структуры гидрофобного ядра молекулы, сопровождающемуся увеличением полостей, размеров туннелей и пор.
4. После нагревания до 70 °С четвертичная структура глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, сохраняется, но количество контактных участков между димерами уменьшается вдвое.
5. Разработана методика адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на углеродных нанотрубках, позволяющая увеличить каталитическую активность фермента на 53 % по сравнению с нативным энзимом.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа включает страниц машинописного текста; состоит из «Введения», 7 глав, «Заключения», «Выводов» и «Приложения». Список литературы содержит источников. Иллюстрационный материал включает 37 рисунков и 11 таблиц в основном тексте и 19 рисунков в «Приложении».

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные представления о структуре и физико-химических свойствах амилолитических ферментов

Ферменты занимают ключевые позиции в различных метаболических путях в клетке, следовательно, их анализ позволяет не только оценить уровни активности отдельных белков, но и определить интенсивность протекания обмена веществ в живых организмах. Для выявления закономерностей гидролиза полимеров свободными и иммобилизованными гидролазами необходимо изучить физико-химические свойства энзимов, выявить оптимальные условия катализа, изучить особенности молекулярной структуры энзимов.

Широкое применение амилолитических ферментов в промышленности и медицине способствует более глубокому изучению их физико-химических свойств, механизмов ферментного катализа, усовершенствованию методов создания новейших гетерогенных биокатализаторов промышленного предназначения, в том числе медицинских препаратов пролонгированного действия.

Большое разнообразие ферментов и многообразие реакций, катализируемых энзимами, привело к созданию классификации ферментов. Все известные ферменты были классифицированы на 6 классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы.

Амилолитические ферменты распространены в природе, относятся к гидролазам, подклассу гликозидаз, гидролизуют в основном α -1,4-гликозидные связи в амилопектине, амилозе, гликогене и других мальтоолигосахаридах [11, 114, 89].

Амилазы бывают двух типов: эндо- и экзоамилазы. К эндоамилазам относится α -амилаза (КФ 3.2.1.1, α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза), разрывающая внутримолекулярные α -1,4 связи в полимерном субстрате.

Экзоамилазами являются глюкоамилаза и β -амилаза, точнее сказать энзимами, которые атакуют субстрат с невосстанавливающего конца. Однако β -амилаза не имеет возможности гидролизовать α -1,6-гликозидные связи, а глюкоамилаза практически полностью превращает крахмал в глюкозу [103, 59].

Бактерии и микроскопические грибы рода *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Endomycopsis*, *Candida*, *Torula*, *Saccharomycopsis*, *Saccaromyces* продуцируют большинство амилолитических ферментов [11, 27]. Глюкоамилаза может быть выделена из термофильных микромицетов: *Thorula thermophilia*, *Humicola lanuginosa*, *Penicillium oxalycium*, *Monascus caoliang*, *Coniophora ceretrella*, *Cophaosphorum carticola*, *Trichoderma viride*. Кроме того, глюкоамилазу обнаружили в семенах плодовых тел *Lentinus endodes* и сахарной свеклы [226,137, 233, 176, 188, 201, 185, 205, 234]. Штаммы *Bacillus* используют в промышленности для получения препаратов α -амилазы.

Амилолитические энзимы, продуцентами которых являются грибы и бактерии, имеют сходные физико-химические параметры, однако отличаются по устойчивости к внешним факторам, таким как температура, pH [162, 75, 31]. Фермент, выделенный из *Bacillus amyloliquefaciens*, стабилен в промежутке pH от 5,5 до 8,0 с оптимумом каталитической активности 5,9. Подобно другим α -амилазам, он представляет собой кальцийзависимый металлофермент, а ионы металла требуются как для проявления активности, так и для увеличения стабильности. В присутствии Ca^{2+} в реакционной среде этот фермент может быть использован для разложения крахмала при температуре 90 °C. Более термостабильна α -амилаза, выделенная из *Bacillus licheniformis*, которой свойственна наивысшая активность при температуре 105-110 °C.

Амилазы разного происхождения содержат неодинаковое количество кальция. Для полного проявления активности амилазе слюны необходим 1 атом кальция на молекулу, бактериальной – 5 атомов, а плесневой - 10

атомов кальция. Установлено, что атомы кальция не участвуют непосредственно в каталитическом акте микробных амилаз, но участвуют в формировании активной конформации молекулы белка [223, 199]. Лишение кальция молекулы α -амилазы достигается электродиализом или добавлением металлосвязывающих агентов (ЭДТА, полифосфаты, оксалаты) и приводит к утрате каталитической активности энзима [212]. Для максимального восстановления ферментативной активности достаточно добавить примерно 1 моль кальция на 1 моль фермента, восстановленного меркаптоэтанолом в 8 М мочеvine в присутствии ЭДТА. При ренатурации α -амилазы кальций может быть заменен другими бивалентными катионами (стронций, магний, барий), которые восстанавливают каталитическую активность фермента почти в той же мере, что и кальций. Некоторые авторы считают, что кальций и кобальт являются активаторами и стабилизаторами энзима, увеличивая термостабильность фермента. [212]. K. Igarashi et al. (1998) показали, что увеличение термостойкости α -амилазы *Bacillus* при замене Arg на Glu индуцируется усиленным связыванием кальция [155].

Хорошо выраженную осаживающую способность имеет α -амилаза из *Aspergillus oryzae*, которая гидролизует крахмал до олигосахаридов более низкой молекулярной массы, чем ее бактериальные аналоги. Этот фермент позволяет получить из крахмала 50 % мальтозы, поэтому его используют для промышленного приготовления сиропов с высоким содержанием дисахарида и широко изучают в различных лабораториях. В отличие от бациллярных α -амилаз фермент из *Aspergillus oryzae* является гликопротеином, обнаруживает меньшую термостабильность и более узкий диапазон pH, необходимый для активности и стабильности.

Ряд исследователей считает, что стабильность к воздействию температур обусловлена индивидуальностью строения молекулы белка, содержания заряженных аминокислот, количества слабых и сильных водородных связей, присутствия остатков цистеина.

β -амилаза широко распространена у высших растений, используется в пивоварении и спиртовой промышленности для гидролиза крахмала до сахаров. Фермент расщепляет амилозу и амилопектин по экзотипу, гидролизует α -1,4-связи через одну с образованием мальтозы в β -энантиомерной форме, атакуя невозстанавливающие концы цепей. Так как β -амилаза не способна воздействовать на α -1,6-связи и расщеплять их, из амилопектина образуются декстрины с большой молекулярной массой, ограниченные β -связями. Фермент включает четыре субъединицы, каждая из них имеет молекулярную массу - 50 кДа, реализует гидролиз в диапазоне pH 4,5-6,0. Активатором β -амилазы является аскорбиновая кислота [38, 44].

Внеклеточная β -амилаза выделена из бактерий *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* и *Spreptomycetes*. Микробные β -амилазы, подобно растительным аналогам, характеризуются низкой термостабильностью (45-50 °C), содержат SH-группы, не обнаруживают потребностей в металлах и инактивируются п-хлормеркурибензоатом, а также путем окисления. В связи с применением данного фермента в промышленной технологии в литературе широко обсуждается структура активного центра β -амилазы, механизмы ферментативного катализа [21, 39, 152, 228].

Глюкоамилаза - это амилоглюкозидаза, расщепляющая α -1,4-связи, взаимодействуя с невозстанавливающими концами цепей амилозы и амилопектина, до β -D-глюкозы. Глюкоамилаза обнаружена во всех биологических объектах: низших и высших растениях, в организме человека и животных. Способность к активному накоплению глюкоамилазы установлена в культурах микроскопических грибов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, а также бактериям рода *Clostridium* [12, 30, 32, 58, 108, 110]. Глюкоамилазы делят на кислые, проявляющие наивысшую активность при pH 3,5-5,5, и нейтральные с оптимальной активностью при

pH 6,0-7,5 (табл. 1). Известен один вид дрожжей *Saccharomyus italicus*, образующий нейтральную глюкоамилазу (pH 6,6-6,8) [75].

Таблица 1

Физико-химические свойства глюкоамилаз различного происхождения [31]

Источник глюкоамилазы	Оптимальные условия, pH, температура, °C	Молекулярная масса, кДа	Изоэлектрическая точка (pI)	Содержание углеводов, %	Степень гидролизатора растворимого крахмала, %
<i>Endomycopsis species</i> 20-9	5,7–5,9; 50	53,0	3,8–3,82	8,5	98–99
<i>Endomyces</i> JF 00111	4,8–5,0	55,0	4,8–5,5	Есть	—
<i>Rhizopus javanicus</i>	5,0–5,2	48,0	7,5–8,0	10,5	—
<i>Aspergillus awamori</i>	4,5; 60	83,7– 88,0	3,7	—	90
<i>Aspergillus niger</i> : I, II	4,5–5,0	99,0- 112,0	3,4-4,0	—	95
<i>Mucor rouxianus</i> I	4,6; 55	59,0	8,4	Есть	100
<i>Rhizopus delemar</i>	4,5; 40	100,0	—	—	95
<i>Penicillium oxalicum</i>	5,0; 55–60	84,0	7,0	—	88
<i>Aspergillus phoenicis</i>	4,5; 60	69,0	—	17,0	—
<i>Aspergillus awamori</i> X-100	4,7–5,0; 60–62	62,0	4,4	Есть	—

Известно, что некоторые формы амилаз являются гликопротеинами, хотя степень и тип гликозилирования различается очень широко [48]. При гликозилировании N-типа углеводная цепь соединена через N-гликозидную связь с остатком аспарагина [49]. При O-типе углеводные цепи соединены с остатком серина или треонина. Для некоторых амилаз характерен смешанный тип. Так, для глюкоамилазы из *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus niger* показано, что молекула фермента имеет 46 маннозных цепей O-типа и две углеводные цепи N-типа [50]. А. Н. Савельев и соавторы (1984) установили, что глюкоамилаза из *Aspergillus awamori* является гликопротеином с молекулярной массой от 48 до 112 кДа. Углеводная часть представляет собой набор небольших олигомерных звеньев (2-3 мономера), соединенных O-гликозидными связями в 48 точках с остатками серина и треонина, и содержит обычно маннозу, галактозу, глюкозу и гексозоамины [51].

К.М. Неустроев с соавторами (1993), исследуя действие ферментативного и химического дегликозилирования на физико-химические свойства глюкоамилазы из *Aspergillus awamory* X-100, считают, что O-гликозильносвязанная углеводная компонента вносит существенный вклад в стабилизацию доменной структуры фермента [25].

S. Hayashida et al. (1989) обнаружили, что O-гликозилированная область разрывает водородные связи в гранулярном крахмале между соседними цепями. Крахмалсвязывающий домен определяет связывание растворимых лиганд (β -циклодекстринов) [220]. O-гликозилированный участок обуславливает взаимодействие глобул и значительную мобильность третичной структуры, а также способствует включению фермента в мембраны [231]. Гликозилирование необходимо для стехиометрического связывания и предотвращения скопления молекул субстрата в связывающих центрах.

Для проявления каталитического действия амилаз максимальное влияние имеют следующие функциональные группы: карбоксильные группы

аспарагиновой и глутаминовой кислот (ω -COOH) и С-концевых остатков аминокислот (α -COOH), имидазольная группа гистидина, SH-группа цистеина, OH-группа серина [13, 100, 169, 134].

Большое значение принадлежит SH-группам в проявлении активности амилаз. К.М. Nomura et al. (1976) изучили роль SH- и S-S-групп в функционировании β -амилазы и установили, что SH-группа цистеина Cys-31 принимает участие в создании активного центра энзима, что было подтверждено результатами экспериментов по ингибирующему действию п-хлормеркурийбензоата на β -амилазу *Bacillus megaterium* [65]. На базе литературных данных можно утверждать, что сульфгидрильные остатки цистеина выполняют различные функции [147, 68]. SH-группы являются участниками при формировании промежуточных соединений, выполняя каталитическую роль, а также участвуют в стабилизации каталитически активной пространственной организации белковой молекулы энзима, находясь в составе “контактной площадки” апоферментов [74, 65]. Возможно, ее реактивность повышается при воздействии на нее других функциональных групп (например, имидазольных).

Расшифровка механизмов действия энзимов остается малоизученной и сложной проблемой. Имеется ряд гипотез механизма действия энзимов на субстрат [33].

Многие авторы на основании анализа кинетических кривых зависимости ферментативной активности амилаз от pH пришли к выводу, что электрофильно-нуклеофильная система карбоксил-имидазол имеет важное значение в разложении гликозидных связей крахмала [40]. Н. А. Жеребцов (1984) показал, что в активном центре глюкоамилазы имеются карбоксильные и имидазольные группы, причем система карбоксил-имидазол содействует в процессе расщепления гликозидных связей в крахмале. Фенольной группе тирозина приписывается важная роль в действии микробных глюкоамилаз на полисахариды, ибо ее модификация

способствует уменьшению активности фермента. Тирозиновые остатки входят в связывающую часть активного центра [38].

Активные центры большинства амилолитических ферментов образованы имидазолом гистидина, карбоксильными группами аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, а также тирозином [37]. В активных центрах энзимов карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой аминокислот могут реализовывать кислотно-основной катализ, выступать как субстрат-связывающие участки, вызывать электронные смещения, оказывать влияние на полярность расположенных рядом связей или групп фермент-субстратного комплекса в результате появления водородных связей.

К. Takase (1992) изучил кинетические свойства трех мутантов α -амилазы, в которых методом направленного мутагенеза были осуществлены замены в каталитическом центре: Asp 176 \rightarrow Asn, Glu 208 \rightarrow Gln, Asp 269 \rightarrow Asn. Замещение Asp 176 на Asn или Glu 208 на Gln сильно снижает сродство к акарбозе. Выдвинуто предположение, что ключевыми каталитическими остатками α -амилазы являются Glu 208 и Asp 269 [217].

Особенность строения имидазола, обладающего сопряженной системой связей, объясняет тот факт, что имидазольная группа гистидина служит необходимой функциональной группой и владеет высокой реакционной способностью. В водных растворах один из атомов азота приобретает нуклеофильные, а другой - электрофильные свойства, которые вследствие резонанса умеют обратимо меняться, и поэтому любой атом азота обладает амфотерными качествами и может работать как кислотно-основной катализатор [140].

А. Noschke и соавт. (1980) базирясь на изменении активности и кинетических характеристик сделали заключение, что тирозиновые остатки необходимы для всех типов амилаз, и их функция состоит в связывании субстрата [175, 159].

В каталитически активной паре карбоксил-имидазол роль электрофильной группы принадлежит имидазольной группе, а карбоксильная группа исполняет роль нуклеофила. Действие карбоксильной группы и имидазольной группы на гликозидные связи крахмала происходит за счет стягивания электронов к точке закрепления имидазольной группы и ухода от точки закрепления иона карбоксила, что способствует деформации этой связи.

В сегодняшних воззрениях о механизме катализа весьма популярна гипотеза об "активной полости" или "щели" в молекуле энзима, в соответствии с которой реагирующее вещество притягивается вглубь полости, где и протекает акт катализа. Достоинство этой гипотезы в том, что она дает возможность пояснить осуществление контакта большого числа групп активного центра с субстратом и вероятность атаки молекул субстрата с различных сторон. Воздействие системы карбоксил-имидазол на гликозидную связь приводит к тому, что последняя испытывает двухстороннюю атаку, что способствует быстрому ферментативному расщеплению [27, 14].

Гипотеза «активной полости» позволила J. Thoma и K. Hiromi (1979) развить концепцию многосайтовых активных центров амилаз. Эта гипотеза базируется на представлении о том, что активный центр состоит из особых участков («сайтов»), каждый из них соединяет мономерный участок полимера. Отдельные «сайты» осуществляют функции катализа (каталитический участок), другие участвуют в образовании комплекса (сорбционный участок). Каждый «сайт» обладает сродством к мономерному звену молекулы субстрата [135]. J. Allen и J. Thoma (1979) впервые показали, что активный центр α -амилазы состоит из 8 «сайтов», причем каталитически активные группы, принимающие участие в расщеплении α -1,4-гликозидных связей, находятся между 3 и 4 участками [135]. Эти данные свидетельствуют о сложности механизма образования комплекса амилаза-полисахарид.

В углублении, окруженном двумя близко расположенными

скоплениями молекул воды, находится активный центр энзима. 12 молекул воды располагаются рядом с Leu-58, а 7 молекул - в щели активного центра. Результаты молекулярного моделирования, полученные с помощью программы MolScript, позволяют продемонстрировать полость активного центра энзима, пронизывающую насквозь молекулу, имеющую размер порядка 1,5 нм и окруженную Leu-58, Trp-417, Leu-130, Leu-177, Leu-319, Trp-178, Phe-187 [206]. С одной стороны щели активного центра находятся такие моноаминодикарбоновые кислоты, как Asp-55 и Glu-179, а с другой – Glu-400 [64]. Так же было показано, что карбоксильные группы Asp-55, Glu-179, Glu-400 участвуют в осуществлении гидролиза крахмала.

Ускорение гидролиза, по модели Хироми, объясняется увеличением доли продуктивных фермент-субстратных комплексов, в которых нередуцирующее звено молекулы субстрата занимает первый подцентр, а расщепляемая гликозидная связь располагается вблизи каталитических групп фермента. Протеолиз основной формы приводит к образованию гомогенных минорных форм за счет отщепления пептида, содержащего дополнительный субстратсвязывающий центр [106].

На основе гипотезы об "активной полости" и теории индуцированного соответствия энзима и субстрата Н.А. Жеребцовым с сотрудниками был предложен механизм действия глюкоамилазы. Возникновение в структуре энзима активной полости, способной поместить один гликозидный остаток, приводит к образованию глюкозы при расщеплении гликозидных связей в крахмале молекулой глюкоамилазы. Для "активной полости" глюкоамилазы практически безразлично, какой гликозидный остаток будет помещен, необходимо, чтобы связь C₁-O была комплементарна системе карбоксил-имидазол [38].

Исходя из модели строения, были предложены принципиально различные механизмы действия глюкоамилаз, т.е. последовательного отщепления глюкозных мономерных остатков с нередуцирующего конца молекулы субстрата.

1. Одноцепочечная атака (молниеобразная), согласно которой фермент полностью гидролизует все гликозидные связи молекулы субстрата и только после этого образует комплекс с другой.

2. Неупорядоченная атака (многоцепочечный механизм), когда фермент разрывает одну гликозидную связь в молекуле и после диссоциации образует комплекс с другой.

3. Множественная атака, при которой между образованием и распадом комплекса происходит некоторое число каталитических актов (степень множественности).

Очевидно, что одно- и многоцепочечный механизм - два крайних случая реализации особенностей множественной атаки. Изучение особенностей гидролиза полимерных субстратов - это сложная и во многом нерешенная проблема. Трудно представить себе причину, заставляющую субстрат "проскальзывать" без диссоциации фермент-субстратного комплекса вдоль активного центра, но с разрывом нескольких гликозидных связей в молекуле [37].

L. Hsuan-Liang и W. Wen-Chi (2003) осуществили замену Gly 396 и Gly 407 на остатки Ala, что привело к увеличению термостабильности, в то время как каталитическая активность уменьшалась. Это означает, что введение аминокислотных остатков с более высокой гидрофобностью способствует стабилизации α -спирали и частичному разрушению водородной связи [194].

1.2. Применение амилолитических ферментов в различных промышленных производствах и медицине

Расширение источников сырья для получения сахаров, а также разработка более рациональных способов их применения привлекает внимание исследователей.

Синтез глюкозы с помощью энзимов из биосырья и комплексная переработка возобновляемого сырьевого материала в большой набор необходимых продуктов (глюкозных сиропов, патоки) вызывают интерес к изучению амилолитических ферментов.

Проблема производства сахарозаменителей возникла в связи с дефицитом свекловичного сахара. Решение данной проблемы может заключаться в производстве сахаристых продуктов, полученных ферментативным гидролизом очищенного крахмала и непосредственно зернового крахмалсодержащего сырья [123].

Амилазы животного происхождения применяются для медицинских целей. В последнее время применение инновационных биотехнологических процессов позволяет использовать амилазы микроорганизмов, особенно бактерий и микромицетов, которые замещают и вытесняют энзимы, полученные из растений и животных.

Отечественная промышленность вынуждена ввозить из-за границы немалую долю этих веществ или производить на заводах под руководством зарубежных компаний. Отходы промышленности, сельского хозяйства, такие как кукурузная кочерыжка, солома, древесные отходы, представляют наибольший практический интерес, потому что могут быть преобразованы в глюкозу и целый ассортимент других сахаров с помощью гемицеллюлаз, а также множественных форм целлюлаз [164, 200, 196, 163].

Производство глюкозы, основанное на кислотном гидролизе крахмала, имеет ряд недостатков: неполное протекание гидролиза, загрязнение препаратов глюкозы побочными токсичными продуктами, необходимость длительной и дорогостоящей очистки стоков. К тому же эта технология не позволяет получать высокоочищенную мальтозу с высоким выходом. Для получения глюкозных сиропов последние 30 лет ферментативный гидролиз крахмала с использованием α -амилазы и глюкоамилазы стал одним из наиболее масштабных процессов применения ферментов. Вначале кукурузный крахмал разжижают под действием α -амилазы. Глюкоамилазу

применяют на финальной стадии энзиматического процесса. Образующиеся при этом мальтоолигосахариды в концентрации 30-40 % смешивают с растворимой глюкоамилазой (из *Aspergillus niger*) при pH 4,0-4,5 и выдерживают в реакторе при перемешивании 48-72 часа при 60 °С. Глюкоамилаза вступает во взаимодействие с образовавшимися олигосахаридами и отщепляют остатки глюкозы [3, 78, 224].

Активно применяют амилазы при выпекании хлеба. На сегодняшних промышленных предприятиях для ускорения процесса брожения применяют специальные добавки, одной из которых является амилаза. При помощи амилаз, выделенных из микромицетов, маисовая и кукурузная мука перерабатываются в глюкозную и мальтозную патоки, которые находят применение для получения чистой глюкозы медицинского и пищевого назначения [218, 222].

В данный момент проявляется интерес к использованию энзимов класса гидролаз в синтетических моющих средствах (СМС). Амилолитические ферменты используют для переработки растительных материалов при производстве этанола как добавки к углеводородам при производстве бензина [86, 99].

Амилазы применяются при производстве различных изделий из крупы путем обогащения их декстринами и сахарами, а также для частичного гидролиза крахмала (получение продуктов в виде хлопьев и зерен) и при выработке пищевых концентратов. Использование амилаз в производстве овощепродуктов (пюре, супов, сушеных овощей, экстрактов, варенья) способствует удалению остатков крахмала, который приводит к постепенному загустению и помутнению соков и экстрактов [111, 61].

Ферментативные препараты широко применяются как лекарственные препараты, при проведении клинических анализов, для диагностики различных патологий, энзимопатий, что способствует развитию медицинской энзимологии. Амилолитические ферментные препараты применяют для коррекции гипо- и дисферментозов желудочно-кишечного тракта. Лечение

энзиматической недостаточности и регуляция ферментативной активности в желудочно-кишечном тракте достигаются пероральным приемом амилаз, протеаз и липаз. Продукты гидролиза протеинов при гнойно-воспалительных заболеваниях, ожогах, аккумулировавшиеся в огромном количестве, разрушаются с помощью ферментов. В последнее время ферментные препараты стали применять для рассасывания тромбов кровеносных сосудов и удаления аномального накопления гликогена в клетках и тканях, а также для лечения слизистой кишечника и поджелудочной железы [90]. Связывание α -амилазы с сетчатым полимером, включающим метакриловую кислоту, приводит к получению препарата, устойчивого по отношению к воздействию кислот [210].

В составе комбикормов в последние годы довольно часто стал использоваться ферментный препарат «ГлюкоЛюкс–F» - комплекс гидролитических энзимов, в том числе и иммобилизованная глюкоамилаза, продуцируемая *Aspergillus awamori*. «ГлюкоЛюкс–F» повышает переваримость кормов и увеличивает процесс всасывания продуктов гидролиза организмом. Полиферментные препараты оказывают влияние на рост и развитие животных за счет наиболее эффективного переваривания питательных веществ рационов, в результате снижаются затраты кормов на единицу продукции [121].

Для аналитических целей применяют энзимы различных классов. В лабораторной диагностике с помощью ферментов возникает возможность избирательно определять в крови, моче и других биологических жидкостях малые количества физиологически активных веществ: мочевой кислоты, мочевины, глюкозы, аминокислот, нуклеотидов, спиртов.

Производство и применение ферментов постоянно расширяется. Это объясняется растущей в мире обеспокоенностью привнесения в природную среду нехарактерных для нее веществ, истощения энергоресурсов, биоресурсов. Эти проблемы способствуют усовершенствованию последних

направленностей исследований, и без сомнений энзимы в решении данных вопросов будут играть значительную роль.

1.3. Методы иммобилизации амилолитических ферментов

Иммобилизация энзимов - процесс введения молекул в ту или другую изолированную фазу, отделенную от фазы свободного раствора, но при этом энзим сохраняет способность обмениваться с молекулами эффектора, субстрата или ингибитора [119, 19]. Иммобилизация ферментов - это часть более широкой проблемы целесообразной модификации биологически активных веществ: она является одним из путей регулирования активности ферментов, методом исследования молекулярных механизмов действия мембранно-связанных ферментов *in vivo*, стала основой для создания новой весьма эффективной методики разделения и очистки белков и других биомолекул.

Процесс иммобилизации решает проблемы, которые возникают при использовании свободных ферментов: неустойчивость при хранении и воздействии различных денатурирующих факторов, сложность отделения ферментов от реагентов и продуктов реакции, высокая стоимость энзиматических препаратов.

К методам физической иммобилизации относятся методы иммобилизации, при которой энзим конъюгирует с носителем с помощью слабых связей. Они подразделяются на четыре главные группы: включение в поры геля, ввод энзима в двухфазную реакционную среду, где он растворим, но может быть исключительно в одной из фаз, адсорбция на поверхности нерастворимого носителя, отделение в пространстве фермента от остальных реагирующих веществ с использованием полупроницаемой мембраны [50, 26, 119, 139].

Данная классификация является условной, так как мы не можем четко разделить способы иммобилизации. Универсального метода иммобилизации

не существует, каждый имеет свои достоинства и несовершенства. Наиболее простым и доступным из имеющихся в данный момент способов иммобилизации ферментов может быть адсорбционная иммобилизация. В качестве носителей могут использоваться как органические, так и неорганические вещества в форме гранул, порошка или шариков. Адсорбция энзимов на нерастворимых носителях отличается уникальной общедоступностью и проводится путем взаимодействия водного раствора энзима с выбранным носителем [184].

Площадь поверхности, общий объем пор носителя, величины рН среды, мера интенсивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе фермента, его концентрация, температура осуществления адсорбции оказывают определенное воздействие на процесс адсорбции и способность сохранять связи в образовавшихся комплексах фермент-носитель. Наиболее эффективно протекает адсорбционная иммобилизация, если все факторы, оказывающие на нее влияние, сбалансированы, и несоблюдение этого баланса может вызвать резкое ослабление взаимодействия фермента с носителем. Набор методических приемов, позволяющих определить оптимальные условия сорбции фермента на носителях, способствует повышению эффективности процесса и получению более качественных препаратов [214, 172].

Введение в поры геля состоит в том, что молекулы энзима вовлекаются в трехмерную сеть, которая образована плотно обвивающимися цепочками, основывающимися геле. Пространство между полимерными нитями в геле заполнено водой, которая представляет собой большую часть всего объема геля. Два существенных способа для иммобилизации фермента в геле:

- первый способ состоит в том, что фермент доставляется в водный раствор мономера, далее в результате полимеризации образуется гель с введенными в него молекулами энзима,

- при втором способе в раствор готового полимера вводится энзим, затем осуществляют перевод данного комплекса в гелеобразное состояние [195, 133].

Особенность иммобилизации за счет введения в полупроницаемые мембраны заключается в том, что полупроницаемая мембрана способна задерживать молекулы белка с большой молекулярной массой, а небольшие молекулы субстрата без труда проходят сквозь нее, в результате полупроницаемая мембрана разделяет водный раствор энзима от водного раствора субстрата. Существуют разновидности данного метода, которые отличаются лишь природой полупроницаемых мембран и способом их получения.

Микрокапсулирование проводят в замкнутых капсулах, имеющих тонкую полимерную оболочку сферической формы. В соответствии с методом двойного эмульгирования заранее приготовленная эмульсия водного раствора энзима в растворе полимера диспергируется в воде. Спустя какое-то время растворитель затвердевает, и образуются полимерные сферические гранулы с введенными молекулами энзима. При включении молекул фермента в волокна формируются нити [203, 142]. В качестве волокон, используемых для иммобилизации ферментов, применяются полимерные полые волокна природного или синтетического происхождения.

Для получения продукта реакции волокна с включенными в них ферментами помещают в емкость, содержащую раствор субстрата.

Липосомы применяют в качестве матрицы для иммобилизации ферментов. Включение энзимов в полимерные липосомы приводит к получению более стабильных комплексов по сравнению с обычными. Образовавшиеся системы достаточно широко применяют с целью определения состояния здоровья и раннего выявления заболеваний. Вследствие близости по строению к природным мембранам они могут предоставить необходимую информацию о протекании ферментативных процессов в клетках [192, 149, 156, 191].

Однако мембраны липосом могут представлять собой непреодолимые барьеры для высокомолекулярных субстратов, что является недостатком всех мембранных систем, используемых для иммобилизации ферментов. При применении систем двухфазного типа фермент не закрепляют на нерастворимом носителе, а добиваются ограничения свободы перемещения энзима в данной системе из-за его возможности растворяться лишь в одной из фаз.

Отличие химического метода иммобилизации заключается в том, что между носителями и молекулами фермента образуются новые ковалентные связи. Препараты, полученные с помощью химических методов иммобилизации, имеют следующие преимущества: образовавшиеся комплексы обладают особой прочностью за счет ковалентной связи, образовавшейся между ферментом и носителем, а также могут существенно изменять свои свойства, такие как стабильность, субстратная специфичность, каталитическая активность.

Для ковалентного связывания молекул энзимов с синтетическими полимерами (виниловые полимеры, нейлон, полиакриламид), природными полимерами (целлюлоза, сефароза), с неорганическими носителями (железо, стекло, керамика, титан, кремний) используют ряд химических реакций, осуществляемых из-за наличия реакционно-активных групп матриц. Согласно типам протекающих реакций различают азосочетание, алкилирование, ацилирование [181, 219].

В ходе этих реакций образование конъюгата энзим-носитель происходит вследствие взаимодействия химически активных групп фермента, распределенных хаотично по его молекуле. В результате химического воздействия на фермент возможна частичная или полная инактивация энзима. Вследствие этого значительное внимание уделяется разработке новых методов ковалентного связывания, созданию способов иммобилизации, при которых иммобилизация протекала бы эффективно, но с максимальным процентом сохранения каталитической активности энзима

[219].

Иммобилизация используется в аналитической практике, пищевой индустрии, фармацевтической промышленности. С помощью иммобилизации можно перевести биокатализатор из растворимого в гетерогенное состояние, придать ему новые структурно-функциональные свойства и использовать многократно в промышленной технологии [119, 19].

Иммобилизация позволяет пространственно разделить энзим и реагенты, что обуславливает возможность получать продукт без примеси фермента, и энзим может быть использован повторно, что способствует повышению его экономической эффективности. Иммобилизованные ферменты часто демонстрируют повышенную устойчивость и долго поддерживают активность, при этом появляется возможность в необходимый период прервать реакцию, восстановить фермент после завершения реакции и эксплуатировать его для следующего цикла биотехнологического производства. Кроме того иммобилизованные энзимы могут быть использованы для непрерывных технологических процессов, приводящие к увеличению производительности, облегчают контроль над производством и снижают энергозатраты [51].

Ферменты, иммобилизованные на колонках, можно применять вторично для определения различных субстратов как специфические катализаторы. В частности, для амперометрических и потенциометрических распознаваний некоторых веществ: мочевины, аминокислот, глюкозы, молочной кислоты созданы ферментные электроды [229].

Продолжительное, бесперывное функционирование иммобилизованных энзимов обеспечивается их повышенной стабильностью, сохранением активности продолжительное время как при хранении, так и при проведении анализа в клинической практике и в промышленных процессах. Энзимы, связанные с носителями, обладают свойствами неприсущими нативным энзимам [142].

Не менее важным аспектом иммобилизации является придание белкам требуемых физико-химических свойств (гидродинамика, пространственная ориентация биомолекул, агрегатное состояние), важных для расширения наших знаний о молекулярных механизмах регуляции каталитической активности энзимов, функционирующих *in vivo* в мембранах. Иммобилизация может быть использована при изучении процессов ассоциации субъединиц (димеризация, тетрамеризация) как факторов, определяющих функциональную активность белков.

Ферменты рассматриваются как перспективные средства медикаментозного лечения вследствие их чрезвычайно высокой активности и специфичности. Выделяют большое количество заболеваний, связанных с наследственным дефицитом или полным отсутствием синтеза ферментов в организме больного.

Однако недостатки ферментов препятствуют их широкому применению в практической медицине: исключительная лабильность в физиологических условиях, быстрое удаление из организма и разрушение под действием эндогенных протеаз, антигенность, нередкая токсичность и пирогенность, относительно малая доступность и дороговизна их чистых препаратов. В значительной мере все вышеперечисленные недостатки можно обойти, если использовать в медицине иммобилизованные производные, сохраняющие все специфические свойства нативного предшественника, но выгодно отличающиеся от него стабильностью, меньшей подверженностью действию расщепляющих ферментов, пониженной антигенностью, токсичностью и аллергенностью [168].

Появление и совершенствование методов иммобилизации веществ открыло новое направление в медицине, в котором используются ферментные препараты типа «контейнер», представляющие собой микросферы с относительно твердой и проницаемой оболочкой.

Ферменты в иммобилизованном виде могут применяться во всевозможных областях медицины: для клинического анализа в качестве

ферментных электродов и различных сенсоров, для поверхностной обработки ран, ожогов в виде тампонов, пленок, волокон, для экстраполярной очистки биологических жидкостей, как наполнители реакционных колонок, для модификации поверхности различного рода протезов с целью придания им совместимости с кровью и тканями и, главное, как терапевтические средства лечения местных и системных болезней [225].

Иммобилизованные ферменты обладают рядом преимуществ как лекарственные препараты:

1. Локальная доставка. Одно из преимуществ - транспорт лекарственного препарата непосредственно в органы, обладающие той или иной патологией. Это достигается в результате специального подбора диаметров наноструктур для различных целей. Для локализации в компартаменте введения объема распределения наночастиц, содержащих лекарство, необходимо, чтобы их величина была более диаметра пор капилляров. В органы и ткани без патологий при введении внутривенно наночастицы проникают с трудом, но в очагах воспаления за счет перфорации капиллярных стенок у наночастиц появляется повышенная проницаемость. В результате происходит пассивное ориентирование. При этом применяются моноклональные антитела, позволяющие снизить токсичность доставляющихся в органы и ткани фармацевтических препаратов и обеспечить эффективность действия.

2. Пролонгированное действие лекарства. Важное преимущество частиц как лекарственной формы - поэтапное освобождение лекарственного вещества, включенного в них, что удлиняет время его действия.

3. Более высокая стабильность иммобилизованных ферментных препаратов и клеток при адсорбционной иммобилизации на различных носителях.

4. Иммобилизация снижает такие побочные эффекты белковых препаратов как аллергенность в результате воздействия матрицы носителя.

5. Возможность конструировать комплексные препараты, например, поливалентные вакцины.

В ряде лабораторий разрабатываются методы получения высокостабильных биокатализаторов для гетерогенного процесса непрерывного гидролиза крахмалсодержащих субстратов с помощью иммобилизованной глюкоамилазы.

Была осуществлена адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на амфотерных полиэлектролитах, а также ионогенных носителях [2, 28]. Глюкоамилазу иммобилизовали сорбционным методом на анионитах - Дауэкс 1x10 (типа АВ-17), Амберлит IR-45 (близкий по структуре к АН-22) и на карбоксильном катионите типа КБ-4. Лучший эффект достигнут для катионообменной смолы [46], а для иммобилизации α -амилазы - на амфотерном полиэлектролите АНКБ-2 в разных ионных формах [2, 28, 46]. Сравнивая значения сорбционной способности и каталитической активности карбогидраз, иммобилизованных на различных формах полиамфолита, следует отметить, что для иммобилизации амилолитических ферментов предпочтительно использовать кислотно-хлоридную форму ионообменника АНКБ-2 [128].

Исследования, проведенные на кафедре биофизики и биотехнологии ВГУ, способствовали следующему выводу: наибольшей активностью обладала глюкоамилаза, адсорбционно иммобилизованная на ионитах Биокарб-Т (93,1 % от каталитической способности нативного энзима), КБ-41 (53,2 %) и ИА-1 (27,5 %) [28].

Глюкоамилаза, адсорбционно иммобилизованная на носителях с пластом каталитического волокнистого или пиролитического углерода, демонстрировала стабильность и максимальную ферментативную активность. Использование подложек без углеродного слоя или с графитоподобным поверхностным углеродом для иммобилизации фермента вызывало потерю активности и стабильности [48].

Г.А. Коваленко с соавторами (2007) была проведена иммобилизация глюкоамилазы на гранулированных углеродсодержащих носителях. Установлено, что идеальным носителем с точки зрения его максимальной стабилизации является углеродный носитель марки «Сибунит» [57]. Авторы показали, что глюкоамилаза (препарат «Глюкоавамарин»), иммобилизованная на углеродном носителе (марка «Сибунит») с помощью адсорбции, отличается увеличенной термостабильностью при сопоставлении с энзимом в растворе. Эксперименты по воздействию адсорбционной иммобилизации на кинетические параметры глюкоамилазы, включая константы скорости термоинактивации, указывают на колоссальный стабилизирующий эффект субстрата (декстринов) в реакционной среде. Повышение термоустойчивости иммобилизованного энзима достигается повышением концентрации декстринов. Биологический катализатор, изготовленный на основе адсорбционной иммобилизации с применением «Глюкоаваморина», при 60 °С характеризуется высокой операционной прочностью, а диапазон его полуинактивации превышает 30 суток. Его характеристики позволяют принимать участие в осахаривании крахмала [57].

Рядом авторов (2002) были изучены биокаталитические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на макроструктурированных углеродсодержащих керамических носителях, различающихся морфологией поверхностного углеродного слоя. Термостабильность глюкоамилазы, иммобилизованной на алюмосиликатном сотовом монолите, на котором был произведен синтез слоя каталитического волокнистого углерода, повышается в 20 раз если сравнивать с ферментом в растворе [120].

И.В. Шкутина, О.Ф. Стоянова, В.Ф. Селеменев провели адсорбционную иммобилизацию глюкоамилазы на амфотерных полиэлектролитах, а также ионогенных носителях. Для иммобилизации глюкоамилазы как носители были использованы волокнистые аминокарбоксильные полиэлектролиты К – 3, К – 5, АК – 22 – 1. Авторы

получили данные о полислойном характере адсорбции глюкоамилазы на волокнистых носителях [47].

Адсорбцию энзима осуществляли на пористом стекле (1963), микропористом КМ-сефадексе и КМ-целлюлозе (1971), ДЭАЭ-целлюлозе, ДЭАЭ-сефадексе, амберлите CG-50 [46]. Ряд исследователей иммобилизовали глюкоамилазу на полых волокнах триацетата целлюлозы (1975, 1976) с сохранением 10-60 % каталитической активности нативного энзима. Препараты характеризовались высокой стабильностью при 50 °С, однако с повышением температуры активность иммобилизованного энзима резко падала. При 65 °С время полуинактивации препаратов не превышало 5-6 дней, а эта величина слишком низка для промышленных процессов [198, 230].

D.B. Jonson et. al. (1976) получили глюкоамилазу, иммобилизованную на роговой подложке с помощью солей титана. Иммобилизация оказалась более эффективной по сравнению глутаральдегидным методом и адсорбцией на этом же носителе без обработки хлоридом титана [182].

Иммобилизация добавляет значительную жесткость полипептидной цепочке белка и увеличивает ее стабильность. Она устраняет необратимый распад олигомерных белков на мономеры.

В большинстве случаев чувствительность иммобилизованных ферментов к изменению рН выражена значительно меньше, чем у нативных ферментных препаратов, что и обеспечивает максимальную эффективность работы биокатализаторов. Отклонение максимального значения рН при иммобилизации можно представить как различие между местными величинами рН, найденными в объеме раствора и микросреды активного центра энзима. Модификация заряда субстрата при переходе его в продукт, заряд матрицы, проникновение субстрата и продукта, смена общего заряда белка при иммобилизации воздействуют на локальное значение рН микроокружения [167].

Иммобилизация ферментов, как правило, приводит к изменению кинетических и термодинамических параметров ферментативных реакций, поэтому их обозначают как кажущиеся (K_m' , V_{max}' и т.д.). Связывание фермента с носителем может приводить как к увеличению, так и к уменьшению значения константы Михаэлиса. Уменьшение значения K_m' может дать добавочные достоинства, используемые на практике, поскольку при небольших значениях концентраций субстрата скорость реакции будет быстрее, чем в случае нативного энзима. Если значение K_m' возрастает, то для совершения данной реакции необходимо больше субстрата, чем для несвязанного энзима. Изменения значений K_m' могут объясняться и нарушением микроокружения иммобилизованного фермента. Ионная природа носителя может влиять на величину K_m' , в частности, если субстрат и носитель заряжены одинаково, то K_m' увеличивается, если противоположно – уменьшается [190, 19].

При изучении свойств белковых молекул вопрос об их лабильности наиболее актуален. Данные литературы свидетельствуют о том, что макромолекулы способны быстро реагировать на изменение микроокружения (табл. 2). *In vivo* различают разные способы модификации окружающей белковую молекулу внутриклеточной среды, которая влияет на баланс взаимодействий, определяющих ее конформацию. Одним из таких модификаторов является температура. Повышение температуры делает доступными конформации с большей свободной энергией и приводит к более развернутой форме молекулы [186, 180].

Таблица 2

Оптимальные значения температуры и рН среды для функционирования
иммобилизованных глюкоамилаз

Продуцент	Носитель	Сохранение активности, %	Параметры до иммобилизации		Параметры после иммобилизации		Источник литературы
			t, °C	pH	t, °C	pH	
Aspergillus awamori-466	АНКБ-2	79	50	4,7	60-65	4,0-5,0	[101, 227, 116, 154, 209]
	АНКБ-10	54					
	АНКБ-35	67					
	АНКБ-50	69					
	АК-22	38					
	АК-22-1	91					
	К-3	95					
	К-4	90					
	К-5	93					
	Стиросорб	86					
Aspergillus awamori-466	АНКБ-2	41	65	5,0	65-72	4,0-5,0	[145]
	АНКБ-35	44					
	АН-251	35					
	КБ-4	44					
	В-17-2П	38					
	Стиросорб	44					
Aspergillus awamori-Глюкоавоморин	Углеродный носитель марки Сибунит	94% ¹	65-75	3,0-6,0	65-75	4,5-5,0	[96, 82, 153]
Aspergillus awamori ²	АВ-17-2П(1) ¹	46	40	4,7	50	4,7	[11]
	АВ-17-2П(2)	60			55		
	АВ-17 2П(3)	1,3			50		
Aspergillus niger	Альгинат	22	60	4,3	60	4,3	[89]
Aspergillus niger	Глицидилметакрилат, диметакрилат этиленгликоля	35	60	4,5	70	4,5	[114]

¹ В 53%-ном растворе декстринов иммобилизованная глюкоамилаза практически полностью сохранила первоначальную активность.

² При иммобилизации глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* в качестве носителя использовали анионит АВ-17-2П, используемый в сахаро-рафинадном производстве в течение 20 циклов (1), 400 циклов (2), и более года (3).

Таким образом, выбор носителя может оказывать решающее влияние на кинетические характеристики ферментативных реакций, осуществляемых иммобилизованными ферментами.

1.4. Носители для иммобилизации энзимов

Биохимические процессы протекают в условиях макромолекулярного краудинга, оказывающего воздействие на скорость и равновесие разных реакций клеточного метаболизма, конформационные переходы и образование надмолекулярных структур. Адсорбция ферментов или их комплексов может происходить на мембранных структурах клетки или компонентах цитоскелета и макромолекулы ферментов могут оказаться включенными в клеточные компартменты, адсорбируясь на различных органических соединениях.

Поэтому проведение исследований по изучению физико-химических, кинетических свойств ферментов, иммобилизованных на различных носителях, является необходимым условием для понимания закономерностей протекания реакций, катализируемых энзимами, присутствующими в клетке.

Основной проблемой для успешно проведенной иммобилизации представляется подборка носителя, изучение каталитических аспектов катализа гетерогенными ферментными препаратами. Выбор носителя может оказывать решающее влияние на кинетические характеристики

ферментативных реакций, осуществляемых иммобилизованными ферментами.

Создание гетерогенных катализаторов немислимо без твердых носителей. Характер носителя и способ связывания с ним фермента влияют не только на количество привязанного биокатализатора и его каталитическую активность, но также и на стабильность.

На данный момент не найдено универсального носителя или единственной тактики связывания. Для иммобилизации конкретного биокатализатора необходимо подобрать индивидуальный способ связывания, учитывая дальнейшее использование полученного препарата как с точки зрения его каталитических свойств, так и его экономической приемлемости, особенно при использовании в промышленности. Поэтому необходимо разрабатывать разные типы твердых носителей, изучать их преимущества и недостатки и на этой основе подбирать оптимальный способ приготовления нерастворимого биокатализатора.

Носители, которые используются для создания иммобилизованных энзимов, могут быть как органического, так и неорганического происхождения [142, 26]. Носители должны обладать достаточной механической прочностью, биологической и химической стойкостью, наибольшей удельной поверхностью, высокой проницаемостью для молекул фермента и субстратов, высокой пористостью и относительной дешевизной.

В природе отсутствуют универсальные носители, которые обладают всеми данными свойствами, что обуславливает большой выбор используемых для иммобилизации материалов.

Органические носители, применяемые в настоящее время, делят на полимеры синтетические и природные. Синтетические полимеры подразделяются на полиэфирные, полиамидные, полиметиленовые носители, а природные полимеры - на белковые, липидные, полисахаридные согласно их биохимической классификации. В зависимости от метода иммобилизации, свойств фермента, используемого для иммобилизации, назначения

полученного препарата к перечисленным носителям могут предъявляться дополнительные требования.

В качестве носителей для производства гелей и микрокапсул активно используются для иммобилизации энзимов синтетические полимеры: полиамидные носители, производные акриловой кислоты, полимеры на основе стирола. Высокомолекулярные вещества подобного типа являются базой для изготовления микропористых и макропористых ионитов, применяемых при сорбционной иммобилизации и для приготовления ионообменных материалов [138, 187].

Включение энзимов и клеток в полиакриламидный гель (ПААГ) используется весьма широко. Некоторые фирмы производят носители разнородного типа, выпускаемые на основе ПААГ и агарозы [49]. Полиамидные носители имеют ряд достоинств: они могут иметь различную физическую форму в виде порошков, мембран, волокон, трубок, гранул, а также обладают биологической инертностью и стабильностью к воздействию биологических факторов, что способствует широкому применению для медицинских целей.

На основе силикагеля, глины, циркония, металлов и их оксидов (железа и титана) создаются разные типы неорганических носителей для иммобилизации энзимов. Широкому внедрению неорганических носителей в процессы производства способствуют возможность их регенерации, придания им любой конфигурации.

Носители, изготавливаемые на основе микропористых кремнеземов, имеют ряд преимуществ: химическую инертность к растворителям, механическую прочность, присутствие жесткого каркаса с определенным размером пор, а также стойкость к микроорганизмам. Однако кремнеземы используются в ограниченном диапазоне рН, для них характерна неспецифическая сорбция, которая может быть устранена различными модифицирующими воздействиями. Модификация повышает стоимость

кремнеземных носителей, поэтому внедрение их в промышленность ограничено.

Биоалюмосиликаты, глины, в том числе пористая керамика, включающая как алюмосиликаты, так и окислы титана, циркония или другие добавки, являются более пригодными для промышленного использования. Одними из распространенных носителей являются уголь и графитированная сажа. Носители на основе металлов и их оксидов весьма перспективны и обладают высокой механической прочностью, довольно невысокой стоимостью, стабильностью и отличными гидродинамическими свойствами [36].

Природные полимеры легко вступают в разнообразные химические реакции из-за наличия свободных функциональных групп, обладают высокой гидрофильностью, доступностью, что позволяет широко использовать их в качестве носителей для иммобилизации ферментов. Данные носители несовершенны, так как они неустойчивы к действию отдельных микроорганизмов и имеют значительную стоимость [177, 18, 17, 232].

В качестве полисахаридных носителей, используемых для иммобилизации ферментов, применяют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные, гепарин, полисахариды, получаемые из морских водорослей (альгиновые кислоты и их соли, состоящие из соединенных 1,4-связями остатков D-маннурановой и L-гулурановой кислот) [179].

Альгинаты при комнатной температуре без внесения реагентов способны к гелеобразованию, легко биodeградируют в условиях микроокружения в клетке. В клинической практике эти соединения применяются для получения иммобилизованных препаратов, гормонов, пробиотиков [161, 170, 143, 157].

Липосомы – контейнеры, образованные несколькими концентрическими замкнутыми фосфолипидными бислоями, причем жидкое содержимое их изолировано от внешней среды. В настоящий момент липосомы активно используются для доставки различных фармацевтических

препаратов, обладающих значительной токсичностью. Липосомы обладают рядом свойств, таких как биосовместимость, универсальность, которые позволяют использовать их в качестве носителей для обширной области фармакологически активных веществ (гормоны, противоопухолевые и противомикробные препараты, ферменты, иммунобиологические препараты, вспомогательные источники энергии для клетки, носители генетической информации любого организма). Вещества, заключенные в липосомы, защищены от воздействия ферментов, что способствует увеличению эффективности создаваемых препаратов, подвергающихся биодegradации в биологических жидкостях. Одно из достоинств липосом перед другими носителями при правильном подборе компонентов – постепенное высвобождение лекарственного вещества, инкорпорированного в них, что увеличивает время его действия, вследствие того, что липосомы относительно легко разрушаются в организме. Липосомы без свойств антигена в процессе доставки лекарств экранируют включенные в них биоактивные молекулы от контакта с иммунной системой, не вызывая защитных и аллергических реакций организма. [113, 83, 193, 158].

Важными свойствами белков как носителей являются значительная сорбционная емкость, способность к лизису в организме человека и формированию тонких пленок (благодаря фибриллярной природе). Иммунизацию на носителях белкового происхождения можно производить, используя сшивающие агенты. При использовании *in vivo* медицинских препаратов, основанных на белковых носителях, одним из недостатков является высокая иммуногенность. В качестве носителей довольно часто применяются структурные белки: фиброин, кератин, коллаген, сократительные белки (миозин), белки, участвующие в транспорте различных веществ (сывороточный альбумин).

В данный момент особенную важность имеют труды по исследованию структурно-функциональных свойств протеинов соединительной ткани, в том числе коллагена и его производных.

Носители белковой природы обладают проницаемостью для участников ферментативной реакции, вероятностью производства гранул, мембран, значительной площадью поверхности, высокой химической прочностью, невысокой стоимостью, в результате чего возрастает интерес исследователей к носителям белковой природы [69, 70, 85, 6]. Сложная молекулярная структура, предрасположенная к формированию фибрилл и волокон, и наличие на поверхности коллагена аминокислотных остатков способствует как адсорбции биологически активных и лекарственных (низко- и высокомолекулярных) веществ так и химическому связыванию.

Коллаген - фибриллярный белок, образует остов соединительной ткани организма (кость, сухожилие, дерма, хрящ) и придает ей прочность и эластичность. Процент от всего белка в организме составляет от 25 до 33%. Выделяют разные типы коллагена, каждый из них преобладает в разных тканях и выполняет определенную роль. Коллагеновые волокна четко сориентированы. В центральной части костных пластинок волокна имеют продольное направление, в периферической - поперечное и под углом, что характерно для пластинчатой костной ткани, лежащей в основе большого количества плоских и трубчатых костей скелета. Подобное расположение коллагеновых волокон благоприятствует созданию единой волокнистой структуры, и в случае расслоения фибриллы одной пластинки смогут продлиться в смежные. Прочность костной ткани достигается за счет вплетания поперечно ориентированных коллагеновых волокон в интерстициальные пластинки. Возможность выносить огромные механические нагрузки в сухожилиях достигается вследствие образования плотных параллельных волокон. Коллаген формирует фибриллярную сеть в хрящевом матриксе, которая придает прочность хрящу, а прозрачность роговицы глаза обусловлена участием коллагена в образовании гексагональных решёток задних пограничных мембран, которые участвуют в преломлении световых лучей. В частях дермы, испытывающих постоянное давление (кожа локтей, подошв, ладоней), фибриллярные нити коллагена

строго ориентированы и формируют хорошо развитую сеть, а в зарастающей ране они агрегированы крайне беспорядочно [232, 144, 171].

Молекула коллагена состоит из трех полипептидных цепей, образующих правую тройную спираль, и образует молекулу тропоколлагена. Особенностью первичной структуры коллагена является то, что каждой третьей аминокислотой в полипептидной цепи является глицин, одну треть образуют пролин и 4-гидроксипролин, около 1% - гидроксизин, встречаются остатки 3-гидроксипролина и 5-гидроксизина. Одна из отличительных черт коллагена - наличие остатков гидроксиаминокислот в полипептиде. Гидроксирование пролина и лизина происходит посттрансляционно. Фибриллярная структура коллагена стабилизируется поперечными, ковалентными связями, образующимися между гидроксиаминокислотами, количество которых вырастает в результате процессов старения [215].

Коллаген находит большое применение в пищевой и косметической промышленности, медицине. Разрабатываются различные модификации молекул коллагена, при которых приобретает нужный лечебный эффект, специализированные пластыри и губки (губка кровоостанавливающая коллагеновая, губка коллагеновая с метилурацилом, губка коллагеновая с сангвиритрином и др.), средства локального гемостаза для лечения повреждений, ожогов, трофических язв, порезов, пролежней [183, 141].

Известно, что коллаген способен образовывать конъюгаты с биологически активными веществами, что создает возможности разрабатывать коллагеновые материалы направленного действия: антикоагулянтного, гемостатического, антисептического, стимулирующего регенерацию и остеогенез.

Коллаген обладает способностью сорбировать большое количество веществ, обладает способностью к резорбции и утилизации организмом. Низко- и высокомолекулярные вещества, заключенные в коллагеновые

волокна, освобождаются при лизисе, обеспечивая поэтапный пролонгированный эффект [148, 151, 202, 173].

Белковые препараты значительно ограничены в своем применении в клинической практике. Элластин и коллаген обладают наименьшей иммуногенностью, поэтому преимущества у протеинов соединительной ткани.

Работы по изучению углеродных материалов наиболее перспективны на сегодняшний день. Открытие углеродных нанотрубок (УНТ) позволяет предсказать перспективы их внедрения в области биологии и медицины. Особенностью этих молекул является их каркасная форма. Углеродные нанотрубки включают только атомы углерода и представляют новейшую аллотропную форму углерода.

На первых этапах изучения иммобилизованных препаратов на нанотрубках были получены данные, что ферменты и белки могут проникать внутрь нанотрубок, а также оседать на их поверхности. Углеродные нанотрубки могут быть использованы в качестве материалов для создания биосенсоров с чувствительностью, достаточной для распознавания иммуногенов и катализируемых ферментами реакций [92]. Углеродные нанотрубки предназначены для создания зондов с целью идентификации биофункциональных рецепторов, а также могут служить субстратом для роста нейронов. Демонстрирование вероятности образования взаимодействий между биологическими и биоактивными материями (белками, углеводами, нуклеиновыми кислотами) с нанотрубками представляется существенным экспериментальным шагом.

L. Nano (2003) разработали биосенсор на основании полупроводниковой одностенной нанотрубки. Экспериментаторы смогли иммобилизовать глюкозооксидазу на одиночной одностенной нанотрубке, которая являлась полупроводниковым материалом, сформированным на кремниевой пластине. Используя метод атомной силовой микроскопии, было обнаружено, что около пятидесяти процентов видимости изображения

нанотрубки выстлано ферментом. С применением электронно-лучевой литографии были произведены электроды, включающие слой золота (30 нм) и слой титана (5 нм), а также осуществлены измерения электрических величин при стандартных условиях [160].

Иммобилизация глюкозооксидазы значительно снизила проводимость нанотрубки. Нанотрубки, модифицированные в присутствии глюкозооксидазы (по сравнению с нативными), в диапазоне рН 4-5 – 5,0 стали восприимчивыми к изменению рН среды. При рН=5,5 их электропроводность увеличивалась. Полупроводниковые одностенные нанотрубки, покрытые глюкозооксидазой, восприимчивы к D-глюкозе. При внесении моносахарида в раствор их проводимость усиливается (для нативных нанотрубок без глюкозооксидазы такой эффект не наблюдается). Глюкозооксидаза в ходе реакции преобразования глюкозы в глюконолактон испытывает конформационные изменения, а аминокислотные остатки активного центра изменяют свои зарядовые свойства [132, 91, 146, 165].

Рассмотрение литературных сведений по этому вопросу привело к следующему заключению. Иммобилизация энзимов благоприятствует разрешению проблемы адресной доставки лекарств в организме и экстраполированному эффекту энзиматических препаратов. Получение иммобилизованных ферментов сопровождается использованием различных носителей всевозможной природы.

Применение биополимеров, целиком гидролизуемых и вытесняемых собственными тканями, устраняет угрозу аккумуляции в тканях человека матрицы носителя. Коллаген располагает незначительной иммуногенностью и его исключительные физико-химические свойства отвечают многим правилам, которые соблюдаются при производстве новейших лекарственных форм.

Одним из основных направлений молекулярной биофизики ферментов является пространственная ориентация ферментов при их взаимодействии с различными типами носителей, агрегатное состояние, гидродинамика,

повышение стабильности к денатурирующим факторам производства и внутренней среды организма, сохранение каталитической активности при хранении и в производственных циклах, легкость их регенерации и возможности придания им любой конфигурации (мембраны, нити).

Важным преимуществом иммобилизованных ферментных препаратов обладают носители, созданные на основе природных биополимеров. При этом матрица не только не вызывает токсических эффектов, но и обладает функциональной физиологической активностью. Большое будущее имеет использование углеродных нанотрубок как носителей для адсорбционной иммобилизации, состоящих исключительно из атомов углерода, причем белки могут быть иммобилизованы как в глубине, так и снаружи нанотрубок. Эти конструкции являются основой биосенсоров.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объект исследования

Объектом исследования служил коммерческий препарат глюкоамилазы (КФ 3.2.1.3.) из *Aspergillus awamori*, который подвергали очистке от низкомолекулярных примесей, используя гель-хроматографию на сефадексе G-25.

В качестве субстрата использовали растворимый картофельный крахмал фирмы «Экрос». Носителями для иммобилизации служили коллаген, полученный из соединительной ткани крупного рогатого скота (КРС) и дермы прудовых рыб на кафедре продуктов животного происхождения Воронежского государственного технологического университета, альгинат натрия, выделенный из бурых водорослей фирмы «Fluka», пищевые волокна, полученные из сахарной свеклы на кафедре технологии бродильных и сахаристых производств Воронежского государственного технологического университета и углеродные нанотрубки (УНТ) фирмы «ТаунитМд».

В альгинате натрия звенья гулурановой и маннуроновой кислот связаны в основном α -1,4-гликозидными связями. Водород в карбоксильных группах замещён на натрий. Соотношение маннуроновая: гулурановая кислота изменяется в зависимости от вида водорослей от 1: 1,04 до 1:1,9.

Пищевые волокна, используемые в нашей работе, представляют смесь целлюлозы, пектина, лигнина. Лигнин – это комплекс ароматических полимеров с похожей структурой. Мономерные составляющие макромолекулы лигнина образуются из фенилпропана.

Многослойные углеродные нанотрубки «ТаунитМд» получены газофазным химическим осаждением с применением катализатора Ni/Mg при атмосферном давлении и температуре 580-650 °С. Наружный диаметр нанотрубок составляет 8-15 нм, длина порядка 2 и более мкм.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методика сорбционной иммобилизации глюкоамилазы

5 г носителя оставляли в 25,6 мл ацетатного буфера (pH 4,5) при комнатной температуре. 5 мл раствора энзима (10^{-5} моль/л) вносили к суспензии носителя и перемешивали в емкости электрической мешалкой 1,5 часа. Впоследствии центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин, отмывали осадок сначала ацетатным буфером (pH 4,5), после этого - дистиллированной водой до изъятия из промывных вод белка (контроль реализовывали на спектрофотометре Shimadzu RF- 5301 PC при $\lambda=280$ нм). Концентрацию белка в иммобилизованном энзиме устанавливали модифицированным методом Лоури [76, 204], а активность – глюкозооксидазным методом с помощью наборов стандартных реагентов «Оксохром ГЛЮКОЗА С» («Lachema», Чехия) [105].

2.2.2. Определение содержания белка в препарате стандартным методом Лоури

Принцип метода - формирование комплекса, образованного вследствие взаимодействия протеидов со щелочным раствором сульфата меди (биуретовая реакция), вольфраматом и молибдатом натрия (реакция Фолина на тирозин и триптофан). Метод Лоури представляет собой достаточно чувствительный метод количественного измерения концентрации белка [204, 76].

Для иммобилизованной глюкоамилазы применили модифицированный метод Лоури. Суть модификации состояла в том, что на первой стадии анализа разрывали связи между матрицей носителя и молекулой энзима. С этой целью иммобилизованный препарат помещали в раствор K, Na-тартрата, приготовленный на 1 M NaOH, на 10 мин при 50 °C. Далее определяли

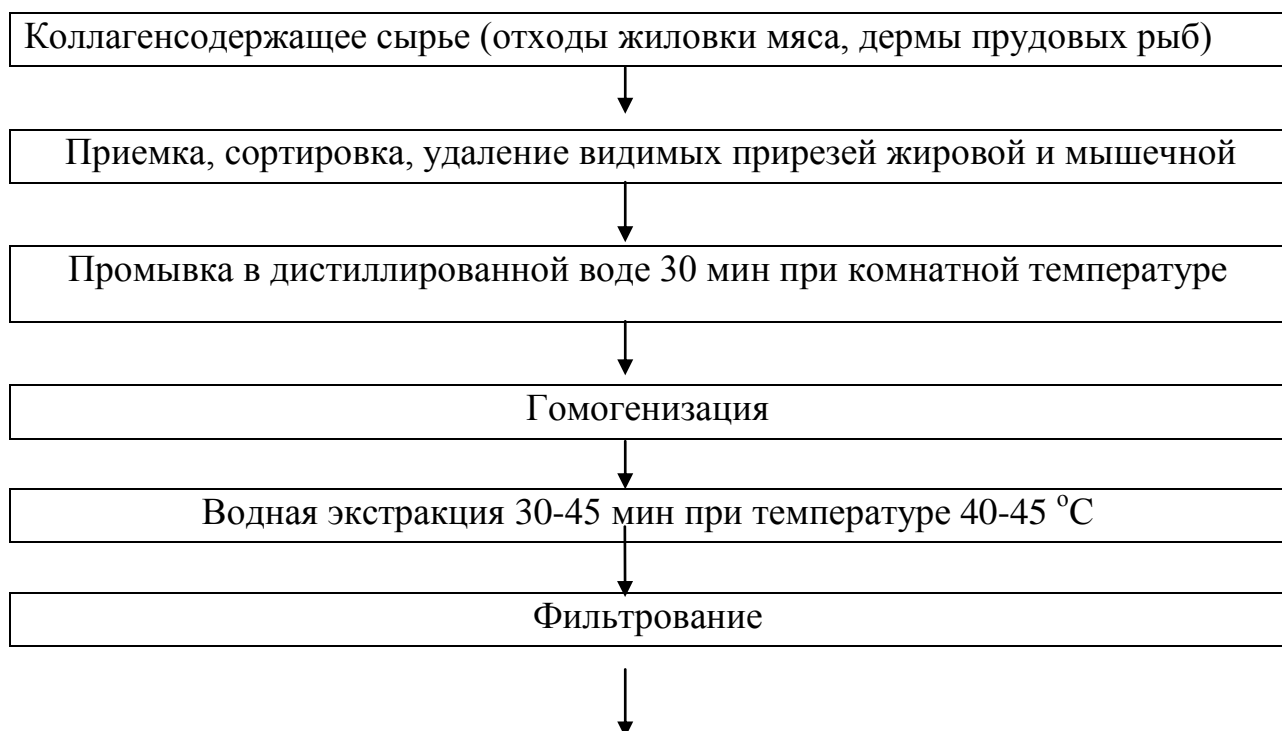
концентрацию белка в иммобилизованном препарате стандартным способом по методу Лоури [204 , 76]

2.2.3. Подготовка коллагена, выделенного из соединительной ткани крупного рогатого скота и дермы прудовых рыб, к иммобилизации

Объектами исследования служили: отходы производства заводов мясной промышленности (жилки, сухожилия, фасции, дермы прудовых рыб), полученные после их предварительной обработки методом ферментативной конверсии для гидролиза балластных белковых фракций в сочетании со щелочно-солевым или пероксидно-щелочным методами.

Схема получения коллагена как носителя при адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы, полученного из отходов производства мяса и мясных продуктов, а также дермы прудовых рыб, представлена в таблице 3 [7, 4, 8, 5, 6].

Схема получения коллагена из отходов жилочки мяса и дермы прудовых рыб





2.2.4. Выделение пищевых волокон их свекловичного жома

Свеклу измельчали в стружку в присутствии раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,03 % к массе свеклы), использованного в качестве реагента, ингибирующего окислительные ферменты и устраняющего потемнение свекловичной массы. Свекловичную стружку гомогенизировали до крупы размером 2,0 мм, экстрагировали 90 минут при температуре 70-72 °С, промывали экстрагированную свекловичную стружку дистиллированной водой, прессовали и сушили при температуре 60 °С. Высушенный препарат отделяли с помощью сита (размер ячеек 0,3 мм) и определяли показатель белизны [80, 93].

2.2.5. Глюкозооксидазный метод определения каталитической активности глюкоамилазы

В основе метода определения глюкоамилазной активности лежит специфическое нахождение глюкозы, образующейся при воздействии глюкоамилазы на растворимый крахмал.

Принцип метода состоит в окислении β -D-глюкозы кислородом воздуха под влиянием глюкозооксидазы до глюконовой кислоты. В результате появляется эквимольное содержание перекиси водорода. Количество перекиси водорода измеряли при осуществлении реакции окислительного азосочетания с замещенным фенолом и 4-аминоантипирином, катализируемой ферментом пероксидазой. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации глюкозы в растворе.

Измерение осуществляли с помощью набора стандартных реагентов «Оксохром ГЛЮКОЗА С» («Lachema», Чехия).

Техника измерения каталитической активности глюкоамилазы

1 мг энзима растворяли в 1 мл дистиллированной воды, к образовавшемуся раствору добавляли 2 мл раствора крахмала в ацетатном буфере (рН 4,7). Смесь инкубировали 10 минут в термостате при 37 °С. Спустя 10 минут прекращали реакцию гидролиза, путем кипячения на водяной бане (2 минуты). Далее остужали до комнатной температуры, забирали по 10 мкл раствора гидролизата и вносили в каждую пробирку по 2 мл рабочего реагента. Реакционную смесь перемешивали и выдерживали 30 минут при комнатной температуре (20-25 °С) или 15 минут при 37 °С. После завершения инкубации определяли оптические плотности опытной и калибровочной проб на спектрофотометре Shimadzu RF- 5301 PC при $\lambda=500$ нм.

Смесь 2,0 мл рабочего реагента с 0,01 мл стандартного раствора глюкозы использовали, как калибровочную пробу. Контрольная проба включает 2,0 мл рабочего реагента и 0,01 мл дистиллированной воды.

Расчет концентрации глюкозы проводили по формуле:

$$C = D_o / D_{ст} \cdot 10 \text{ (моль/л)},$$

где D_o и $D_{ст}$ – оптические плотности соответственно образца и стандарта, измеряемые относительно контрольной пробы.

Расчет каталитической активности (A) глюкоамилазы проводили по формуле:

$$A = \frac{a}{b \times 180 \times t},$$

где a - количество глюкозы в 1 мл гидролизата, мкг; b - количество энзима в 1 мл гидролизата, мг/мл; t - время гидролиза, мин; 180 - молекулярная масса глюкозы.

2.2.6. Подготовка исследуемых образцов к анализу методом ИК-спектрофотометрии

Для подготовки образцов полимеров для ИК-спектрофотометрии применили прессование с бромистым калием (KBr), специально предназначенным для спектральных работ. Монокристаллический KBr подвергали измельчению в вибраторе Ардена-Фирша (Германия), потом помещали в сушильную камеру при 200 °С на 48 часов до полного устранения остатков воды. Контроль на чистоту и отсутствие влаги осуществляли в результате регистрации спектрограмм. Изготовленный KBr хранили в бюксе с крышкой, находящемся в эксикаторе.

Исследуемые образцы энзима просушивали до постоянной массы при 37 °С для исключения свободной воды. После этого их обрабатывали в вибраторе Ардена-Фирша, взвешивали 1,5 мг препарата энзима и 150 мг подготовленного бромистого калия и тщательно перемешивали в вибраторе

Ардена 10 минут. Далее 100 мг смеси перемещали в пресс-форму, равномерно распределяя по всему каналу, и ставили под пресс (давление 150 кг/см²) на 30 минут.

Измерение величин светопропускания образцов белков осуществляли при помощи универсального ИК-спектрофотометра Specord M-80 (Германия) и Vertex-70 в промежутке 4000-400 см⁻¹.

При первичной обработке проводили сглаживание. Для серии спектров первоначально определяли количество полос. С этой целью каждый спектр обрабатывали отдельно в автоматическом режиме. Полученные данные второй производной анализировали вместе для всей изучаемой серии. Если минимум на графике второй производной, соответствующий некоторому пику, присутствует на всех графиках, то он считается достоверным. Присутствие минимума лишь на отдельных графиках позволяет характеризовать его как шум. В дальнейшем обработка серии спектров проводилась путем включения параметров всех действительно имеющих полос поглощения и их анализа. При неизменности параметров во всей серии находили и фиксировали их среднее значение. Если параметр изменялся, то считали, что зависимость его от состава системы должна быть гладкой, и аппроксимировали ее гладкой кривой.

2.2.7. Методика определения различных типов вторичных структур в молекуле глюкоамилазы

Методы количественного анализа, используемые в ИК-спектрофотометрии, основаны на определении интенсивности поглощения, связанной с концентрацией вещества по закону Бугера-Ламберта-Бера соотношением:

$$D = -\lg T = -\lg I/I_0 = \lg I_0/I = \varepsilon c l,$$

где I – интенсивность прошедшего через образец света; I_0 – интенсивность света, падающего на образец; ε – молярный коэффициент

экстинкции, $\text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$; c – концентрация исследуемого вещества, моль/л; l – длина оптического пути образца, см; D – оптическая плотность образца; T – коэффициент светопропускания.

Записав данное уравнение через десятичный логарифм, получим:

$$\lg I/I_0 = \varepsilon c l.$$

Отношение I/I_0 называют светопропусканием и обозначают как T . Отсюда:

$$c = \lg T / \varepsilon l.$$

Количество полос в ИК-спектре вещества обусловлено числом активных колебаний молекул, то есть числом колебаний атомов с изменением дипольного момента молекулы. Величина частоты поглощения в ИК-спектре зависит от природы атомов, образующих колеблющуюся группу, от силы связи между ними и от строения молекулы.

Интенсивность колебаний полосы зависит от величины индуцированного светом дипольного момента. Колебательные полосы поглощения лежат в интервале $4000\text{-}400\text{ см}^{-1}$. Они создаются переходами, которые достоверно относятся к конкретным химическим связям ($\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$ и др.).

Далее показаны величины полос поглощения амид I и амид II (табл. 3), свойственных белковым молекулам, по интенсивности которых осуществляется расчет процентного соотношения типов вторичной структуры [65].

Обработку группы спектров выполняли, учитывая параметры всех действительно имеющихся полос поглощения и их оценки. Конечная обработка результатов включала варьирование только интенсивности полос.

Таблица 3

Параметры полос амид I и амид II различных конформаций
полипептидов

Конформация	Амид I		Амид II	
	Частота, см ⁻¹	Коэффициент экстинкции, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	Частота, см ⁻¹	Коэффициент экстинкции, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹
Неупорядоченная форма	1650-1654	320	1546-1553	210
β-структуры	1615-1623	980	1530-1535	340
	1691-1699	180	1563	100
α-спирали	1644-1649	750	1548-1553	340

Надежность полученных данных проверяли как по средним квадратичным отклонениям, так и по разности между этими спектрами и снятыми индивидуальными пиками. Разность между модельными и экспериментальными спектрами, как правило, не превышала 7 %.

2.2.8. Определение размеров молекул методом динамического светорассеивания

Определение размеров глюкоамилазы проводили на приборе Photocor complex ($\lambda=647$ нм, лазер гелий-неоновый), предназначенном для определения размеров полимеров, коэффициентов диффузии и молекулярной массы. В основе работы Photocor Complex лежит метод фотонной корреляционной спектроскопии. Определение корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света и интегральной интенсивности рассеяния предоставляет возможность определять размер дисперсных частиц

в жидкостях и молекулярную массу полимеров. Границы измеряемых размеров составляют от единиц нанометров до 6 микрон.

При интерпретации данных использовали программу Photocor Software для Windows. Форму молекул принимали за идеально сферическую.

2.2.9. Методика атомно-силовой микроскопии

В сканирующем атомно-силовом микроскопе исследуется механизм взаимодействия между сдвигаемыми материалами, в качестве которых выступает изучаемая поверхность и острое,двигающееся по ней. Из литературы известно, что на малых интервалах между двумя атомами ($\sim 2,8 \text{ \AA}$) воздействуют силы отталкивания, а на больших – силы притяжения.

В приборе SOLVER P47PRO применяется алмазная игла (кантилевер), плавно скользящая над поверхностью образца, сканирующая данную поверхность. Изменение силы, существующей между острием и поверхностью, служит причиной тому, что пружина, на которой оно закреплено, смещается, и сдвиг отмечается датчиком. В АСМ как датчики могут применяться восприимчивые (прецизионные) измерители смещений (оптические, емкостные или туннельные датчики). Значение сдвига упругой части (пружины) дает сведения о высоте рельефа – топографии поверхности и, более того, о специфике межатомных взаимодействий.

Чтобы приготовить образцы для атомно-силовой микроскопии использовали взвесь УНТ и наносили ее на поверхность кремниевой пластины в объеме 0,5 мл. Далее кремниевую пластину с осажденными на ней УНТ в течение суток инкубировали с 5 мл буферного раствора энзима в концентрации 10^{-6} моль/л (рН 4,7). Излишки жидкости удаляли с помощью фильтровальной бумаги и высушивали в эксикаторе с влажностью 5-10 % в течение нескольких часов.

Визуализацию поверхности молекул глюкоамилазы осуществляли на сканирующем зондовом микроскопе SOLVER в лаборатории наноскопии и нанотехнологии ЦКПНО ВГУ.

2.2.10. Статистическая обработка результатов экспериментов

Все экспериментальные исследования осуществлялись в 4-5-кратной повторности. Результаты статистически обрабатывали на ПК с помощью интегрированного пакета статистической обработки данных Statgraphics традиционным способом с использованием t-критерия Стьюдента при 95 % уровне значимости.

Глава 3. РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА

3.1. Исследование условий адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене

Адсорбционная иммобилизация переводит фермент из числа гомогенных растворимых катализаторов в гетерогенные, что позволяет повысить стабильность биокатализатора при влиянии денатурирующих факторов среды. Полученные ферментные препараты располагают большим количеством технологических преимуществ, появляется реальность их неоднократного применения.

Коллаген – перспективное, высокоэффективное, дополнительное вещество в технологии лекарственных средств, характеризующееся рядом важных свойств (стимулятор регенерации тканей, пролонгатор). Биологическая совместимость к тканям животного организма лежит в основе применения препаратов на основе коллагена в медицинской и ветеринарной деятельности.

Вследствие этого мы провели сорбционную иммобилизацию глюкоамилазы на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС и дермы прудовых рыб.

Установлено, что максимальное количество фермента иммобилизуется на начальных стадиях, через 1,5 часа достигается равновесие. Показано, что количество глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС, составило 20 мг/г носителя, а для глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, выделенном из дермы прудовых рыб, 8 мг/г носителя (рис. 1 «Приложения»).

Результаты наших экспериментов соответствуют данным Г.А. Коваленко, Л.В. Перминовой и др., показавших, что при адсорбции

глюкоамилазы на углеродном носителе «Сибуните» содержание фермента составило 10-13 мг/г носителя [67, 57, 48].

Выявлены оптимальные значения рН и температуры, при которых происходит эффективное связывание фермента с субстратом. Максимальная сорбция наблюдается при рН 4,5 (рис. 2 «Приложения»), так как при данных значениях рН значительная часть энзима находится в виде цвиттер-иона. При увеличении значений рН эффективность связывания фермента с субстратом уменьшается, что, по-видимому, связано с возрастанием сил отталкивания. Крутизна кривых зависимости сорбционной емкости глюкоамилазы от рН является индивидуальной характеристикой белка и зависит от дипольного момента глобулы при изменении рН раствора [22].

Показано, что эффективная адсорбция глюкоамилазы достигается при 50 °С, последующий рост температуры способствует разворачиванию белковых глобул [122], что уменьшает процесс сорбции (рис. 3 «Приложения»).

При адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене, выделенном из дермы прудовых рыб и из соединительной ткани сельскохозяйственных животных, более высокую степень сохранения каталитической активности мы отметили у препаратов на основе коллагена из соединительной ткани КРС (51,1 %; и 66,25 % соответственно.)

Подвергая анализу данные, полученные нами, пришли к выводу, что сорбция глюкоамилазы на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС и дермы прудовых рыб, осуществляется при 50 °С и рН 4,5.

3.2. Физико-химические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене

Рассмотрение физико-химических свойств гетерогенных ферментных препаратов способствует выявлению особенностей функционирования мембраносвязанных гидролитических ферментов *in vivo* и более рациональному применению иммобилизованных образцов в производственных целях.

Получение экспериментальных данных по влиянию pH, температуры на каталитическую активность глюкоамилазы - одна из главных ступенек доклинических исследований для создания новых ферментных препаратов в лечебной практике.

Выявлено, что для иммобилизованного фермента максимальная каталитическая активность проявляется после 30 минут взаимодействия фермента с субстратом при постоянном перемешивании, тогда как для свободного фермента максимальная активность имеет место через 10 минут выдерживания в статических условиях, что связано с затруднениями при подходе молекул субстрата к активному центру иммобилизованного фермента.

Для свободной глюкоамилазы температурный оптимум функционирования - 50 °С. При 60 °С имеет место достоверное уменьшение каталитической активности энзима по причине происходящих процессов денатурации (рис. 1).

Установлено, что для иммобилизованного фермента наивысшая каталитическая активность наблюдается при температуре 55 °С, что на 5 °С выше, чем для свободного энзима. При изучении зависимости каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС, мы наблюдали более широкий диапазон температур (45 °С - 60 °С), при которых она демонстрирует наибольшую каталитическую активность.

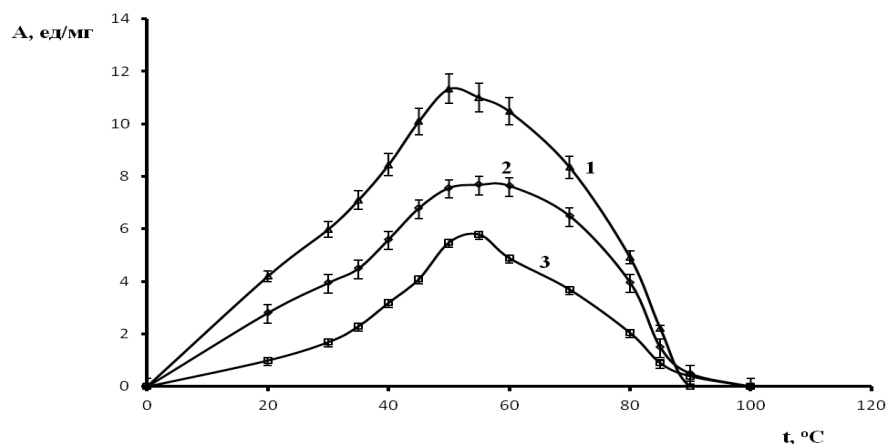


Рис. 1. Зависимость каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, от температуры: 1 - свободная глюкоамилаза; 2 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС; 3 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, выделенном из дермы прудовых рыб

Смещение температурного оптимума вправо при иммобилизации может быть обусловлено тем, что образование комплекса фермент-носитель сопровождается усилением жесткости третичной структуры, отвечающей за каталитическое превращение субстрата. Образование дополнительных связей в иммобилизованном препарате придает стабильность третичной структуре белков.

Наши эксперименты показали, что свободный фермент и глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС и из дермы прудовых рыб, характеризуются одинаковым рН-оптимумом (рН 4,7) (рис. 2). Для глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене из соединительной ткани КРС, наблюдается расширение интервала оптимальных значений рН (4,5-5,0).

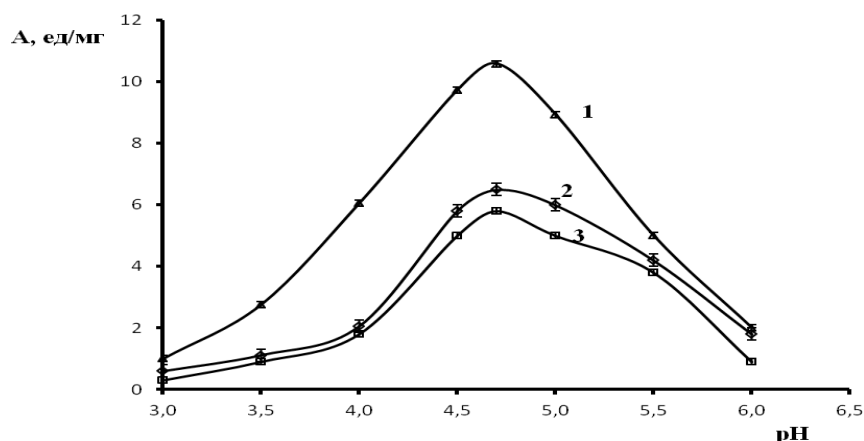


Рис. 2. Зависимость каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, от pH: 1 - свободная глюкоамилаза; 2 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС; 3 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, выделенном из дермы прудовых рыб

Влияние pH на каталитическую активность ферментов можно объяснить сложным многостадийным характером биохимических превращений, протекающих в водном растворе [197], а также ионизацией некоторых составляющих ферментативной реакции. За счет разнообразия R-радикалов аминокислотных остатков молекула энзима содержит значительное количество ионизирующихся групп, которые существуют в виде целого ряда ионных форм. Кислотность среды влияет на каталитические свойства ферментов путем воздействия на процесс возникновения фермент-субстратного комплекса и его распада на конечный продукт и молекулу энзима, способного к следующему каталитическому акту [22].

При иммобилизации молекула попадает в микросреду, отличную от водного раствора энзима, обусловленную присутствием функциональных групп матрицы носителя, что способствует расширению pH-оптимума. При этом происходит изменение мобильности третичной структуры энзима, и при правильном подборе носителя можно добиться

благоприятного воздействия различных химических групп матрицы на физико-химические свойства энзима, что приведет к устойчивости фермента к факторам внешней среды при сохранении каталитической активности энзима [15, 119, 19].

Многokратность применения энзимов является одним из преимуществ при иммобилизации биообъекта, что обеспечивает достаточно высокую стабильность энзима и возможность отделения продукта в чистом виде [67]. Наши эксперименты свидетельствуют о том, что глюкоамилаза, адсорбционно связанная с коллагеном, полученном из соединительной ткани КРС, при 10-кратном применении в реакторе периодического действия сохраняла 66 % активности свободного энзима. При иммобилизации фермента на коллагене из дермы прудовых рыб, имело место уменьшение каталитической активности (45 %).

Глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС, более устойчива к действию внешних факторов (рН, температуре) и обладает большей сорбционной ёмкостью.

Показано, что содержание белка и каталитическая активность энзима в иммобилизованном препарате на коллагене, который содержался в лабораторных условиях, сохранялись в течение 2 лет. Комплекс глюкоамилаза-коллаген характеризуется достаточной прочностью и не разрушается при гидролизе крахмала, что позволяет применять коллаген как носитель и протектор низко- и высокоактивных веществ.

Основываясь на полученных результатах можно предлагать коллаген, полученный из соединительной ткани КРС, для дальнейшего использования в качестве носителя гидролитических ферментов с целью получения фармацевтических препаратов пролонгированного действия.

3.3. Кинетические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене

Исследования кинетико-термодинамических аспектов ферментативных реакций расщепления полисахаридов, используя воздействие разных физико-химических факторов, предоставляют возможность выявить индивидуальность действия гидролаз при изготовлении различных видов пищевой продукции и фармацевтических препаратов, а также исследовать механизмы регуляции каталитической активности энзимов *in vivo*.

Для выяснения оптимальной концентрации субстрата, при которой энзим обладает наивысшей способностью к гидролизу крахмала, была изучена зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной глюкоамилазы от концентрации раствора крахмала (рис. 3).

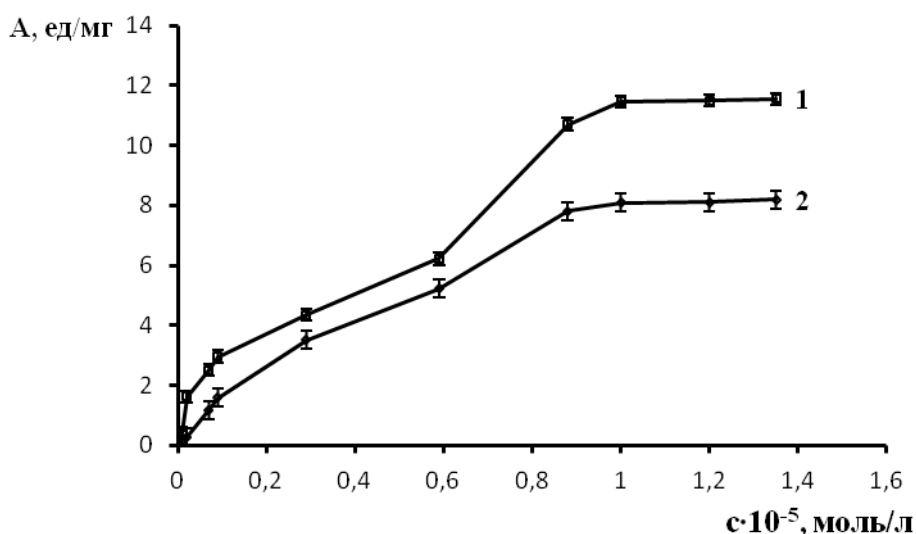


Рис. 3. Зависимость каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС, от концентрации субстрата: 1 - свободная глюкоамилаза; 2 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС

Установлено, что кривые V от S для свободного фермента не подвергаются действию уравнения Михаэлиса-Ментен [152, 33, 60]. Зависимость скорости гидролиза крахмала от концентрации субстрата для обоих ферментов обладает двумя стационарными режимами [46, 72]. Для нативной и иммобилизованной глюкоамилазы оптимальная концентрация субстрата равна $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

В ряде работ Т.А. Ковалевой, О.М. Кожокиной показано, что глюкоамилаза характеризуется наличием четвертичной структуры. Глюкоамилаза относится к мембранносвязанным белкам, способным транспортировать глюкозу. Симметричные димеры играют существенную роль в образовании трансмембранных каналов. Причем субъединицы, образующие симметричную четвертичную структуру, бывают идентичными, однотипными, эволюционно родственными белками, которые обладают одинаковым способом свертывания полипептидной цепи в пространстве [174, 55].

Используя модифицированные кривые зависимости V от S в координатах Лайнуивера-Берка и Иди-Хофсти были определены величины K_m (K_m') и V_{max} (V_{max}') для обоих препаратов глюкоамилазы. Для свободной глюкоамилазы K_m и V_{max} составляют $0,24 \cdot 10^{-5}$ моль/л и $11,55$ мкмоль·мг/мин, а для глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене из соединительной ткани КРС, K_m' и V_{max}' $-0,45 \cdot 10^{-5}$ моль/л и $8,1$ мкмоль·мг/мин соответственно.

Иммобилизация способствует увеличению K_m и уменьшению V_{max} реакции относительно нативного энзима, которые поэтому называют кажущимися.

Изменение кинетики ферментативного катализа может указывать на то, что присоединение носителя к ферменту приводит к небольшому изменению конформации отдельных субъединиц, сказывается на кооперативности их взаимодействия в процессе расщепления крахмала,

что вносит существенный вклад в кинетику взаимодействия активного центра энзима с молекулами субстрата [245, 246].

3.4. Воздействие УФ-излучения на физико-химические свойства иммобилизованной глюкоамилазы

Анализ литературы показывает, что иммобилизованные ферменты более стабильны к влиянию УФ-света, характер связи энзима с носителем проявляет сильное воздействие на стабильность иммобилизованного фермента к воздействию физических факторов [109, 24]. При воздействии УФ-излучения на ферменты они утрачивают каталитическую активность в результате фотолиза аминокислотных остатков (прежде всего, триптофана, тирозина, фенилаланина и цистина).

Нами были изучены УФ-индуцированные преобразования каталитической активности глюкоамилазы в нативном состоянии и при адсорбционной иммобилизации на коллагене (табл. 3). Показано, что фотоинактивация нативного энзима обнаруживается уже при дозах УФ-облучения 151-302 Дж/м². При последующем росте дозы каталитическая активность глюкоамилазы статистически достоверно снижается.

Очевидно, что при действии УФ-света в дозах 151-1510 Дж/м² происходит фотолиз аминокислотных остатков микроокружения активного центра и фрагментов полипептида, формирующих гидрофобное ядро, что вызывает повреждение третичной структуры глюкоамилазы и приводит к лишению ее каталитической активности.

Зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной глюкоамилазы от дозы облучения имеет сложный характер. Процесс инактивации глюкоамилазы при воздействии УФ-облучения представляет собой сумму двух или нескольких экспонент [22].

Таблица 3

Влияние УФ-излучения на каталитическую активность глюкоамилазы,
иммобилизованной на коллагене

Свободный фермент			Иммобилизованный фермент	
Доза, Дж/м ²	Каталитическая активность, средняя, ед/мг	p	Каталитическая активность, средняя, ед/мг	p
0	11,60±0,03	<0,05	8,10±0,05	<0,05
151	6,01±0,03	<0,05	6,53±0,02	<0,05
302	5,38±0,02	<0,05	6,02±0,03	<0,05
453	4,36±0,07	<0,05	5,11±0,04	<0,05
604	4,04±0,05	<0,05	4,64±0,03	<0,05
755	4,01±0,02	<0,05	3,91±0,03	<0,05
906	3,94±0,03	<0,05	3,79±0,05	<0,05
1057	3,78±0,02	<0,05	3,67±0,03	<0,05
1208	2,65±0,05	<0,05	3,67±0,07	<0,05
1359	2,01±0,05	<0,05	3,65±0,03	<0,05
1510	1,09±0,02	<0,05	3,63±0,05	<0,05

Обработка результатов экспериментов по изучению фотоинактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы в координатах ($\ln A/A_0 / t$) позволила установить наличие точки перегиба и двухэкспоненциальный характер фотоинактивации, указывающий на наличие четвертичной структуры изучаемого фермента (рис. 4). Данные эффекты, по-видимому, могут быть обусловлены процессом диссоциации глюкоамилазы на отдельные субъединицы.

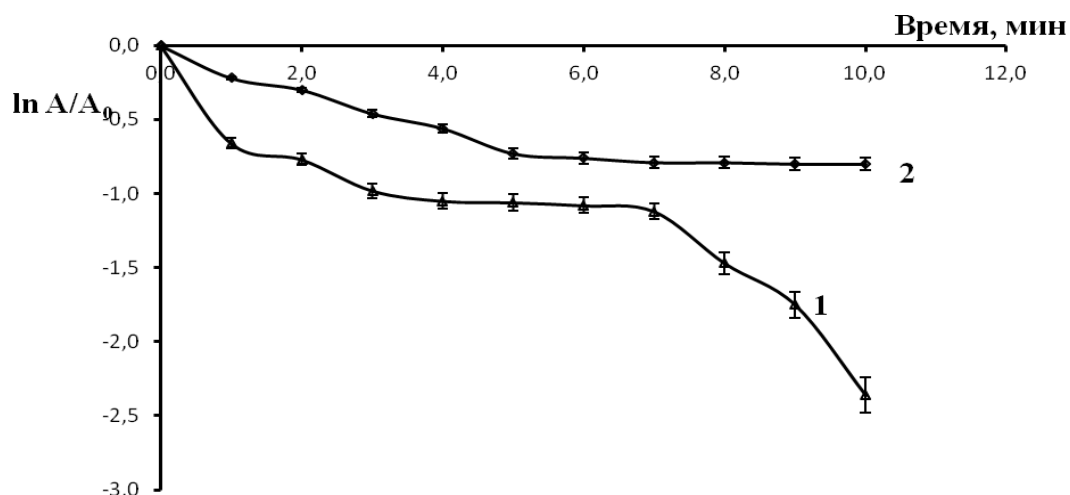


Рис. 4. Динамика каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС, при УФ-облучении: 1 - свободный фермент; 2 - глюкоамилаза, адсорбционно связанная с коллагеном

Выявлено, что иммобилизация способствует снижению значений констант фотоинактивации. Анализ наших экспериментов позволяет прийти к выводу, что степень фотоинактивации фермента в присутствии носителя уменьшается. Так, каталитическая активность свободной глюкоамилазы при УФ-облучении в дозе 1510 Дж/м^2 снижается на 90,6 %, а для иммобилизованного на коллагене - на 55,2 %. Образование связи между глюкоамилазой и коллагеном содействует повышению устойчивости иммобилизованного фермента к УФ-излучению за счет усиления жесткости третичной структуры глюкоамилазы при адсорбции на коллагене, а также влияния матрицы на диффузию свободнорадикальных продуктов, появляющихся при воздействии УФ-излучения на изучаемые препараты.

Наши экспериментальные данные свидетельствуют о фотозащитном эффекте коллагена, обусловленном следующими причинами: коллаген может вступать во взаимодействие с молекулой глюкоамилазы, образуя комплекс,

более фоторезистентный, чем нативные молекулы белка; коллаген связывает активные фотопродукты радикальной природы, предотвращая фотоокисление определенного числа существенных аминокислот энзима при его УФ-облучении.

Не исключено, что способность коллагена конкурировать за свободные радикалы лежит в основе его протекторного действия по отношению к молекулам глюкоамилазы, подвергнутым воздействию УФ-излучения [84, 131].

Методом электронного парамагнитного резонанса выявлено, что изначальными продуктами УФ-облучения коллагена является атомарный водород, который весьма нестабилен и легко вступает в радикальные реакции [45]. Возможным местом связывания свободнорадикальных продуктов, образующихся при фотоокислении в молекуле коллагена, являются остатки пролина, глицина, фенилаланина, тирозина, содержание которых в этом белке составляет 11,7 %, 26,7 %, 2,5 %, 1 % соответственно.

Фотопротекторное воздействие коллагена на глюкоамилазу может быть вызвано как акцептированием им активных форм кислорода, так и формированием комплекса коллаген-фермент, более фоторезистентного, чем нативный энзим.

Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ПРОЦЕССА ТЕРМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА КОЛЛАГЕНЕ

4.1. Изучение кинетических особенностей процесса термической инактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы

Температура - один из главных параметров состояния биологических систем, от которого зависят скорости и механизмы ферментативных реакций. Термостабильность фермента – важнейший фактор, определяющий возможность его практического применения в промышленном производстве [22]. Получение термостабильного препарата глюкоамилазы с повышенной активностью, способного стабильно работать при температурах выше 70 °С, позволило бы оптимизировать затраты в различных отраслях пищевой промышленности (хлебопечении, спиртовой, кондитерской и т.д.). Исследование кинетики термоинактивации энзимов позволит предсказывать устойчивость энзима через определенный момент времени.

В этой связи мы исследовали кинетику процесса термической инактивации глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене адсорбционным методом. Растворы нативной и иммобилизованной глюкоамилазы выдерживали в интервале времени 10-50 минут при температурах (50-70 °С), далее определяли каталитическую активность.

Остаточная активность свободного фермента после 50 минут инкубации при 50 °С составила около 84 %, при 60 °С - 79 % (рис. 5, 6). После инкубации фермента при 70 °С спустя 50 минут каталитическая активность не наблюдается. При иммобилизации энзима имеет место достоверное повышение процента сохранения активности при нагревании до 60 °С, причем иммобилизованный энзим удерживает каталитическую активность и при 70 °С (1,5 %). Выявлено, что глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, является более термостабильным

ферментом. С увеличением температуры скорость инактивации энзимов возрастает, а для большинства из них потеря активности настает при температуре около 70 °С [81].

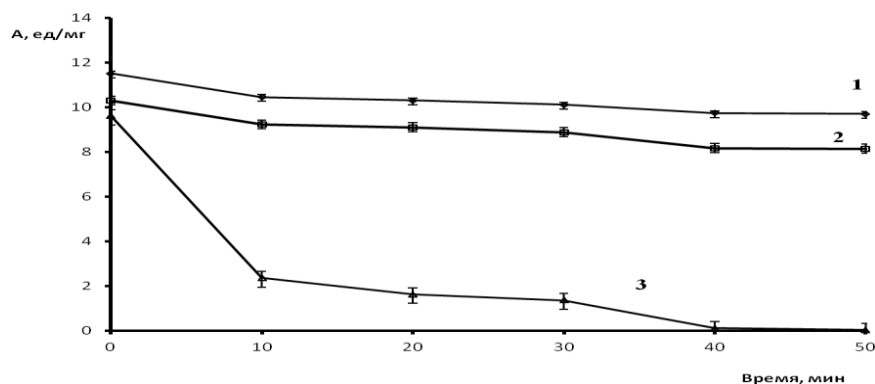


Рис. 5. Зависимость каталитической активности нативной глюкоамилазы от времени термической инактивации:

1- 50 °C, 2- 60 °C, 3- 70 °C

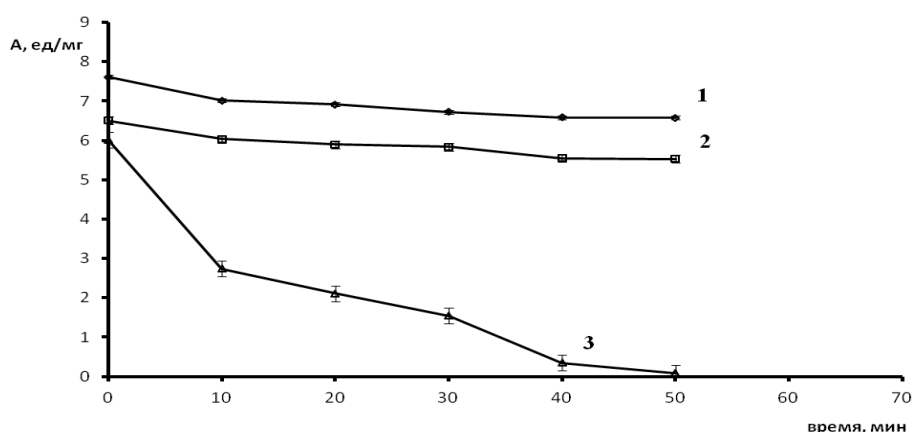


Рис. 6. Зависимость каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, от времени термической инактивации:

1- 50 °C, 2- 60 °C, 3- 70 °C

Через 40 минут при 70 °C нативный фермент теряет свою способность к гидролизу, а иммобилизованный сохраняет 5,8 % активности, полная инактивация полученного препарата наступает через 50 минут. Проанализировав эти данные мы можем сделать вывод о повышенной устойчивости иммобилизованного энзима относительно свободного.

Термоинактивация носит сложный характер и механизм данного процесса для нативной и иммобилизованной глюкоамилазы не идентичен. С целью выяснения механизма термоинактивации нами были изучены кинетические кривые свободной и иммобилизованной на коллагене глюкоамилазы в полулогарифмических координатах (рис. 7, 8, 9, 10). Необходимо отметить, что ход кривых зависимости A/A_0 и $\ln A/A_0$ от времени термоинактивации при 50 °С, 60 °С не имеет достоверных отличий. Наличие точек «излома» в полулогарифмических координатах подтверждает тот факт, что данные по термоинактивации глюкоамилазы удовлетворяют основным положениям теории диссоциативной инактивации [81].

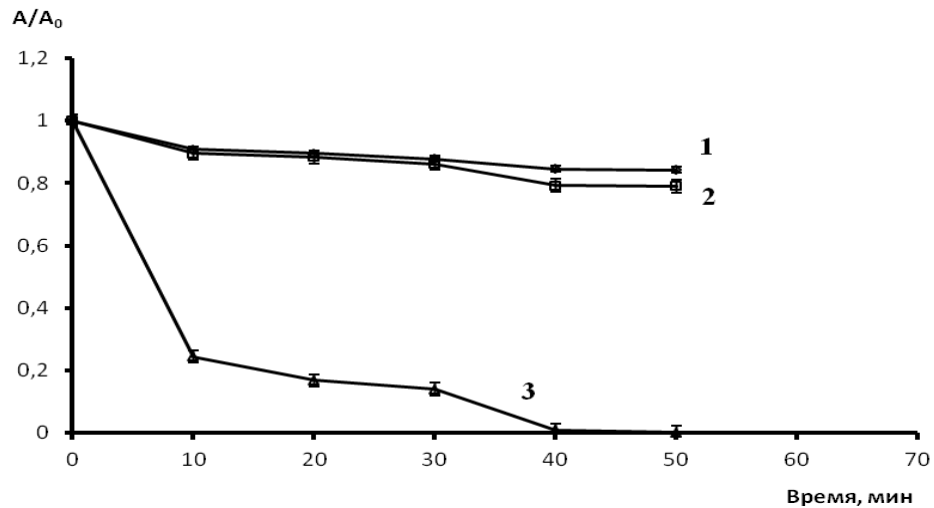


Рис. 7. Зависимость A/A_0 от времени термоинактивации свободной глюкоамилазы при : 1 - 50 °С; 2 - 60 °С; 3 - 70 °С

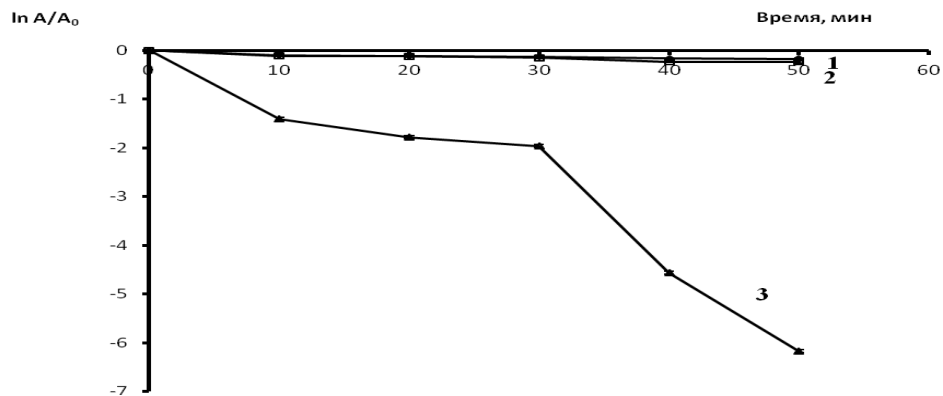


Рис. 8. Зависимость $\ln A/A_0$ от времени термоинактивации свободной глюкоамилазы при : 1 - 50 °С; 2 - 60 °С; 3 - 70 °С

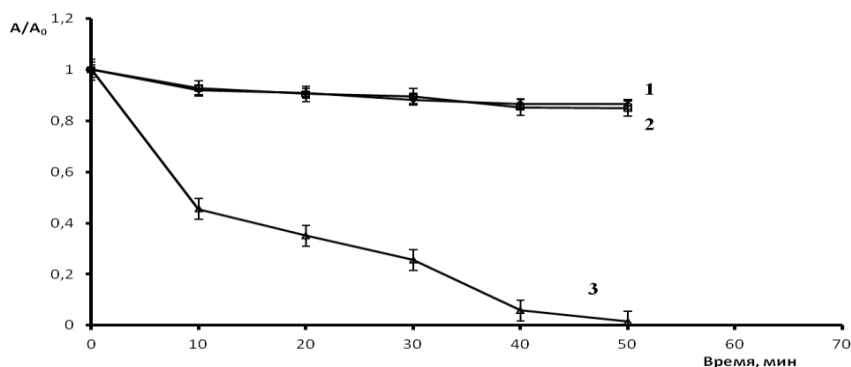


Рис. 9. Зависимость A/A_0 от времени термоинактивации иммобилизованной глюкоамилазы при: 1 - 50 °C; 2 - 60 °C; 3 - 70 °C

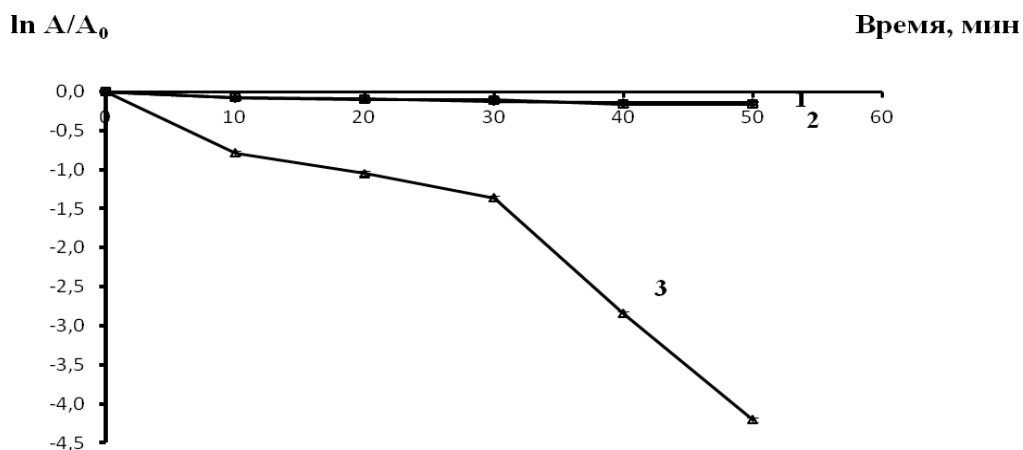


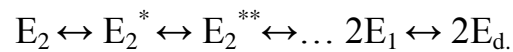
Рис.10. Зависимость $\ln A/A_0$ от времени термоинактивации иммобилизованной глюкоамилазы при: 1 - 50 °C; 2 - 60 °C; 3 - 70 °C

Имеются экспериментальные данные, показывающие, что термоинактивация ферментов с четвертичной структурой проходит по механизму, включающему в себя обратимую диссоциацию активных форм энзима на неактивные мономеры и собственно денатурацию - необратимую инактивацию мономеров. Такой тип деградации был установлен для многих ферментов, обладающих надмолекулярной структурой (аминоацилазы, глюкозооксидазы, глутаматсинтетазы) [97].

О.М. Полторак, Е.С. Чухрай предложили теорию о механизме стабилизации сложных белков, состоящих из двух и более протомеров,

многоточечными межбелковыми контактами, что закрепляет активную форму фермента и препятствует ее диссоциации в растворах (конформационный замок) [98].

Концепция конформационного замка предполагает поэтапную деформацию связывающих участков в местах межбелкового взаимодействия, поэтапное разрушение которых влечет к потере энзимом каталитической активности. Вероятная схема в этом случае имеет вид:



E_2 – нативный стабильный олигомерный фермент; E_2^* , E_2^{**} – лабильный фермент; $2E_1$ – промежуточная активная форма (мономер); $2E_d$ – неактивная денатурированная форма фермента.

Определение положения точки излома на кинетической кривой термоинактивации олигомерного фермента позволяет провести расчет элементарных констант процесса термоинактивации [22].

В соответствии с уравнениями, рекомендуемыми теорией диссоциативной инактивации, был проведен расчет константы диссоциации глюкоамилазы при температурах 50 °С, 60 °С, 70 °С ($K_{\text{дисс.}}$) и эффективной константы скорости инактивации ($K_{\text{эфф.}}$). Для определения константы скорости денатурации ($K_{\text{ден.}}$) использовали значение $K_{\text{эфф.}}$ и координаты точки излома на кинетической кривой (табл. 4).

$$K_{\text{дисс.}} = 4 E (A_0 - A)^2 / A_0 \cdot A;$$

$$K_{\text{ден.}} = K_{\text{эфф.}} \cdot (A_0 + A) / 2 \cdot (A_0 - A);$$

A - активность энзима в момент времени τ (ед/мг белка) ; A_0 – начальная активность фермента (ед/мг белка); E - концентрация фермента (моль/л).

Эффективную константу скорости термоинактивации ($K_{\text{эфф.}}$) определяли из тангенса угла кинетической кривой термоинактивации.

$$K_{\text{эфф.}} = 1/\text{tg } \alpha \cdot [E].$$

Таблица 4

Расчетные кинетические константы термоинактивации глюкоамилазы,
иммобилизованной на коллагене

Температу ра, °С	$K_{эфф.}, c^{-1}$		$K_{дисс.}, \text{моль/л}$		$K_{ден.}, c^{-1}$	
	1	2	1	2	1	2
50	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$0,85 \cdot 10^{-2}$	$0,18 \cdot 10^{-6}$	$0,13 \cdot 10^{-6}$	$9,8 \cdot 10^{-2}$	$5,9 \cdot 10^{-2}$
60	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$0,24 \cdot 10^{-6}$	$0,11 \cdot 10^{-6}$	$12,1 \cdot 10^{-2}$	$10,1 \cdot 10^{-2}$
70	$2,9 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$4,66 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$1,48 \cdot 10^{-2}$	$0,9 \cdot 10^{-2}$

1 - свободная глюкоамилаза; 2 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС; $K_{дисс.}, \text{моль/л}$ - константа диссоциации глюкоамилазы на субъединицы (определяли из тангенса угла наклона начального участка кривой термоинактивации); $K_{эфф.}, c^{-1}$ - эффективная константа скорости термоинактивации (рассчитывали из тангенса угла наклона второго участка кинетической кривой); $K_{ден.}, c^{-1}$ - константа скорости термоинактивации глюкоамилазы (денатурации)

Анализируя зависимость каталитической активности глюкоамилазы от времени термоинактивации в диапазоне температур от 50 до 70 °С, происходит неполное нарушение слабых гидрофобных взаимодействий и взаимодействий Ван-дер-Ваальса при воздействии тепловой энергии, что сопровождается незначительной потерей ферментом биокаталитической способности и изменением $K_{эфф.}$ и $K_{ден.}$

Наблюдаемая инактивация энзима при увеличении температуры от 60 до 70 °С объясняется тем, что излишняя тепловая энергия вызывает разрушение гидрофобных взаимодействий, которые вносят большой вклад в стабильность третичной структуры. В результате этого происходит глубокое раскручивание полипептидной цепи. Такая интерпретация процесса хорошо согласуется с данными литературы по

термоинактивации ферментов, где указывается на решающую роль в этом процессе тепловой энергии при действии высоких температур более 50 °С [29, 129].

Установлено, что при 50 и 60 °С ход кинетических кривых для свободного и иммобилизованного энзима не имеет значительных отличий. Через 10 минут инкубации при 70 °С свободный фермент сохраняет 24,48 % каталитической активности, а иммобилизованный – 45,51 % соответственно.

Повышение термоустойчивости иммобилизованного препарата объясняется, по-видимому, образованием в комплексе носитель-фермент водородных связей, изменяющих конформацию белка, что препятствует разрушению гидрофобных взаимодействий и разворачиванию полипептидной цепи при воздействии высоких температур.

Показано, что с увеличением температуры до 70 °С возрастают $K_{эфф.}$ и $K_{дисс.}$ Однако константа диссоциации иммобилизованного фермента при 60 °С на 0,02 ниже, чем при 50 °С, а затем резко возрастает. Возможно, уменьшение константы диссоциации связано с тем, что иммобилизованный препарат демонстрирует наивысшую активность при 55-60 °С.

Установлено, что $K_{эфф.}'$, $K_{дисс.}'$ и $K_{ден.}'$ иммобилизованного препарата уменьшаются по сравнению со свободным энзимом, то есть образовавшийся комплекс глюкоамилаза-коллаген более устойчив к воздействию тепловой энергии и процесс диссоциации глюкоамилазы на мономеры замедляется, что сопровождается снижением эффективной энергии инактивации.

Особую значимость для энзимов с четвертичной структурой при утрате способности гидролиза субстрата имеет плавление конформационного замка.

Графический анализ кинетических кривых термоинактивации свободной и иммобилизованной на коллагене глюкоамилазы позволяет определить число минимальных стадий в процессе термоинактивации (рис. 7, 8, 9, 10).

Анализируя кинетические кривые термоинактивации глюкоамилазы (рис. 7, 9) можно прийти к выводу о том, что процесс характеризуется наличием индукционного периода (10 минут), когда каталитическая активность энзима остается постоянной.

Значение n может свидетельствовать о числе скрытых изменений (плавление конформационного замка), предшествующих потере способности фермента осуществлять превращение молекулы субстрата. По данным ряда авторов, оно соответствует числу контактных участков между димерами [115, 216]. На поверхности глобул, входящих в состав глюкоамилазы, имеется ряд «гидрофобных пятен», которые могут определять взаимодействие между мономерами [66].

Число минимальных стадий термоинактивации (n), предшествующих потере активности, определяли из соотношения: $n = (0,13 + \delta) / (0,13 - 0,05 \delta)$, где δ - безразмерный индукционный период [118]. Определение безразмерного индукционного периода (δ) осуществляли графическим способом. Для этого в точке перегиба кинетической кривой (рис. 7, 9) проводили касательную. По длине отрезка, отсекаемого на оси ординат, искали величину δ .

Нами установлено, что для свободного фермента $\delta=0,08$; для иммобилизованного фермента $\delta=0,04$, то есть между субъединицами свободной глюкоамилазы имеется 2 гидрофобных контакта, при адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене число гидрофобных взаимодействий между субъединицами уменьшается вдвое. Возможно, в процессе иммобилизации глюкоамилазы на коллагене один из субъединичных контактов участвует в образовании связи с носителем, что способствует образованию комплекса фермент-коллаген, обладающего повышенной термостабильностью.

4.2. Термодинамические аспекты процесса термической инактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы

При изучении механизма термической инактивации белков ценную информацию можно получить путем определения термодинамических характеристик данного процесса: энтальпии ΔH и энергии активации $E_{\text{акт}}$.

Нами была использована стандартная методика для расчета термодинамических характеристик процесса термоинактивации глюкоамилазы [20].

Для определения ΔH использовали уравнение:

$$E_{\text{акт}} = \Delta H + RT$$

Энергию активации находили по графику Аррениуса из следующего соотношения:

$$E_{\text{акт}} = 2,303 \cdot R \cdot \text{tg} \alpha,$$

где α - угол, который составляет наклонная прямая с осью абсцисс.

ΔH рассчитывали по формуле:

$$\Delta H = E_{\text{акт}} - RT$$

где R – газовая постоянная (8,315 Дж/К·моль), T – абсолютная температура (К).

Таблица 5

Термодинамические параметры процесса термической инактивации глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене

Фермент	t, °C	$E_{\text{акт}}$, кДж/моль	ΔH , кДж/моль
Свободная глюкоамилаза	50	11,14	8,44
	60	13,4	10,64
	70	63,4	60,55
Иммобилизованная	50	14,47	11,79
	60	71,6	68,84
	70	71,6	68,75

Показано, что при нагревании раствора глюкоамилазы до 50-60 °С через 50 минут $E_{\text{акт}}$ и ΔH реакции гидролиза крахмала увеличивается незначительно. Экспериментальные данные по определению каталитической активности нативного энзима при воздействии вышеуказанных температур вполне соответствует термодинамическим параметрам (рис. 5). Значительное увеличение $E_{\text{акт}}$ и ΔH (в 6 раз) имеет место при нагревании до 70 °С, при этом каталитическая активность сохраняется лишь на 24,48 %. При адсорбционной иммобилизации на коллагене энергия активации реакции гидролиза субстрата и ΔH достоверно увеличивается при нагревании 50-70 °С, что и определяет лишь частичное сохранение каталитической активности гетерогенного биокатализатора (84,3 %, 70,7 %, 0,2 %) при оптимальной температуре реакции расщепления α -1,4-гликозидных связей (табл. 5).

Очевидно, при воздействии температур, не превышающих температуру денатурации, молекула энзима испытывает конформационные преобразования, определяющие стерические трудности при возникновении фермент-субстратного комплекса. Данные события приводят к увеличению энергетического барьера для реализации реакции катализа $E_{\text{акт}}$ и ΔH .

Известно, что наибольшее значение при переходе глобула-клубок имеет экспонирование гидрофобных групп, находившихся во внутреннем пространстве молекулы, наружу и повышение конформационной энтропии за счет перехода нативной структуры с малой свободой вращения атомов в гибкую структуру неупорядоченного клубка. Однако изменение энтропии в процессе денатурации определяется не только изменением конформационной энтропии, обусловленной переходом молекулы белка в неупорядоченное состояние. Существенный вклад противоположного знака вносит изменение структуры воды, соседствующей с экспонированными гидрофобными боковыми цепями. Упорядоченность воды вблизи боковых групп повышается, а это снижает энтропию денатурационного перехода.

Анализируя величины констант скоростей инактивации, энтальпии и энергии инактивации можно прийти к заключению о том, что нагревание фермента при 50-70 °С сопровождается увеличением термодинамических параметров глюкоамилазы ($E_{акт}$ и ΔH), что может быть вызвано разрушением водородных связей и гидрофобных взаимодействий в молекуле энзима.

Глава 5. РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА УГЛЕВОДНЫХ ПОЛИМЕРАХ

5.1. Подбор оптимальных условий для наиболее эффективной иммобилизации глюкоамилазы на углеводных носителях

В зависимости от конечной цели применения ферментного препарата можно улучшить его физико-химические свойства за счет правильного подбора носителя. Среди природных полимерных носителей кроме белков соединительных тканей применяются полисахаридные соединения. Их достоинством являются присутствие разных функциональных групп, доступность, а также ряд углеводов полимеров используется в клинической практике как БАВ или БАД, то есть носители могут оказывать благоприятное воздействие на организм.

Так же, как и большинство биополисахаридов, альгиновая кислота, выделяемая из морских водорослей, используется в клинической практике для лечения болезней желудочно-кишечного тракта [43].

Вследствие высокой сорбционной способности пищевых волокон они могут присоединять как молекулы воды на своей поверхности, так и углеводы с небольшой молекулярной массой, отдельные аминокислоты, холестерин. Пищевые волокна могут интенсивно связывать энзимы, участвующие в пищеварении, чужеродные для организмов соединения, желчные кислоты и многие токсические вещества [43].

Поэтому нами были изучены оптимальные условия для наиболее эффективной адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на углеводных носителях: альгинате натрия, выделенном из бурых водорослей (фирмы «Fluka») и пищевых волокнах, полученных из сахарной свеклы на кафедре технологии бродильных и сахаристых производств Воронежского государственного технологического университета.

Результаты экспериментов показали, что спустя 1,5 часа количество сорбированной глюкоамилазы составило 15 мг/г носителя для глюкоамилазы, иммобилизованной на альгинате натрия, а для глюкоамилазы, иммобилизованной на пищевых волокнах, 17 мг/г (рис. 4 «Приложения»).

Анализируя полученные данные, можно прийти к выводу, что оптимальная сорбционная иммобилизация глюкоамилазы на альгинате натрия осуществляется при 50 °С и рН 4,5 (рис. 5, 6 «Приложения»), а для глюкоамилазы, иммобилизованной на пищевых волокнах, при 50-60 °С и рН 4,7 (рис. 5, 6 «Приложения»). При иммобилизации глюкоамилазы на коллагене оптимальная адсорбция происходила при тех же условиях, что и на углеводных носителях.

По данным S. A. Costa, H. S. Azevedo, L. Rui наибольшее количество фермента сорбируется пищевыми волокнами, что может быть вызвано большой удельной поверхностью, обуславливающей доступность носителя для молекул энзима [43, 34].

Произведенный анализ материала, изложенного в статьях, а также исследования дают возможность предлагать пищевые волокна и альгинат натрия в качестве носителей для иммобилизации гидролитических ферментов с целью их использования в пищевой и фармацевтической промышленности.

5.2. Физико-химические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на альгинате натрия и пищевых волокнах

Наши опыты показали, что адсорбционно иммобилизованная глюкоамилаза на альгинате натрия сохраняет 63 % от каталитической активности нативного энзима, а на пищевых волокнах – 86 %, на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС - 66 %. При иммобилизации глюкоамилазы на пищевых волокнах фермент проявляет более высокую

активность, что можно объяснить структурой макропористого носителя, приводящей к уменьшению внутридиффузионного замедления гидролиза крахмала за счет более быстрого транспорта продуктов реакций в окружающий раствор.

При исследовании зависимости активности нативного и иммобилизованного фермента от времени инкубации с субстратом нами установлено (рис. 7 «Приложения»), что для иммобилизованного фермента на альгинате натрия также, как и на коллагене, предельная каталитическая активность проявляется после 30 минут взаимодействия фермента с субстратом при постоянном перемешивании, для иммобилизованного фермента на пищевых волокнах наивысшая каталитическая активность имеет место спустя 40 минут, тогда как для свободного фермента максимальная активность проявляется через 10 минут инкубации в статических условиях, что связано, по-видимому, с различным временем, необходимым для насыщения фермента субстратом, и особенностями зарядовых свойств поверхности пищевых волокон.

При адсорбционной иммобилизации на альгинате натрия оптимум расщепления субстрата глюкоамилазой сместился вправо на 5 °С (55 °С - оптимальная каталитическая активность иммобилизованного препарата) (рис. 11). Для глюкоамилазы, адсорбционно иммобилизованной на пищевых волокнах, температурный оптимум смещается на 20 °С вправо (70 °С) (рис. 11). Температурный оптимум для глюкоамилазы, сорбционно связанной с коллагеном, совпадает с оптимальной температурой гидролиза крахмала глюкоамилазой после иммобилизации на альгинате натрия (55 °С).

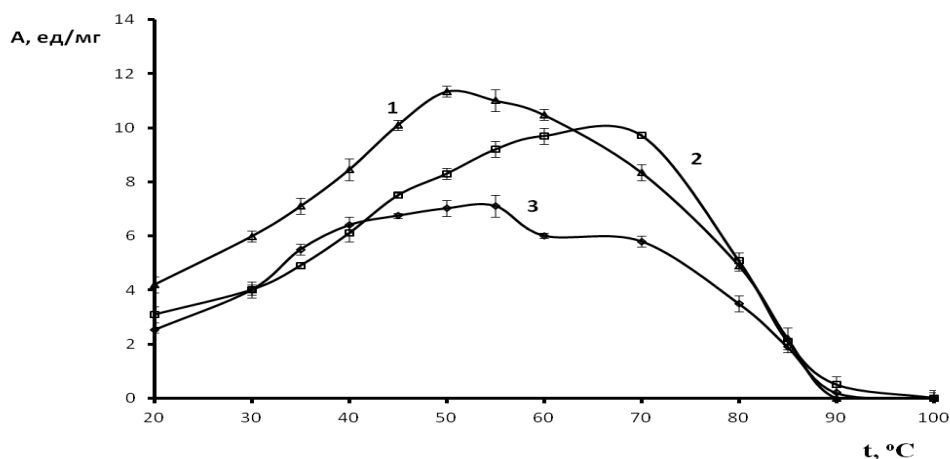


Рис. 11. Зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной глюкоамилазы от температуры: 1 - свободная глюкоамилаза; 2 - иммобилизованная на пищевых волокнах; 3 - иммобилизованная на альгинате натрия

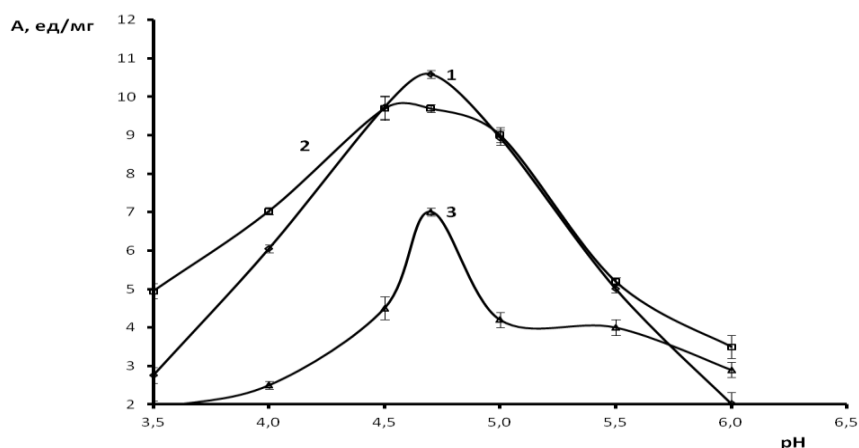


Рис. 12. Зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной глюкоамилазы от концентрации ионов водорода: 1 - свободная глюкоамилаза; 2 - иммобилизованная на пищевых волокнах; 3 - иммобилизованная на альгинате натрия

Нами установлено, что для иммобилизованного энзима на пищевых волокнах и коллагене наблюдается расширение диапазона оптимальных значений pH, который соответствует 4,5-5,0, а для глюкоамилазы, иммобилизованной на альгинате натрия, достоверного увеличения диапазона не наблюдается (рис. 12).

По данным ряда авторов, каталитическая активность ферментов предопределяется состоянием третичной структуры белка. Даже небольшие преобразования третичной структуры фермента приводят к потере возможности протекания реакции [54]. Адсорбция молекул фермента на природных полимерных носителях (коллагене, альгинате натрия, пищевых волокнах) приводят к уменьшению каталитической активности по сравнению с нативным биокатализатором. При иммобилизации глюкоамилазы за счет слабых взаимодействий фермента с носителем (водородных связей, гидрофобных сил сцепления) может нарушаться динамика конформационных переходов в полипептидной цепи, происходит их замедление, уменьшается число необходимых для катализа перестроек белковой молекулы и глубина их протекания. Уменьшение удельной активности иммобилизованной глюкоамилазы возможно вызвано частичным экранированием активного центра энзима. Таким образом, химическая структура матрицы носителя может служить регулятором каталитической активности гетерогенного катализатора. Иммобилизация придает жесткость полипептидному остову белка и предотвращает необратимую диссоциацию энзима на субъединицы, вследствие чего усиливается стабильность фермента.

5.3. Исследование кинетических параметров глюкоамилазы, иммобилизованной на углеводных полимерных носителях

Исследования кинетических аспектов реакции расщепления гомополисахаридов позволяет определить оптимальные условия функционирования ферментов при производстве различных ферментных препаратов и изучить механизмы регуляции биохимических превращений в клетке. В ряде работ показано, что выбор носителя может оказывать решающее влияние на кинетические характеристики ферментативных реакций, осуществляемых иммобилизованными биокатализаторами.

Мы изучали зависимость каталитической активности глюкоамилазы от концентрации субстрата (рис. 13).

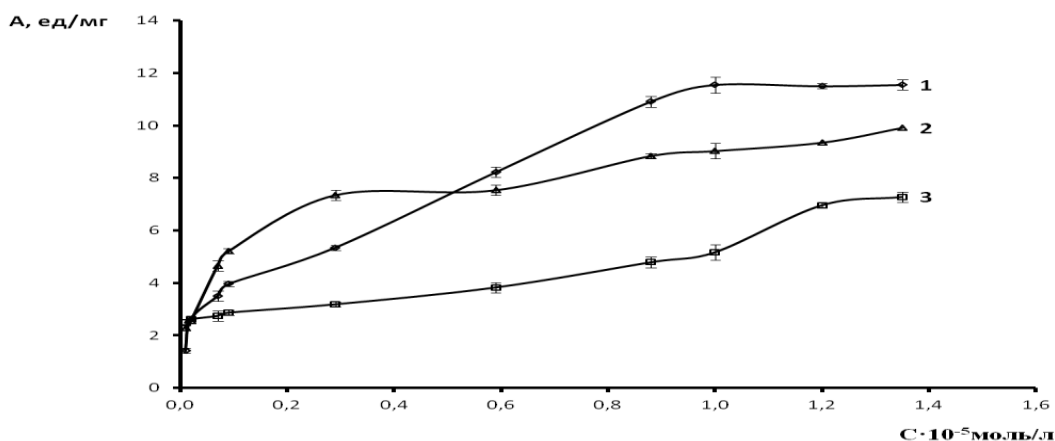


Рис. 13. Зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной глюкоамилазы от концентрации субстрата: 1 - свободная глюкоамилаза; 2 - иммобилизованная на пищевых волокнах; 3 - иммобилизованная на альгинате натрия

При иммобилизации на пищевых волокнах имеет место типичная двухфазная зависимость, характерная для двухсубъединичных ферментов, обусловленная наличием конформационного перехода при взаимодействии субъединиц в процессе катализа. Свободный фермент отличается тем, что между двумя стационарными режимами протекающей реакции продолжительность промежуточной фазы резко возрастает (по экспоненте), по-видимому, за счет увеличения времени, необходимого для образования димера, когда молекула фермента не связана с носителем. Этим фактом можно объяснить более значительное сохранение каталитической активности глюкоамилазы при иммобилизации на пищевых волокнах.

Во многих случаях кинетика олигомерных ферментов определяется медленными модификациями четвертичной структуры. Фермент, включающий n субъединиц — протомеров, может находиться в двух различных конформационных положениях R и T, в которых энзим проявляет

разное химическое сродство к лиганду. В одной конформации фермент эффективнее связывает субстрат, а в другой - высвобождает продукт, после этого исходное конформационное состояние возобновляется. При связывании молекул фермента с альгинатом натрия происходит значительное удлинение продолжительности пика R , что и может способствовать уменьшению активности гетерогенного ферментного препарата (63 %) [95, 16, 23, 34].

Сходная картина наблюдалась и при иммобилизации на коллагене, зависимость скорости гидролиза крахмала от концентрации субстрата для свободного и иммобилизованного энзима обладает двумя устойчивыми режимами. Показано, что модификация коллагеном хотя и несколько снижает удельную активность глюкоамилазы, но влияния на четвертичную структуру фермента не оказывает, о чем свидетельствует сохранение формы кривой.

Уравнение Михаэлиса-Ментен отображает практически все ферментативные реакции, а наблюдаемые нами отклонения, связаны с усложнением простейшей схемы, участием в механизме адсорбции субъединиц глюкоамилазы. Модификация кинетики может быть связана с конформационными перестройками белка, влияющими на сродство субъединиц энзима.

На основании графического анализа в координатах Иди-Хофсти были рассчитаны кинетические характеристики расщепления полисахаридов (табл. 6).

Глюкоамилаза, иммобилизованная на носителях углеводного и белкового происхождения, характеризуется более высоким значением K_m , чем нативный фермент, а максимальная скорость гидролиза крахмала иммобилизованными ферментами уменьшается, что, по-видимому, связано с внутридиффузионными ограничениями в катализе иммобилизованными энзимами. Для того чтобы могла произойти реакция с помощью иммобилизованного фермента, молекула субстрата, во-первых,

должна из раствора перейти к поверхности носителя, и далее продиффундировать внутрь. Далее молекула субстрата подвергается преобразованиям под влиянием активных центров фермента, и образовавшийся продукт транспортируется к поверхности носителя и в объем раствора. Общая скорость модификации субстрата состоит из всех локальных скоростей и зависит как от скорости доставки соответствующих молекул, так и от собственной скорости каталитической реакции. Эти процессы взаимосвязаны и определяют катализируемые иммобилизованными ферментами реакции.

Таблица 6

Значения K_m (K_m') и V_{max} (V_{max}') для реакции гидролиза крахмала свободной и иммобилизованной глюкоамилазой на альгинате натрия и пищевых волокнах

Фермент	K_m (K_m'), моль/л	V_{max} (V_{max}'), мкмоль·мг/мин
Свободная глюкоамилаза	$0,24 \cdot 10^{-5}$	11,55
Глюкоамилаза, иммобилизованная на альгинате натрия	$0,4 \cdot 10^{-5}$	7,28
Глюкоамилаза, иммобилизованная на пищевых волокнах	$0,47 \cdot 10^{-5}$	9,91
Глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене	$0,45 \cdot 10^{-5}$	8,1

Скорость реакции зависит от пространственного расположения белка, локализации активного центра энзима и степени открытости для субстрата. Даже незначительные перестройки в белках приводят к изменению активности.

5.4. Термостабильность свободной и иммобилизованной глюкоамилазы на альгинате натрия и пищевых волокнах

Для того, чтобы исследовать влияния некоторых температур на пространственное строение глюкоамилазы, были осуществлены эксперименты по исследованию термостабильности свободной и иммобилизованной глюкоамилазы при температурах 50 °С, 60 °С, 70 °С в течение 10-50 минут (рис. 14 (А), 14(В), 14 (С)). При 50 и 60 °С ход кинетических кривых для трех препаратов не имеет значительных отличий.

Показано, что остаточная активность свободного фермента после 50 минут воздействия температуры 50 °С составила около 84 %, при 60 °С - 79 %. После инкубации фермента при 70 °С в течение 50 минут каталитическая активность составила - 0,2 %. При 70 °С разрыв гидрофобных взаимодействий и водородных связей, играющих решающую роль в поддержании третичной структуры белков, является следствием избыточной тепловой энергии.

При иммобилизации энзима имеет место повышение процента сохранения активности - 73 %, 72 %, 21 % для альгината, 76 %, 63 %, 19 % соответственно для пищевых волокон, а для коллагена – 86 %, 84 %, 1,5 %. Для коллагена процент сохранения активности при 70 °С меньше, чем для углеводных носителей, так как коллаген, выступая в роли носителя, так же подвергается тепловой денатурации.

Выявлено, что глюкоамилаза, иммобилизованная на углеводных полисахаридах, является более термостабильным ферментом при высоких температурах по сравнению с глюкоамилазой, иммобилизованной на коллагене.

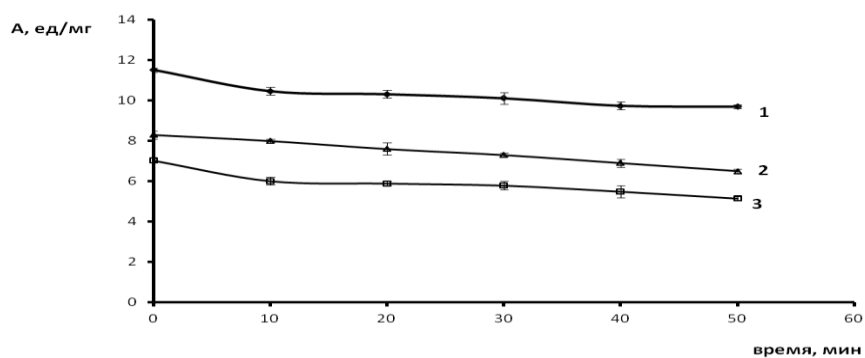


Рис. 14 (А)

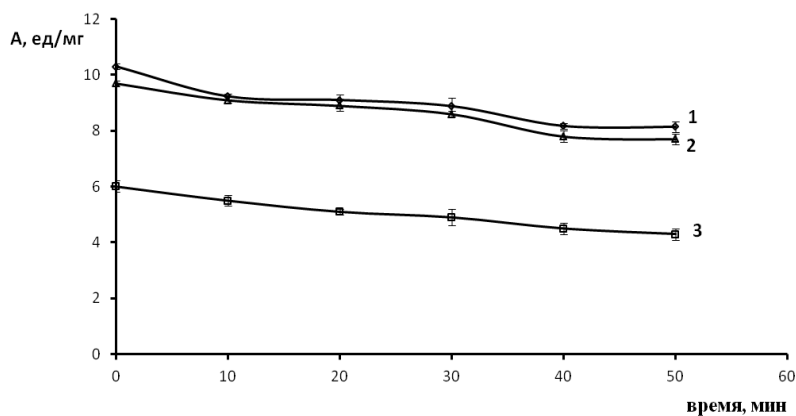


Рис. 14 (В)

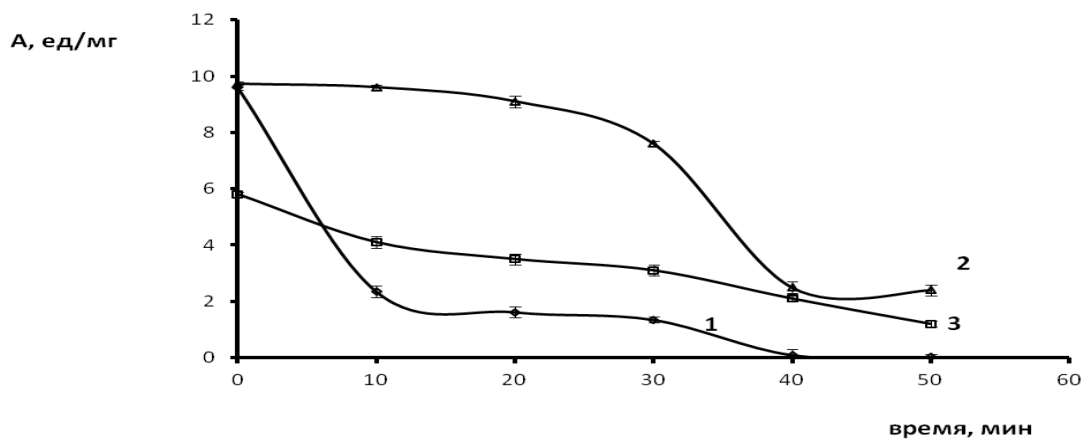


Рис. 14 (С)

Рис. 14. Зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной глюкоамилазы от времени термической инактивации при 50 °С (А), 60 °С (В), 70 °С (С): 1 - свободная глюкоамилаза; 2 - иммобилизованная на пищевых волокнах; 3 - иммобилизованная на альгинате натрия

На основании результатов экспериментов были рассчитаны скорости термоинактивации нативной и иммобилизованной глюкоамилазы. Константа скорости инактивации для иммобилизованного препарата глюкоамилазы при 70 °С достоверно снижается по сравнению со значением константы скорости инактивации свободного фермента. Глюкоамилаза, иммобилизованная на пищевых волокнах, является более устойчивой, чем препарат на основе альгината натрия и коллагена. Следует отметить, что константа скорости термоинактивации глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, при увеличении температуры значительно возрастает. Однако для глюкоамилазы, сорбционно связанной с углеводными носителями, на первых стадиях константа термоинактивации практически не отличается от свободного энзима, а при 70 °С происходит значительное уменьшение константы термоинактивации: для свободного энзима - 7,43; для глюкоамилазы, иммобилизованной на альгинате натрия - 2,9; для глюкоамилазы, иммобилизованной на пищевых волокнах - 2,03; на коллагене - 3,96 (табл. 7).

Таблица 7

Константы скорости термической инактивации глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, альгинате натрия, пищевых волокнах

Фермент	t, °С	K, ч ⁻¹
Свободная глюкоамилаза	50	0,21
	60	0,28
	70	7,43
Глюкоамилаза, иммобилизованная на альгинате натрия	50	0,20
	60	0,27
	70	2,9
Глюкоамилаза, иммобилизованная на пищевых волокнах	50	0,19
	60	0,26
	70	2,03
Глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене	50	0,18
	60	0,20
	70	3,96

Наименьшая константа скорости термоинактивации характерна для глюкоамилазы, иммобилизованной на пищевых волокнах ($K, \text{ч}^{-1} = 2,03$). Иммобилизация на пищевых волокнах приводит к меньшей потере активности, чем при сорбции на других носителях (14 %). Для утраты каталитической активности полученного ферментного препарата требуется значительно более высокая температура (температурный оптимум сдвигается на $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ по сравнению с нативным ферментом и составляет $70\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Получение иммобилизованных гетерогенных биокатализаторов, обладающих повышенной стабильностью, возможностью многократного применения и длительного сохранения каталитической активности, благоприятствует применению ферментов в перспективных областях науки и техники [26]. В этой связи было изучено воздействие условий хранения глюкоамилазы, иммобилизованной на альгинате натрия и пищевых волокнах в лабораторных условиях.

Активность энзима и количество белка в иммобилизованном на альгинате натрия и пищевых волокнах препарате не изменялись в течение 2 лет. Фермент за счет образования комплекса с матрицей носителя приобретает дополнительные связи, определяющие стабильность третичной структуры, существенно не изменяющие ее расположение в пространстве, в итоге предоставляется возможность применения альгината натрия и пищевых волокон в качестве носителей для иммобилизации гидролитических ферментов.

Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ С КОЛЛАГЕНОМ И УГЛЕВОДНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ

6.1. Исследование структуры глюкоамилазы при адсорбционной иммобилизации на коллагене

Для исследования особенностей строения белковых молекул и установления характера связи фермента с различными носителями в настоящее время с успехом используются биофизические подходы, включая метод инфракрасной спектроскопии. Поэтому мы исследовали комплекс фермент-носитель методом ИК-спектроскопии (рис. 15).

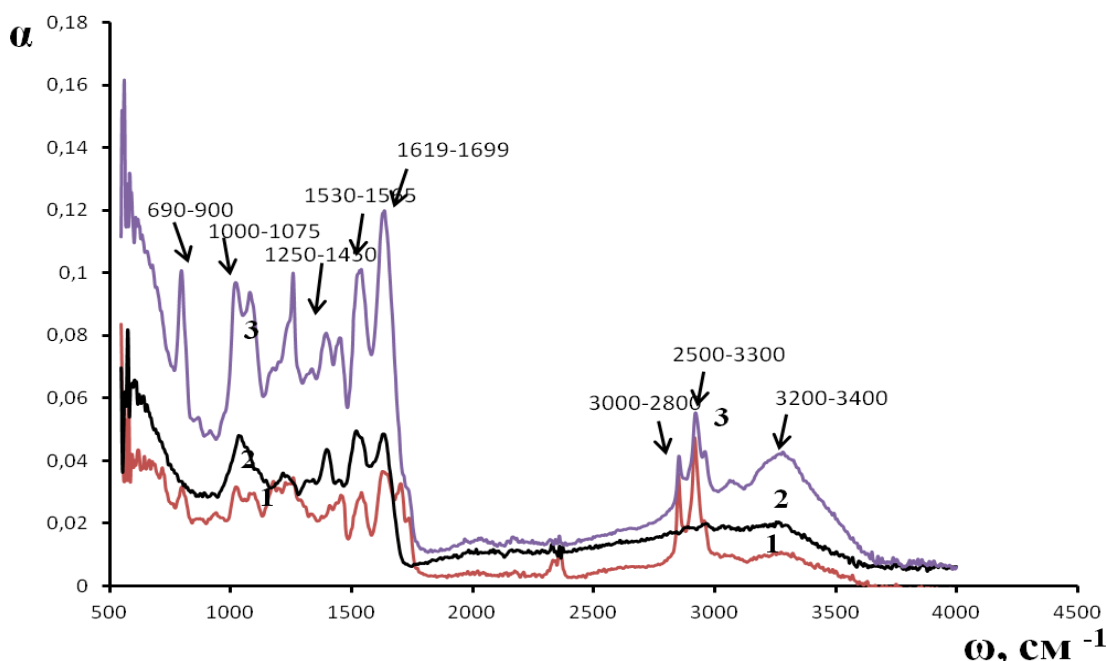


Рис. 15. ИК-спектры коллагена, свободной и иммобилизованной глюкоамилазы: 1 - коллаген; 2 - глюкоамилаза; 3 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене

Наличие в спектре глюкоамилазы полосы поглощения $3070\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$ вызвано валентными колебаниями NH-групп белка. Сорбционная иммобилизация глюкоамилазы приводит к появлению в ИК-спектре

изменений в области 3423 см^{-1} , свидетельствующих о валентных колебаниях аминогрупп.

Интенсивный пик $3400\text{-}3200\text{ см}^{-1}$ возникает при появлении водородных связей. Наблюдается и более интенсивная полоса поглощения $3200\text{-}2500\text{ см}^{-1}$ для иммобилизованной глюкоамилазы, что указывает на образование внутри молекулы комплексных соединений за счет водородных связей.

Нами установлено, что при иммобилизации на коллагене происходит расширение и смещение пика в область более высоких энергетических уровней и увеличение интенсивности полос амид I ($1565\text{-}1530\text{ см}^{-1}$) и амид II ($1699\text{-}1619\text{ см}^{-1}$), что, возможно, вызвано увеличением числа водородных связей, вносящих вклад в стабилизацию вторичной структуры глюкоамилазы при иммобилизации на коллагене, и свидетельствует о перераспределении α -спиральных участков, β -слоев и нерегулярных структур. Благодаря полученным результатам можно предположить, что связывание белковой глобулы с матрицей носителя происходит в результате возникновения водородных связей.

При иммобилизации глюкоамилазы имеет место изменение формы и интенсивности пиков в области $3300\text{-}2500\text{ см}^{-1}$ (2856 см^{-1} , 2918 см^{-1} , 2954 см^{-1}), обусловленных колебанием связанных групп-ОН, принимающих участие в возникновении водородных связей.

Наблюдается изменение интенсивности поглощения в области $900\text{-}690\text{ см}^{-1}$ для иммобилизованного фермента. Данные колебательные частоты могут свидетельствовать об участии ароматических аминокислотных остатков (Phe, Trp) в образовании гидрофобного взаимодействия между функциональными группами гидрофобных аминокислот коллагена или водородной связи между остатками тирозина.

В ИК-спектрах рассматриваемых нами образцов присутствуют полосы поглощения, обусловленные колебанием групп -COOH , -CO- в области $1000\text{-}1075\text{ см}^{-1}$, причем в ИК-спектре иммобилизованного фермента мы наблюдаем явное усиление интенсивности поглощения в этой области.

Сорбция глюкоамилазы на коллагене сопровождается изменением формы, интенсивности пиков в областях $3000\text{-}2800\text{ см}^{-1}$, 1049 см^{-1} – совпадающих с областью поглощения остатков неполярных аминокислот, что может указывать на формирование более плотного гидрофобного ядра при сопоставлении с нативной формой энзима, приводящее к уменьшению активности препарата после иммобилизации.

Актуальные в настоящее время физико-химические методы исследования энзимов (рентгеноструктурный анализ, ЯМР-анализ, генно-инженерные подходы к изучению структуры) невозможно применять без компьютерного моделирования, которое позволяет визуализировать пространственную структуру, показывает количественное соотношение α -спиралей, β -слоев во вторичной структуре и неупорядоченных участков энзимов, а также способ укладки глобулы.

Данные, полученные с помощью ИК-спектроскопии, согласуются с результатами компьютерного моделирования. Нами была построена компьютерная трехмерная модель коллагена на основе данных рентгеноструктурного анализа с помощью программного пакета Maestro 9.6. Использование объемного образца с возможностью вращения, масштабирования и изменения ракурса изображения позволяет проводить анализ топологии белка. В результате рассмотрения модельной структуры коллагена можно обнаружить на поверхности белка остатки пролина, аланина, лейцина, изолейцина, треонина, которые и участвуют в появлении гидрофобных взаимодействий и водородных связей.

C. Gullekson, L. Lucas, K. Hewitt, L. Kreplak в своих работах с помощью рамановской спектроскопии показали, что при взаимодействии коллагена с пластинами, покрытыми слоем Ag и Au, в образовании связей принимают участие остатки ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина [221, 144].

Для визуализации пространственной структуры молекулы глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*, имеющей 471 аминокислотный

остаток, рядом авторов были использованы программы MolScript разных версий, однако они не позволяют визуализировать взаимодействия молекулы фермента с различными лигандами (ингибиторами, активаторами, регуляторами каталитической активности). Поэтому нами была использована программа Maestro 9.6, которая открывает более широкие возможности для изучения пространственной организации белков на основе данных рентгеноструктурного анализа.

Загрузив из международной базы данных ([www. PDB](http://www.PDB)) результаты рентгеноструктурного анализа глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*, программа Maestro 9.6 создает трехмерную модель, на которой видно положение аминокислотных остатков на поверхности фермента (рис. 16).

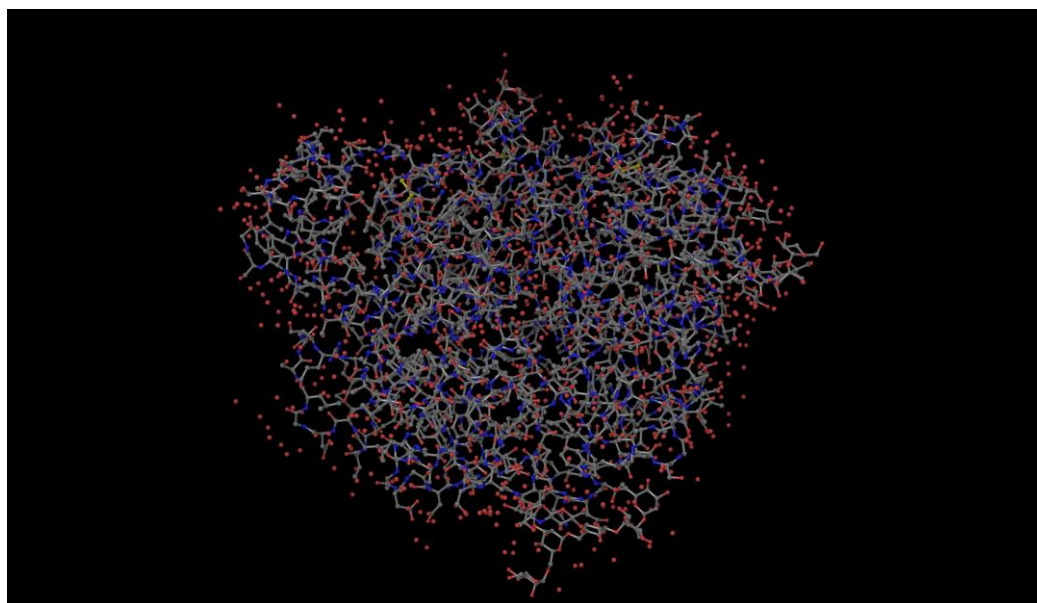


Рис. 16. Пространственная структура глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*

На рис. 16 видно, что глюкоамилаза окружена молекулами воды (обозначены красным цветом). Вся структура содержит 471 аминокислотный остаток и 4500 атомов.

Шкутиной И.В. было обнаружено, что адсорбция фермента сопровождается изменением состояния гидратной оболочки носителя. Изучение состояния воды представляет интерес, так как адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы протекает в водных растворах. Поэтому мы получили распределение молекул воды по поверхности фермента (рис. 17). Программа Maestro 9.6 обладает функцией выделения в структуре ферментов атомов любого заданного типа. Нами установлено, что 224 молекулы воды находятся на поверхности глюкоамилазы.

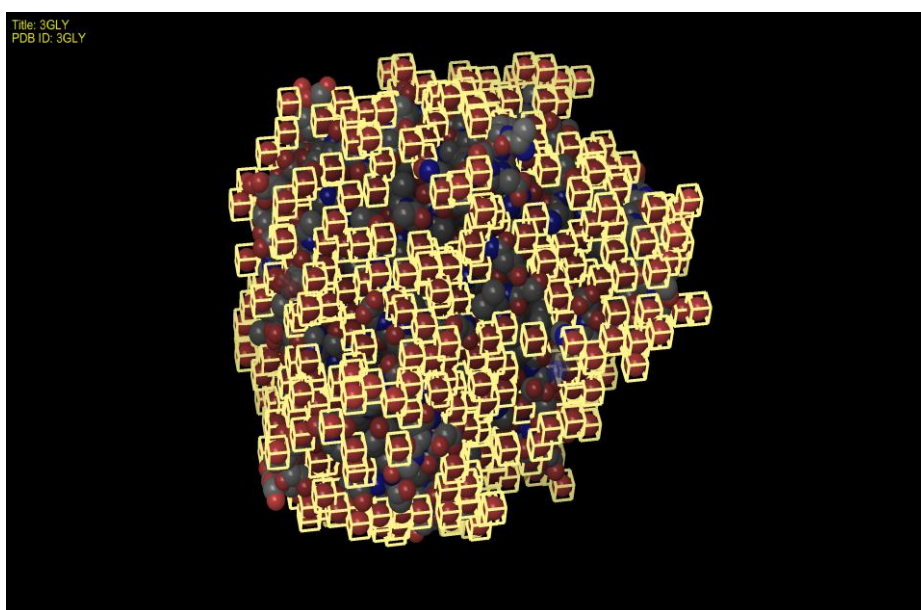


Рис. 17. Выделение молекул воды на поверхности глюкоамилазы

На рис. 17 выделены молекулы воды, окружающие фермент. Показано, что молекулы воды располагаются на поверхности глюкоамилазы неравномерно, образуя диффузную структуру (в виде “кружевной” оболочки). Это может быть обусловлено различной структурой R-радикалов аминокислот, составляющих молекулу глюкоамилазы и наличием разноименных зарядов.

Установлено, что непосредственному взаимодействию белка с носителем предшествует вытеснение воды из фазы матрицы. Исключение

растворителя из области связывания фермент-носитель приводит к увеличению числа центров сорбции [2, 128].

Очень важную информацию для понимания механизма ускорения химических реакций под влиянием свободных и иммобилизованных энзимов позволяет получить визуализация распределения заряженных участков на поверхности молекулы. Анализируя данные табл. 8 и рис. 18, показывающего распределение различных типов аминокислот на поверхности исследуемого фермента, можно отметить, что количество отрицательных аминокислотных остатков, локализованных на поверхности глюкоамилазы, в 2 раза превышает положительно заряженные области. По данным компьютерного моделирования на поверхности молекулы располагаются и радикалы гидрофобных аминокислотных остатков в виде «пятен». Гидрофобные участки могут возникать за счет α -спиралей, которые преобладают во вторичной структуре, и они могут быть выдвинуты на периферию молекулы глюкоамилазы.

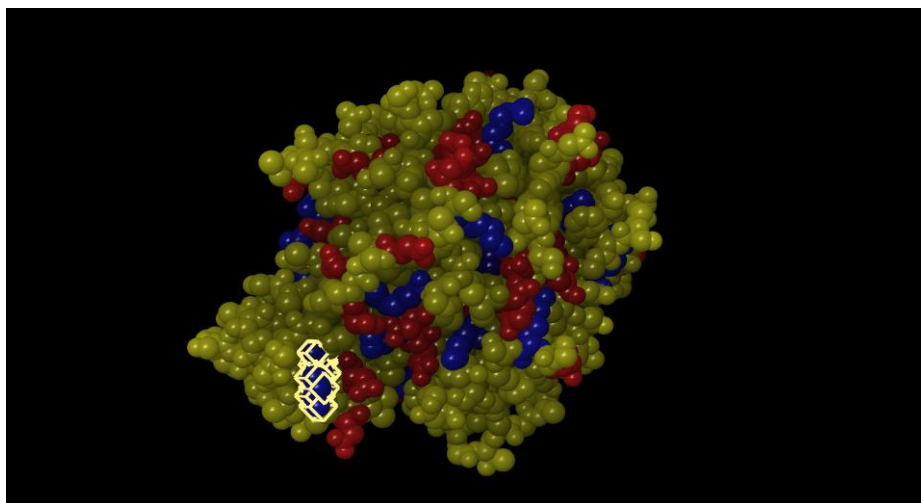


Рис. 18. Расположение аминокислот на поверхности глюкоамилазы

Таблица 8

Аминокислотные остатки на поверхности глюкоамилазы

Положительно заряженные аминокислоты	Arg 15, Lys 378, Arg 429, Lys 337, Arg 68, Lys 404, Lys 108, Arg 286, Lys 52, Arg 241, Arg 122, Arg 125, Arg 160, Arg 428, Arg 273, Lys 279, Lys 244, Arg305, Arg 413, Lys 61, Arg 194, Arg 54.
Отрицательно заряженные аминокислоты	Glu 153, Asp 144, Asp 65, Glu 259, Asp 214, Asp 336, Asp 264, Asp 263, Asp 345, Glu 342, Asp 4, Asp 382, Glu 299, Asp 293, Asp 283, Asp 297, Glu 280, Asp 349, Glu 308, Asp 309, Asp 245, Asp 238, Glu 180, Asp 403, Asp 406, Asp 408, Glu 409, Glu 389, Asp 44, Asp 47, Asp 112, Asp 33, Glu 113, Asp 97, Asp 25, Glu 79, Asp 73, Asp 71, Glu 179, Asp 176, Glu 198, Glu 439, Asp 257, Glu 10, Asp 55, Asp 126.
Гидрофобные аминокислоты	Val 432, Leu 143, Val 470, Ile 469, Val 206, Val 13, Ile 87, Ile 154, Leu 295, Leu 3, Leu 332, Val 374, Val 181, Ile 88, Val 463, Val 91, Leu 75, Leu 19, Ile 288, Phe 237, Ile 78.
Полярные незаряженные аминокислоты	Ser 456, Ser 468, Ser 149, Ser 34, Ser 30, Ser 436, Ser 368, Ser 431, Ser 76, Ser 209, Ser 365, Ser 394, Ser 92, Ser 455, Ser 8, Ser 366, Ser 356, Ser 298, Ser 231, Ser 310, Ser 287, Ser 240, Ser 242, Ser 119, Ser 296, Ser 460, Ser 100, Thr148, Thr 114, Thr 464, Thr 440, Thr 12, Thr 204, Thr 362, Thr 448, Thr 16, Thr 360, Thr 290, Thr 117, Thr 457, Gln 338, Gln 334, Gln 140, Gln 219, Gln 172, Gln 168, Gln 216, Gln 225, Asn 171, Asn 182, Asn 313, Asn 45, Asn 93, Asn 110, Asn 236, Asn 315, Asn 9, Asn 395, Asn 20, Asn 69. Asn 145, Asn 430, Asn 427, Asn 426.

Программа Maestro 9.6 позволяет определить суммарный заряд молекулы. Выявлено, что молекула обладает отрицательным зарядом (-29 элементарных единиц заряда).

Анализ результатов, полученных методами компьютерного моделирования, ИК-спектрофотометрии, а также данных литературы, предоставляют возможность сделать вывод об упорядоченности глобулы глюкоамилазы и отнести ее к глобулярным белкам.

Около 60 % радикалов аминокислот полипептидных цепей глюкоамилазы задействованы в организации составляющих вторичной структуры. Первичная структура глюкоамилазы включает около 40 % гидрофобных аминокислот, которые принимают участие в формировании гидрофобного ядра. Исходя из полученных данных, видно, что молекула глюкоамилазы обладает кластерами положительных и отрицательных зарядов, гидрофобных площадок на поверхности.

Программа Maestro 9.6 позволяет получить информацию о локализации гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности фермента с помощью ручного манипулирования (рис. 19).

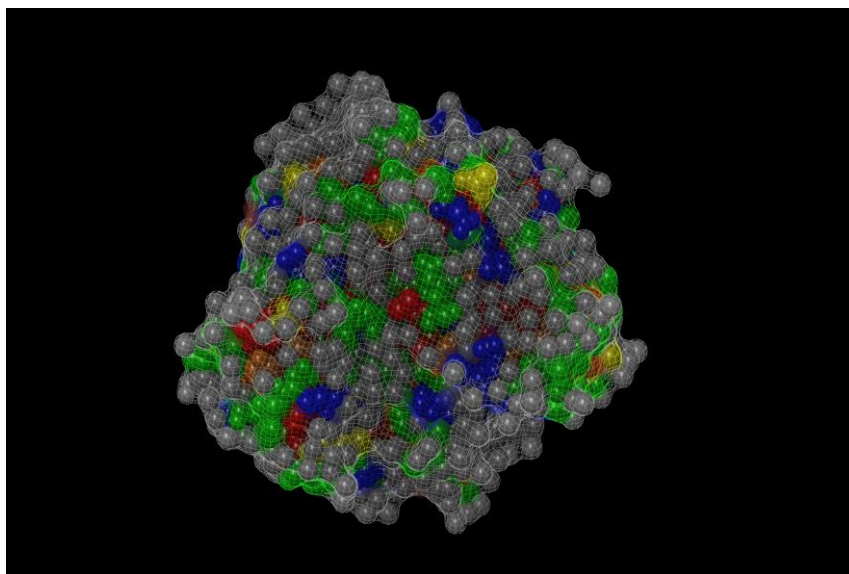


Рис. 19. Распределение гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*

На рисунке красным цветом обозначены гидрофобные аминокислоты, сеткой - поверхность молекулы.

Показано, что на поверхности располагаются следующие

аминокислотные остатки: val 432, leu143, val 470, ile 469, val 206, val 13, ile 87, ile154, leu 295, leu 3, leu 332, val 374, val 181, ile 88, val 463, val 91, leu 75, leu 19, ile 288, phe 237, ile 78.

Проведенный подробный анализ трехмерной модели глюкоамилазы, осуществленный за счет возможности вращения, масштабирования, изменения ракурса молекулы, а также результаты наших исследований по ИК-спектрофотометрии свободной и иммобилизованной на коллагене глюкоамилазы позволяют предположить механизм взаимодействия между энзимом и поверхностными группами носителя. Важную роль при адсорбционной иммобилизации фермента с носителем играют поверхностные аминокислотные остатки (положительно заряженные, отрицательно заряженные, гидрофобные и полярные), при этом вероятно образование водородных связей, гидрофобных взаимодействий и ионных связей.

6.2. Исследование структуры глюкоамилазы при адсорбционной иммобилизации на углеводных полимерах

Пищевые волокна обладают волокнистой структурой и большой пористостью, представляют собой лигнин (4-5 %), пектин (23-27 %), целлюлозу (22-26 %), гемицеллюлозу (31-33 %) [296]. Сорбционная емкость волокон обусловлена наличием значительного количества гидроксильных, карбонильных и карбоксильных группировок [79, 213].

При анализе ИК-спектров веществ, содержащих ОН-группы, выявлено, что валентное колебание гидроксильной группы проявляется как широкая полоса переменной валентности при более низких частотах, чем в свободном виде ($3650-3580 \text{ см}^{-1}$) [41]. Это обусловлено образованием межмолекулярных водородных связей между ОН-группами, что мы и наблюдаем при иммобилизации глюкоамилазы на пищевых волокнах (рис. 20).

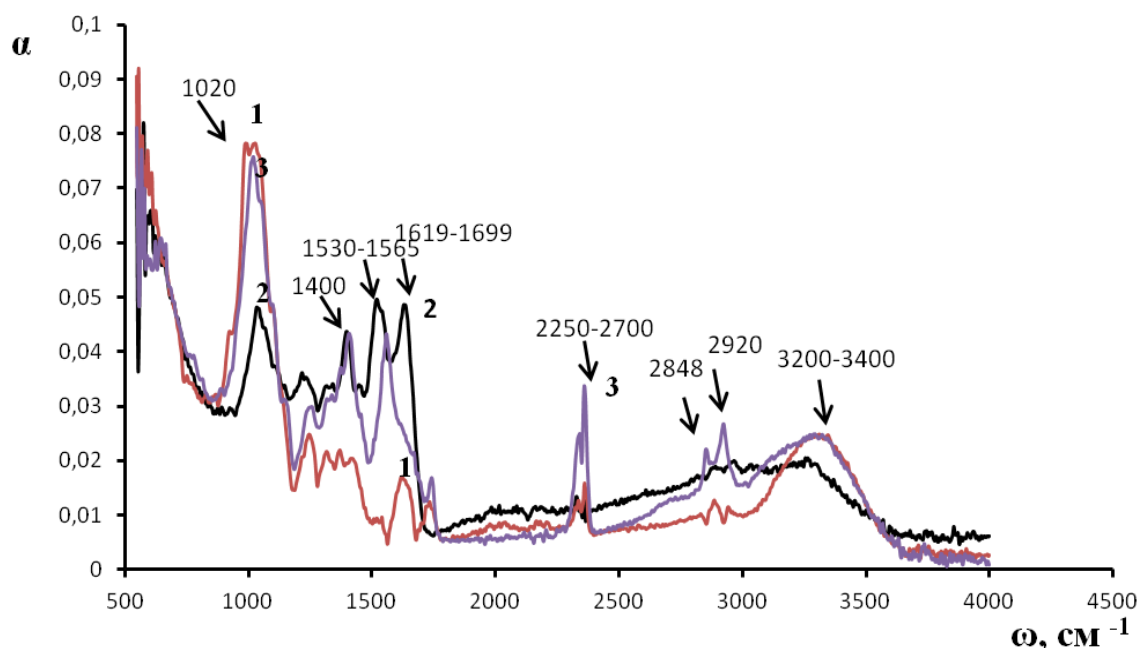


Рис. 20. ИК-спектры глюкоамилазы, иммобилизованной на пищевых волокнах адсорбционным методом: 1 - пищевые волокна; 2 - глюкоамилаза; 3 - глюкоамилаза, иммобилизованная на пищевых волокнах

Установлено, что в препарате, полученном при иммобилизации на пищевых волокнах, выделенных из сахарной свеклы, появилась интенсивная полоса поглощения $\nu=1700 \text{ см}^{-1}$ (ответственная за колебания карбонильных групп), которая смещается в область 1741 см^{-1} и увеличивается ее интенсивность. Смещение пика поглощения из области 1725 см^{-1} в область 1741 см^{-1} указывает на связывание группы-СО и вероятность образования водородных связей между поверхностными группами молекулы глюкоамилазы и носителем.

Полоса в области 1000 см^{-1} характеризует монозамещенное ароматическое кольцо, входящее в состав фенилаланина, триптофана и гистидина [112, 130]. Однако при иммобилизации интенсивность этого пика резко возрастает, что может объясняться участием фенилпропановых звеньев лигнина, входящего в состав пищевых волокон, в образовании комплекса фермент-носитель.

Сдвиг и увеличение интенсивности полос поглощения 3249-3325 см^{-1} указывает на изменение характера взаимодействия между субъединицами при иммобилизации на пищевых волокнах.

Изменения характерны и для полос амид I (1619-1699 см^{-1}) и амид II (1530-1565 см^{-1}), характеризующие колебания пептидных групп в α -спирали.

Процесс сорбции глюкоамилазы на пищевых волокнах сопровождается также появлением деформационных колебаний СО-группы (появление полосы поглощения $\nu=1409 \text{ см}^{-1}$).

Увеличение и расширение полосы в области 3400-3200 см^{-1} также свидетельствует о появлении внутри и межмолекулярных водородных связей, а в области 3300-2500 см^{-1} - о связывании группы ОН [117, 102].

Анализ результатов наших исследований по ИК-спектроскопии и компьютерному моделированию дает возможность сделать вывод о том, что при адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на пищевых волокнах между COO^- -группами лигнина, целлюлозы и пектина и поверхностными группами фермента, имеющими положительный заряд (табл. 8), появляются ионные связи, а многочисленные ОН-группы пищевых волокон и ОН-радикалов серина и треонина глюкоамилазы (табл. 8), могут способствовать вероятно, образованию дополнительных водородных связей. Наличие на поверхности фермента отрицательно заряженных аминокислот глутаминовой и аспарагиновой (табл. 8) позволяет предположить об участии группы- COO^- в образовании водородных связей с группами-ОН биополимера.

Ряд авторов, применяя классические биохимические методы анализа белков, обнаружили наличие неполярных аминокислот на поверхности молекулы глюкоамилазы, играющих важную роль в стабилизации четвертичной структуры. Так, Т.А. Ковалева и соавторы при изучении четвертичной структуры глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* установили, что димеризация молекулы фермента обусловлена наличием гидрофобных пятен на поверхности белка.

Присутствие в ИК-спектре полосы поглощения 1400 см^{-1} вызвано –C-CH₃- и –C-(CH₃)₂ группировками. При иммобилизации полоса смещается в область меньших длин волн (1405 см^{-1}) и к тому же появляются два новых пика поглощения 2848 и 2920 см^{-1} , свидетельствующие о появлении гидрофобных взаимодействий между молекулой глюкоамилазы и носителем [124, 62]. Результаты компьютерного моделирования и ИК-спектрофотометрии предоставляют возможность сделать заключение о том, что между гидрофобными остатками аминокислот фермента (табл. 8) и CH₃-группами лигнина пищевых волокон могут образовываться гидрофобные взаимодействия, приводящие к изменению конформации белка, чем может быть обусловлено некоторое уменьшение каталитической активности иммобилизованного энзима в сравнении с нативным.

Анализ ИК-спектров свободной и иммобилизованной на альгинате натрия глюкоамилазы показывает, что в области $3200\text{-}3400\text{ см}^{-1}$ происходит не только сдвиг и расширение полосы поглощения, но и усиление интенсивности пиков поглощения (рис. 21). После иммобилизации глюкоамилазы на альгинате натрия произошли изменения в области поглощения CH₃- групп ($2900\text{-}2920\text{ см}^{-1}$) [104, 87, 52]. Появляются два ярко выраженных пика 2850 и 2920 см^{-1} , что подтверждает возникновение гидрофобных групп на поверхности молекулы в результате изменения пространственного строения глюкоамилазы в процессе иммобилизации.

Смещение полос амид I и амид II на ИК-спектре может быть обусловлено появлением водородных связей, принимающих участие в стабилизации вторичной структуры.

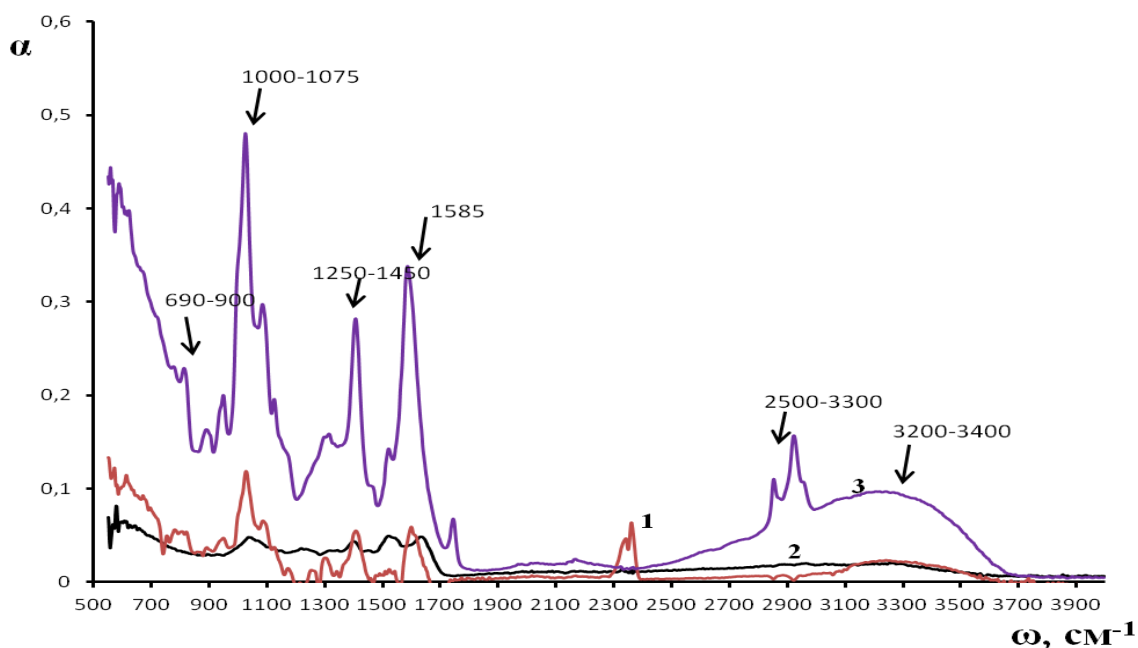


Рис. 21. ИК-спектры глюкоамилазы, иммобилизованной на альгинате натрия адсорбционным способом: 1 - альгинат натрия; 2 - глюкоамилаза; 3 - глюкоамилаза, иммобилизованная на альгинате натрия

Данные изменения могут свидетельствовать о возникновении водородных связей между COO^- и OH -группами альгината натрия и аминокислотными остатками серина, треонина, карбонильными группами аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также NH_2 группами лизина и аргинина, аспарагина и глутамина (полоса $3070\text{-}3300\text{ см}^{-1}$ свидетельствует о появлении ассоциированной аминогруппы). Результаты компьютерного моделирования позволяют определить локализацию остатков аминокислот, находящихся на поверхности глюкоамилазы (табл. 8).

Обнаружено, что на поверхности преобладают аминокислотные остатки серина, треонина, существенная роль в образовании водородных связей среди поверхностных аминокислотных остатков принадлежит аспарагину и глутамину. Кроме того возможно образование ионных связей между радикалами лизина, аргинина и COO^- группами альгината натрия.

Данные исследований по ИК-спектроскопии и компьютерному моделированию могут свидетельствовать о сложном механизме

адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене и углеводных биополимерах. Иммобилизация сопровождается образованием новых связей, вызывающих конформационные перестройки в молекуле белка, которые приводят к повышению устойчивости энзима и снижению каталитической активности.

Эти изменения, вероятно, указывают на изменения вторичной структуры глюкоамилазы, связанной с перераспределением α -спиральных участков, β -слоев и нерегулярных структур. Информацию о соотношении типов вторичной структуры глюкоамилазы мы получили из данных рентгеноструктурного анализа, преобразованных в компьютерные модели глюкоамилазы и количественного анализа, используемого в ИК-спектрофотометрии.

С помощью программы Maestro 9.6, позволяющей визуализировать вторичную структуру белков, показано, что данная молекула содержит 14 спиралей (35%), 7 β -тяжей (17,5%) и 19 (47,5%) неупорядоченных участков (рис. 22, 23) [93, 71].

Данные по вторичной структуре глюкоамилазы, полученные с помощью программы Maestro 9.6, соответствуют результатам экспериментальных исследований и компьютерного моделирования других авторов [93, 71] и согласуются с результатами наших опытов (табл. 9).

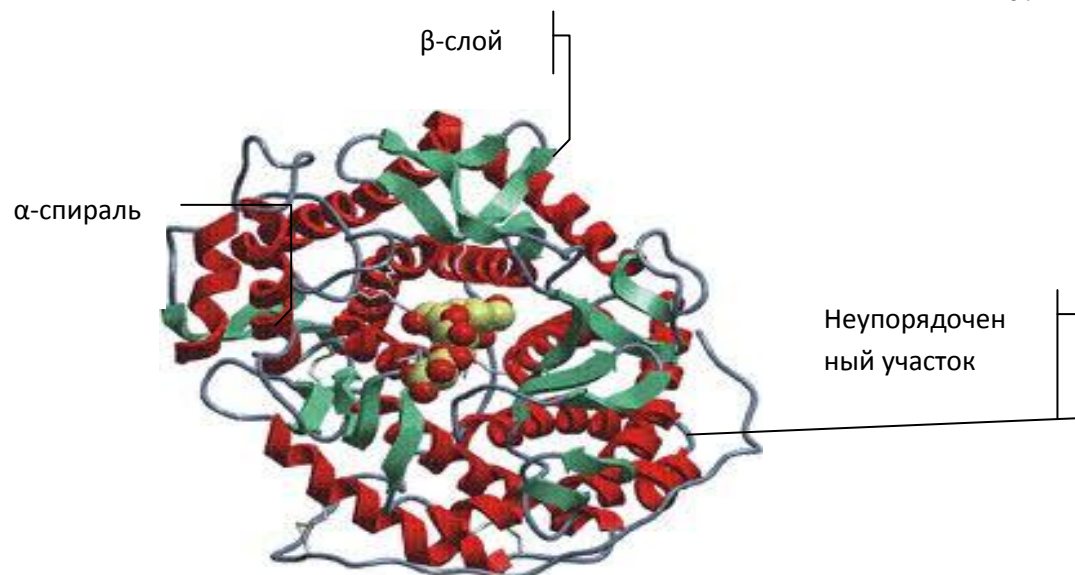


Рис. 22. Схематическое изображение укладки полипептидной цепи
глюкоамилазы

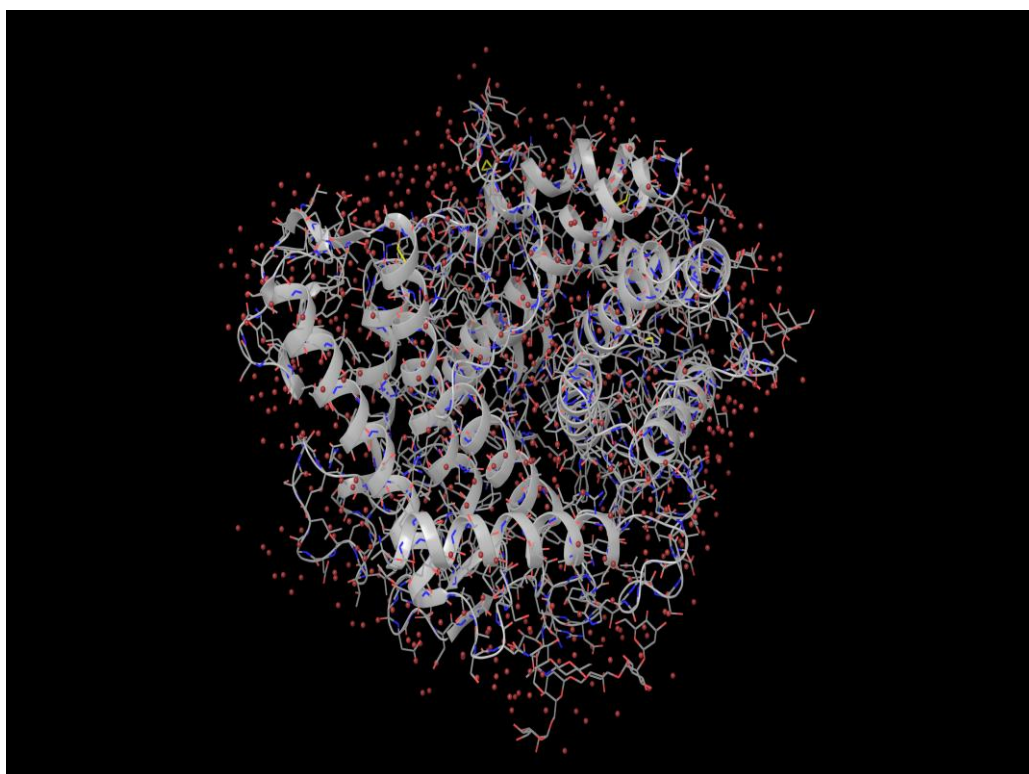


Рис. 23. Пространственная структура глюकोамилазы

С помощью метода количественного анализа, используемого в ИК-спектрофотометрии, основанном на определении интенсивности поглощения, связанной с концентрацией вещества по закону Бугера-Ламберта-Бера, мы анализировали характер изменения вторичной структуры для глюкоамилазы при иммобилизации на коллагене, пищевых волокнах, альгинате натрия [125]. В таблице 9 представлены результаты расчета α -спиралей, β -слоев и нерегулярных участков. В глобулярных белках, согласно различным источникам, примерно 60 % остатков аминокислот участвуют в формировании вторичной структуры глобулярных белков [56, 101, 116, 127].

Установлено, что при иммобилизации глюкоамилазы уменьшается количество неупорядоченных структур и увеличивается количество β -слоев, что указывает на компактизацию глобулы, формирование более плотного гидрофобного ядра и подтверждает повышение термостабильности полученного препарата (табл. 9).

Таблица 9

Содержание типов вторичной структуры глюкоамилазы, иммобилизованной на альгинате натрия, пищевых волокнах, коллагене

	ν , см ⁻¹	Свободная глюкоамилаза		Иммобилизованная глюкоамилаза на альгинате натрия		Иммобилизованная глюкоамилаза на пищевых волокнах		Иммобилизованная глюкоамилаза на коллагене	
		T, %	%	T, %	%	T, %	%	T, %	%
Неупорядоченная структура	1654	4,4	46	3,1	23,7	5,31	29,98	28	20
β -слои	1699	10,88	12	26	58	10,13	57,1	9	71
α -спирали	1644	1,78	42	30	18,3	2,27	12,8	31	9

Содержание типов вторичной структуры, полученных нами с помощью ИК-спектроскопии, согласуется с данными компьютерного

моделирования и позволяет использовать эту модель для дальнейшего изучения.

Наибольшей устойчивостью обладает α -спираль, преобладающая в белках. Диполи ее водородных связей обладают линейным расположением и минимальной энергией. Между аминокислотными остатками, находящимися по разные стороны от остава спирали, наблюдается оптимальное дисперсионное притяжение [127, 129].

Результаты компьютерного моделирования показывают, что молекула глюкоамилазы имеет жесткое ядро, образующее полость активного центра фермента. За счет значительного количества гидрофобных аминокислотных остатков, расположенных внутри молекулы, этот фермент обладает высокой термостабильностью и кислотоустойчивостью.

6.3. Исследование механизма взаимодействия глюкоамилазы с носителями с помощью компьютерных программ Maestro 9.6, Mole 2.0, GRAMM-X

Программа Mole 2.0 позволяет не только визуализировать пространственную структуру глюкоамилазы, но и уточнять детали внутренней структуры ядра молекулы (рис. 24).

Показано, что молекула энзима содержит ряд полостей, пор и туннелей, которые играют важную роль в процессе взаимодействия фермента с субстратами, ингибиторами и активаторами каталитической активности.

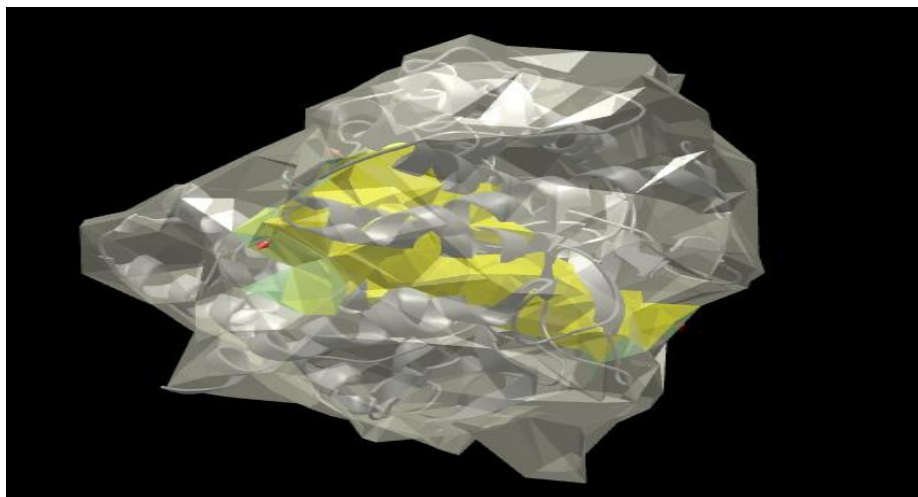


Рис. 24. Полость активного центра молекулы глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*

Программа Mole 2.0 дает подробную информацию о форме и расположении полости активного центра молекулы глюкоамилазы (рис. 24). Она расположена в центре молекулы и пронизывает её насквозь, имея два выхода с противоположных сторон. Объем этой полости составляет 2639 \AA^3 , что намного превышает объемы всех остальных полостей, взятых вместе. Полость активного центра окружена α -спиралями, которые обеспечивают её механическую жесткость. В периферийных областях молекулы содержится 8 более мелких полостей, выполняющих в молекуле разнообразные функции. Объемы всех полостей молекулы равны: $V_1=2639 \text{ \AA}^3$, $V_2=411 \text{ \AA}^3$, $V_3=275 \text{ \AA}^3$, $V_4=205 \text{ \AA}^3$, $V_5=191 \text{ \AA}^3$, $V_6=188 \text{ \AA}^3$, $V_7=177 \text{ \AA}^3$, $V_8=147 \text{ \AA}^3$, $V_9=131 \text{ \AA}^3$.

С помощью программы Mole 2.0 можно, имея результаты рентгеноструктурного анализа белка, определить расположение и конфигурацию различных туннелей, содержащихся в молекуле (рис. 25).

По различным туннелям осуществляется передача энергии и электронов из одной части молекулы в другую. Особенно много туннелей выходит из самой большой полости, в которой располагается активный центр молекулы фермента.

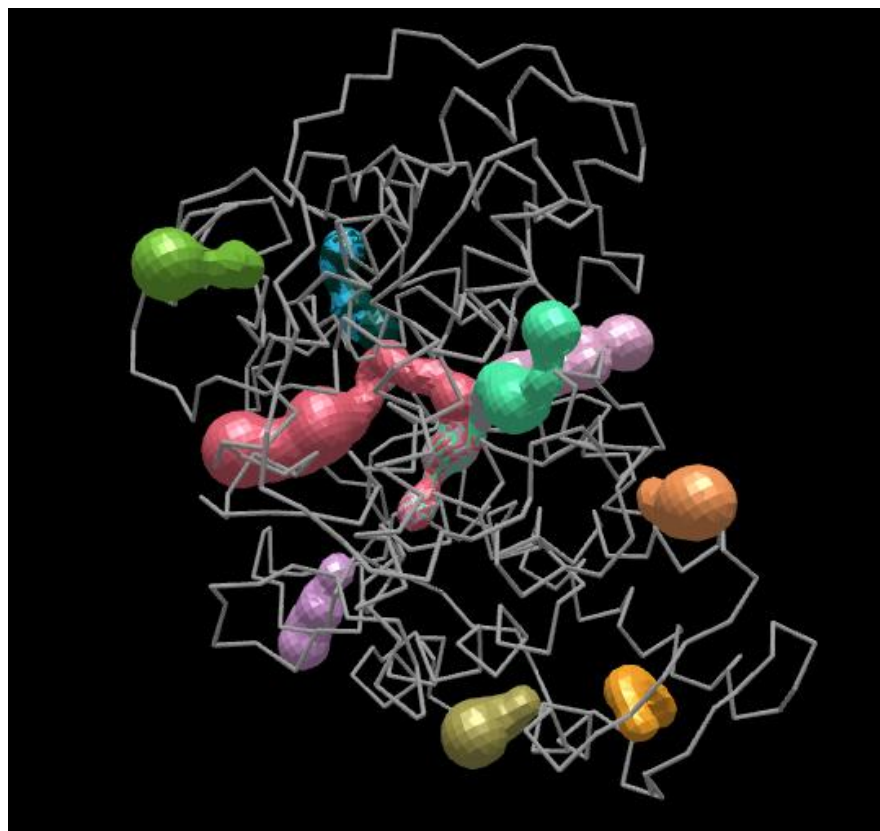


Рис. 25. Конфигурация туннелей в молекуле глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*

Как показано на рис. 25, вся молекула глюкоамилазы пронизана туннелями различной длины. Из 10 туннелей 3 самых длинных выходят из полости активного центра.

Кроме размеров туннелей программа позволяет оценить их геометрию (рис. 8 «Приложения»). Все туннели имеют переменный радиус (по длине туннеля). Кроме того обнаружено наличие изменения структуры туннеля на выходе в виде “бутылочного горлышка”. Известно, что наличие таких образований определяет размеры частиц, которые могут пройти через этот туннель. Результаты компьютерного моделирования показывают, что все туннели в молекуле глюкоамилазы увеличивают свой диаметр по мере углубления примерно в 1,5 раза.

Обнаружено, что молекула глюкоамилазы кроме полостей и туннелей имеет еще 5 пор сложной конфигурации (рис. 26).

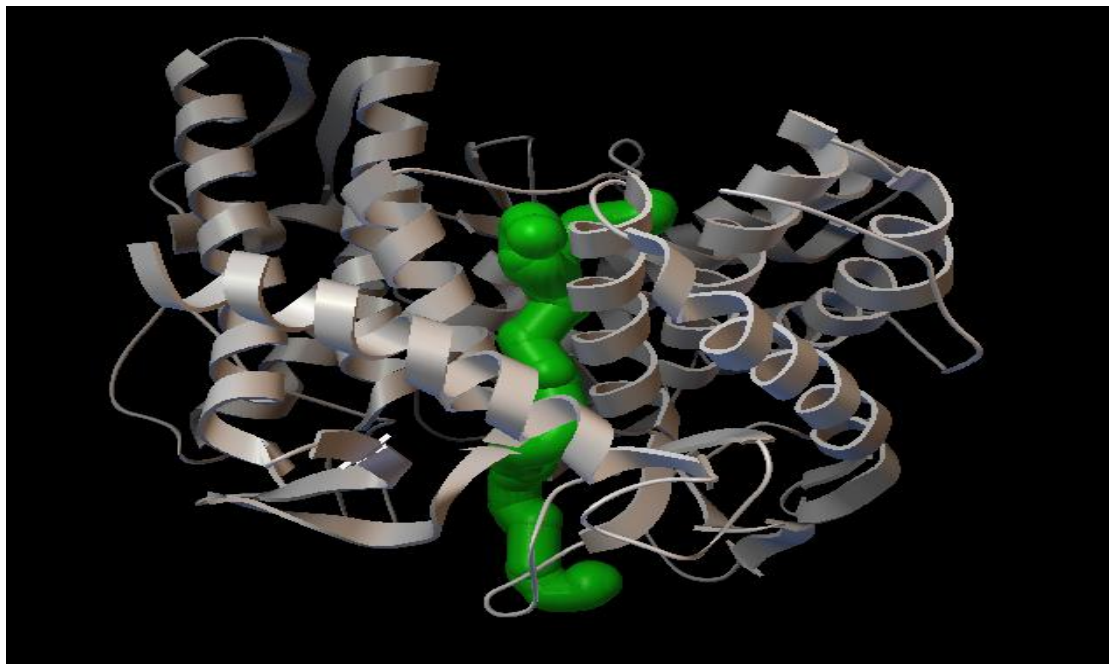


Рис. 26. Система пор внутри гидрофобного ядра молекулы глюкоамилазы

Поры (зеленый цвет) пронизывают молекулу глюкоамилазы насквозь по её центру. Результаты компьютерного моделирования позволяют оценить размеры и форму пор. Обнаружено, что молекула глюкоамилазы имеет 5 пор сложной конфигурации (рис. 9 «Приложения»). Причем длина пор значительно превышает длину туннелей. Поры имеют длину порядка 50-60 А, в то время как максимальная длина туннелей, по нашим данным, не превышает 9 А.

Сложная внутренняя структура гидрофобного ядра молекулы глюкоамилазы определяет взаимодействие фермента с субстратом. Так, полость активного центра фермента имеет наибольший объем, суммарный отрицательный заряд, жесткую структуру, причем вход в неё регулируется кластерами молекул воды. Взаимодействие молекулы крахмала со специальными связующими группами активного центра приводит к перемещению кластеров воды, препятствующих вхождению различных

лигандов внутрь активного центра и втягиванию молекулы субстрата вовнутрь. По-видимому, наличие туннелей и пор способствует перемещению протонов при гидролизе молекул крахмала до глюкозы [211].

При этом может изменяться напряженность электрического поля внутри активного центра и деформация расщепляемых ковалентных связей молекул субстрата, что приводит к уменьшению энергии активации ферментативного гидролиза полисахарида. Туннели и поры могут определять перемещение различных частиц по внутреннему объему глобулы, а также квазикристаллическое состояние молекулы белка, что может приводить к изменению соотношения упорядоченных и неупорядоченных участков третичной структуры. Эти процессы обуславливают мобильность третичной структуры фермента, ответственной за катализ, и участвуют в регуляции каталитической активности *in vivo*.

Далее мы применили программу Gram-X (Protein-Protein Docking Web Server v.1.2.0) для моделирования процесса взаимодействия глюкоамилазы с коллагеном. Для этого использовали 2 файла с pdb структурами глюкоамилазы и коллагена (3gly и 1bkv). На рис. 27 показана молекулярная структура фрагмента молекулы коллагена, хранящаяся в международной базе данных под кодовым названием 1bkv. Для моделирования использовался небольшой фрагмент молекулы коллагена, который содержит 692 атома и суммарный заряд +2 элементарных единиц заряда. Этот фрагмент представляет собой лишь небольшой участок молекулы коллагена, достаточный для проверки основных закономерностей процесса иммобилизации.

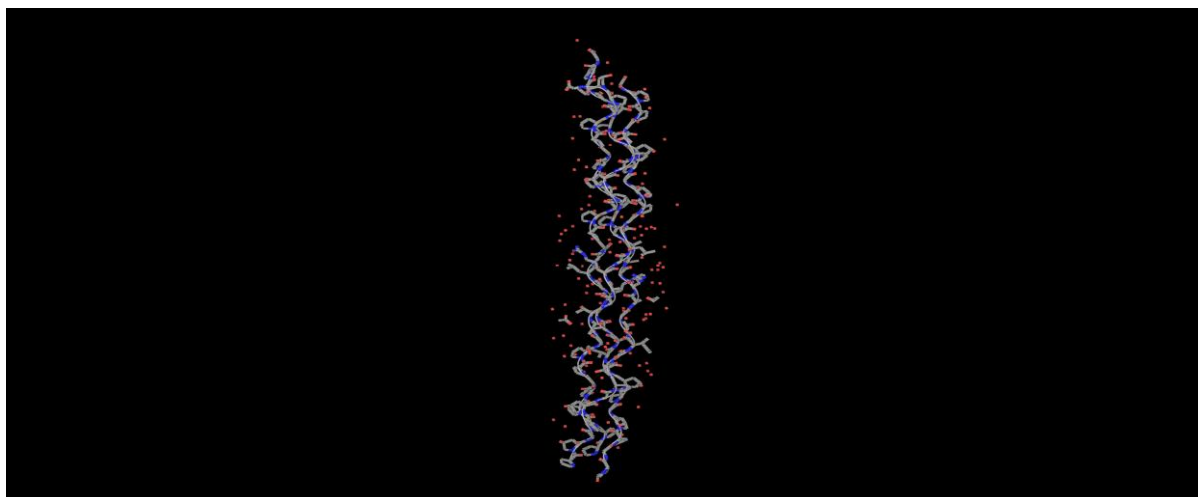


Рис. 27. Пространственная структура коллагена

После загрузки файлов из международной базы данных программа Gramm-X производит докинг-процесс путем многомерного поиска через перемещение и вращение молекул (рис. 28). Таким способом определяются возможные места контактов, далее вычисляются образовавшиеся при контакте связи между группами фермента и коллагена.

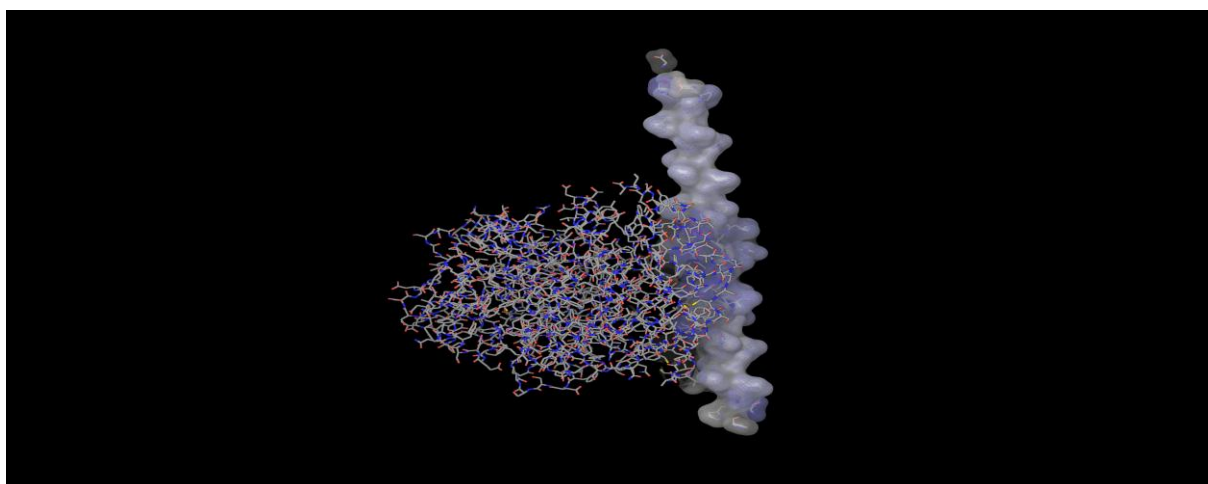


Рис. 28. Пространственная структура глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене

Надо отметить, что для подробного анализа структур, полученных с помощью программы Gramm-X, также необходимы программы Maestro 9.6 и Mole 2.0. Программа Gramm-X позволяет визуализировать 10 способов взаимодействий молекулы глюкоамилазы с коллагеном. Рассмотрим первый способ (рис. 29). Показано, что молекула глюкоамилазы присоединяется к коллагену участком, расположенным около входа в полость активного центра.

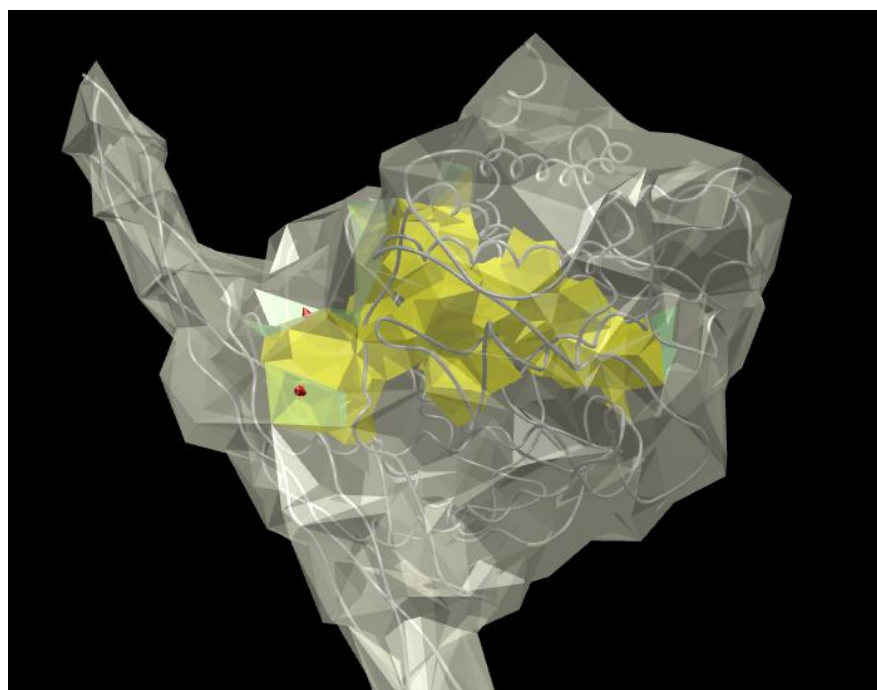


Рис. 29. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген

Показано, что полость активного центра (рис. 29) изменила свою геометрию по сравнению со свободным ферментом (рис. 24). Также молекула коллагена частично экранирует выход из полости активного центра, что может приводить к некоторому снижению способности фермента гидролизовать молекулы крахмала, но полного экранирования не наблюдается.

На рис. 30 показана молекулярная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген. Пунктирными линиями выделены связи между атомами носителя и фермента.

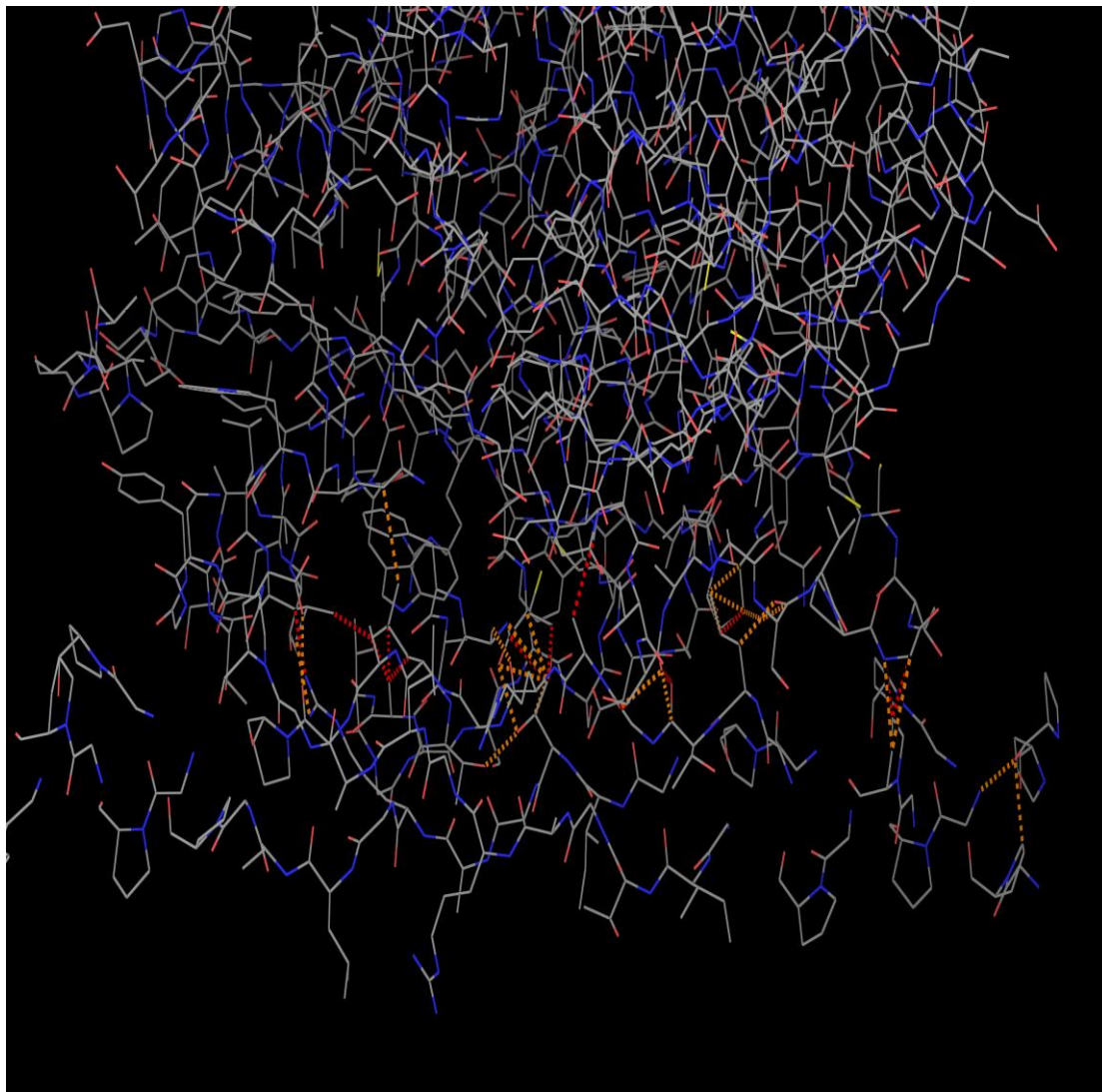


Рис. 30. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген

Показано, что молекула глюкоамилазы взаимодействует с коллагеном на большом участке. Молекула коллагена присоединяется к глюкоамилазе вдоль боковой грани глобулы, образуя по своей длине множество связей.

Анализ 10 способов взаимодействия глюкоамилазы с коллагеном позволил подробно описать эти связи в табл. 10.

Таблица 10

Связи между атомами молекулы глюкоамилазы и коллагена

Аминокислоты коллагена	Аминокислоты глюкоамилазы	Длина связи, А
Ile10	Pro218	3,40
Thr11	Ser441	2,48
Ala13	Val197	2,76
Thr71	Thr204	2,51
Thr71	Ser200	2,73
Leu16	Ala205	2,82
Leu16	Leu143	2,51
Arg44	Asp214	3,00
Ala47	Ala201	3,02
Pro79	Ala201	2,87
Pro25	Pro435	3,13
Pro25	Pro434	2,82
Pro25	Val433	2,72
Leu16	Val346	3,50
Leu16	Pro272	3,44
Ala13	Trp228	3,32
Thr71	Arg273	3,06
Thr71	Gln225	3,20
Ile70	Val445	2,92
Ile70	Pro446	2,89
Ile10	Phe237	2,71
Pro67	Ala450	3,02
Pro67	Ala451	3,11
Pro67	Ala450	3,14
Ile70	Pro446	2,89
Ile10	Phe237	2,92
Thr71	Gln225	3,20
Thr71	Arg273	3,06
Ala13	Trp228	3,32
Leu16	Pro272	3,34
Arg74	Thr334	3,08
Leu16	Val346	3,50
Pro85	Ala205	3,28
Pro79 C	Ala442	3,16
Pro82	Ala201	3,32
Pro82	Val197	3,40
Pro79	Pro218	3,20
Ala47	Pro446	3,05
Leu46	Ala450	2,39
Arg14	Thr448	2,89

Показано, что длины связей между ферментом и носителем от 2,15 до 3,4 А, что позволяет отнести их к гидрофобным взаимодействиям, «слабым и

сильным» водородным связям. Результаты моделирования показывают образование одиночных ионных связей между глюкоамилазой и коллагеном.

Анализируя пространственную структуру комплекса глюкоамилаза-коллаген (рис. 30) и результаты компьютерного моделирования по определению объема полостей свободного фермента, можно прийти к заключению о том, что в результате взаимодействия с коллагеном происходит изменение объемов полостей гидрофобного ядра молекулы глюкоамилазы. Программа Mole 2.0 выдает информацию по объемам полостей в молекуле фермента в порядке убывания размеров. В табл. 11 представлены данные по оценке глубины и объема полостей молекулы глюкоамилазы в свободном состоянии и при взаимодействии с коллагеном.

Таблица 11

Объемы полостей в молекуле глюкоамилазы при различных вариантах взаимодействия с коллагеном (А³)

Полости	Свободный фермент	При взаимодействии с коллагеном (10 способов)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
№1	2639	3207	3066	2639	2639	3874	2639	2820	2838	3202	2863
№2	411	862	862	862	929	862	862	862	862	862	862
№3	275	411	411	411	411	411	448	411	411	411	411
№4	205	205	205	303	369	205	411	400	407	205	285
№5	191	191	191	227	205	191	292	205	301	191	280
№6	188	177	177	205	191	177	221	191	205	177	205
№7	177	147	147	202	187	147	205	177	191	147	193
№8	147	144	144	191	177	144	191	147	162	144	191
№9	131	111	111	147	147	111	147	144	147	111	177
№10	-	71	-	144	144	-	144	132	144	-	147
№11	-	-	-	137	111	-	111	111	111	-	144
№12	-	-	-	111	-	-	-	-	-	-	111

При адсорбционной иммобилизации происходит достоверное увеличение внутренних полостей глюкоамилазы. При 2, 5 и 9 вариантах взаимодействия количество внутренних полостей молекулы глюкоамилазы

не изменяется, но их суммарный объем возрастает. Кроме того происходит увеличение числа полостей на одну при 1 способе, на две - при 4, 6, 7, 8 способах, на три - при 3 и 10 способах. Анализируя данные табл. 11 можно отметить, что полость активного центра в 3, 4 и 6 случаях сохраняет объем, как у свободного фермента, в остальных вариантах изменение объема незначительно.

Кроме того мы рассмотрели еще 9 способов моделирования процесса взаимодействия молекулы глюкоамилазы с коллагеном. Данные представлены в приложении (рис. 10-19 «Приложения»).

Показано, что молекула глюкоамилазы может располагаться на разных расстояниях от входа в активный центр фермента. Имеет место увеличение объема больших полостей, при этом общее число их не изменяется (рис. 10 «Приложения»).

При четвертом способе взаимодействия молекула коллагена присоединяется к глобуле глюкоамилазы на значительном расстоянии от активного центра и не оказывает влияния на его структуру (рис. 12 «Приложения»). Основные полости молекулы глюкоамилазы сохраняют свою форму и объем, однако в месте контакта с коллагеном образуются две новые полости небольшого объема. Если молекула коллагена крепится к молекуле глюкоамилазы на участке выхода из полости активного центра, это приводит к значительному искривлению формы полости (рис. 13 «Приложения»). Ее объем достигает 3874 \AA^3 , что значительно превышает объем полости свободного фермента 2639 \AA^3 .

Молекула коллагена может присоединяться к боковой грани глобулы глюкоамилазы и располагаться параллельно активному центру фермента. При присоединении молекулы коллагена на участке, расположенном рядом с входом в полость активного центра фермента (рис. 15 «Приложения»), происходит искривление ее, и наблюдается частичное экранирование активного центра. Объем полости равен 2820 \AA^3 и 2838 \AA^3 (табл. 11), что несколько превышает объем полости свободного фермента (соответственно

для 7 и 8 способов). При девятом способе взаимодействия молекула коллагена присоединяется к входу в активный центр молекулы глюкоамилазы, вызывая значительное экранирование. Форма полости значительно искривляется. Её объем равняется 3202 \AA^3 , что намного превышает объем полости свободного фермента. Образование новых полостей не наблюдается (рис. 17 «Приложения»).

При десятом способе иммобилизации молекула коллагена проходит над входом в полость активного центра. Полость сильно изогнута, благодаря чему выход направлен практически перпендикулярно каналу (рис. 18 «Приложения»).

Анализируя результаты компьютерного моделирования (Maestro 9.6, Mole 2.0, Gram-X) можно прийти к заключению о том, что при адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене между носителем и ферментом возникают гидрофобные взаимодействия, а также возможно образование слабых, сильных водородных связей, одиночных ионных связей. При этом происходит достоверное увеличение объемов полостей гидрофобного ядра молекулы глюкоамилазы, в некоторых случаях имеет место увеличение количества полостей.

Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на коллагене характеризуется высоким выходом каталитической активности. Результаты биохимических экспериментов по адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене показывают, что при связывании молекулы фермента с носителем происходит уменьшение каталитической активности, которое обусловлено по данным ИК-спектрофотометрии изменением протяженности α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных участков молекулы фермента. Эти изменения сопровождаются изменением конформации гидрофобного ядра молекулы глюкоамилазы. Результаты компьютерного моделирования подтверждают экспериментальные данные и показывают, что при связывании глюкоамилазы с коллагеном происходят видоизменения молекулярной динамики глобулярной структуры глюкоамилазы. Таким

образом, при адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене имеет место изменение внутренней структуры гидрофобного ядра молекулы, сопровождающееся изменением мобильности третичной структуры фермента, что является причиной уменьшения каталитической активности ферментов при физических способах иммобилизации.

Следует отметить, что процесс иммобилизации оказывает заметное влияние на пространственную структуру молекулы глюкоамилазы. Результаты биохимических экспериментов по адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы показали, что при связывании фермента с коллагеном каталитическая активность сохраняется на 66, 25 % по сравнению с нативным энзимом. Это может быть обусловлено уменьшением мобильности третичной структуры, ответственной за образование ФСК (фермент-субстратного комплекса) и превращение субстрата в продукт. Кроме того каталитическая активность иммобилизованной глюкоамилазы может изменяться по сравнению со свободным ферментом за счет частичного экранирования активного центра молекулы носителя, что может приводить к затруднению выхода конечного продукта катализа в окружающий раствор.

Глава 7. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ АДСОРБЦИОННЫМ МЕТОДОМ НА УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБКАХ

7.1. Исследование процесса адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на УНТ

Инновационные исследования в области использования углеродных нанотрубок (УНТ) происходят вследствие их уникальных физико-химических характеристик. Данная модификация углерода по строению представляет соединение между графитом и фуллереном. УНТ могут выполнять функцию переносчика биомолекул, выполняющих роль лекарственных препаратов. Данное свойство УНТ позволяет диагностировать различные патологии в организме человека.

В настоящее время изучается возможность их использования для направленного транспорта химиотерапевтических препаратов, применяемых в онкологии и как платформу для направленного переноса антибиотиков, белковых и углеводных заменителей, разрабатываются вакцины на их основе [136, 91, 146, 165, 92].

Для осуществления адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на УНТ использовали кремниевые пластинки (марки КЭФ-4,5 с толщиной оксида кремния порядка 10 нм). С помощью атомно-силовой микроскопии мы проводили контроль качества исходных пластин кремния и нанотрубок, используемых для адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы.

Показано, что пластины кремния характеризуются средней шероховатостью поверхности 0,3-0,5 нм, что удовлетворяет условиям детекции формируемых структур на данной подложке (рис. 31).

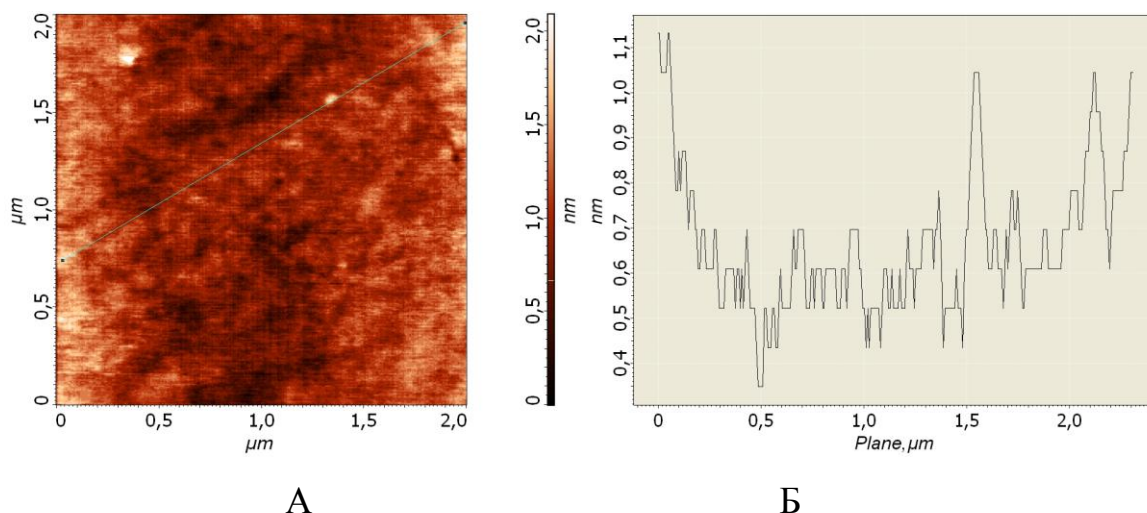


Рис. 31. Изображение пластины кремния (размер кадра 2×2 мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

При исследовании топологии нанотрубок на поверхности кремния обнаружено, что при взаимодействии нанотрубок с пластинами кремния необходима предварительная обработка носителя раствором додецилсульфата натрия, который образует кристаллический слой на кремнии (рис. 32) и предотвращает агрегирование нанотрубок.

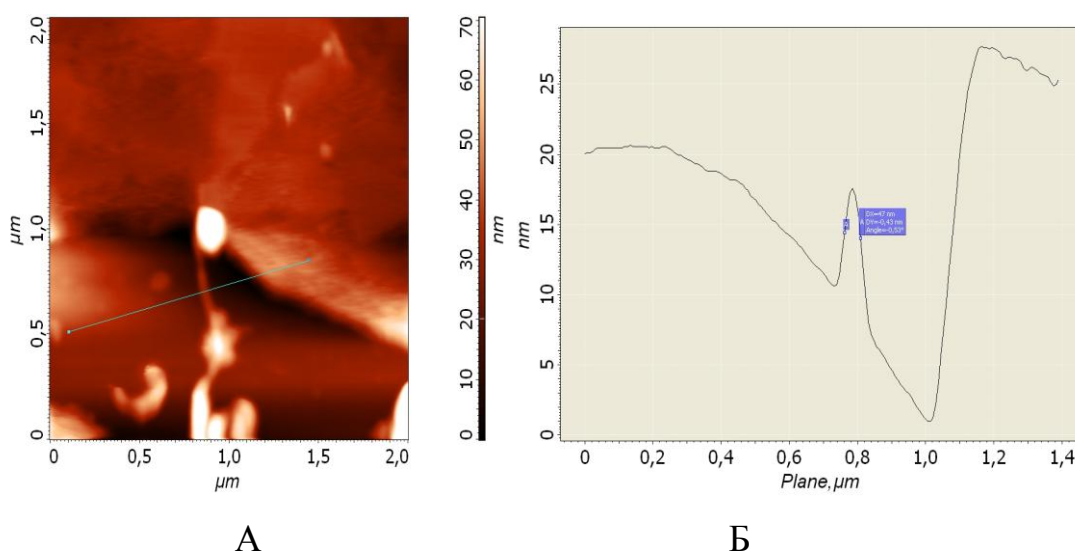


Рис. 32. Изображение УНТ на $\text{SiO}_2\text{-Si}$ (размер кадра 2×2 мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

После тщательного анализа носителей кремниевых пластин и УНТ была осуществлена адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на этих подложках [63].

Иммобилизацию фермента осуществляли следующим образом. Кремниевые пластинки, обработанные додецилсульфатом натрия в течение суток, выдерживали в 20 мл ацетатного буфера при pH 4,7, затем добавляли 5 мл раствора глюкоамилазы (pH 4,7) в концентрации 10^{-6} моль/л и инкубировали в течение 24 часов при комнатной температуре. После завершения процесса иммобилизации препарат несколько раз промывали дистиллированной водой для удаления неадсорбированного белка. Контроль осуществляли на спектрофотометре Shimadzu RF- 5301 PC при $\lambda=280$ нм. Излишки жидкости удаляли с помощью фильтровальной бумаги и высушивали в эксикаторе с влажностью 5-10 % в течение нескольких часов.

УНТ готовили к иммобилизации путём воздействия ультразвука частотой 12000 Гц в течение 5 минут в присутствии додецилсульфата натрия с дальнейшим центрифугированием при скорости 12 000 об\мин 10 минут. При адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы предварительно адсорбировали УНТ из водного раствора на поверхности $\text{SiO}_2\text{-Si}$. Далее помещали в сушильный шкаф при температуре 50 °С.

Анализ результатов экспериментов свидетельствует о том, что глюкоамилаза, адсорбционно связанная с углеродными нанотрубками, сохраняет 153 % от каталитической активности нативного фермента. Каталитическая активность свободного фермента составляет 11,3 ед/мг, а иммобилизованного - 17,4 ед/мг.

При адсорбции удельная активность большинства ферментов уменьшается, и только некоторые из них, связанные *in vivo* с биомембранами, активируются при адсорбции на твердых носителях. Так, каталитическая активность сукцинатдегидрогеназы, иммобилизованной на силикагеле, модифицированном лецитином, возрастает почти в 7 раз.

Рядом авторов проводились исследования взаимодействия каталазы с мембранами, взаимодействующими с УНТ, в результате которых было выявлено увеличение активности энзима [126].

Изменение каталитической активности фермента при адсорбции может быть вызвано:

- 1 - стерическим экранированием активных центров;
- 2 - изменением конформации белковой молекулы;
- 3 - изменением микроокружения фермента.

Увеличение каталитической активности энзима возможно происходит за счет влияния поверхности носителя и межбелковых взаимодействий на активность ферментов в адсорбционных слоях. Наряду с активным и адсорбционным центрами и центрами связывания аллостерических эффекторов молекула фермента может содержать центры ассоциации, насыщение которых происходит с участием идентичных молекул фермента в растворе. Ассоциация по центрам происходит благодаря концентрированию фермента в адсорбционном слое [77].

Дальнейшие исследования глюкоамилазы, иммобилизованной на УНТ адсорбционным методом, показали, что в результате взаимодействия молекулы фермента с носителем образуются агрегаты сложной формы.

Результаты компьютерного моделирования с помощью программного пакета Maestro 9.6 показали, что диаметр молекулы глюкоамилазы (рис. 33) порядка 7 нм [73, 71, 63].

Сравнение размеров аппроксимирующих сфер отдельных частиц в растворах и иммобилизованной глюкоамилазы на модульном спектрометре динамического и статического рассеяния света Photocor Complex, позволяют заключить, что большая часть молекул глюкоамилазы агрегирует друг с другом с образованием более крупных агрегатов глюкоамилаза-УНТ.

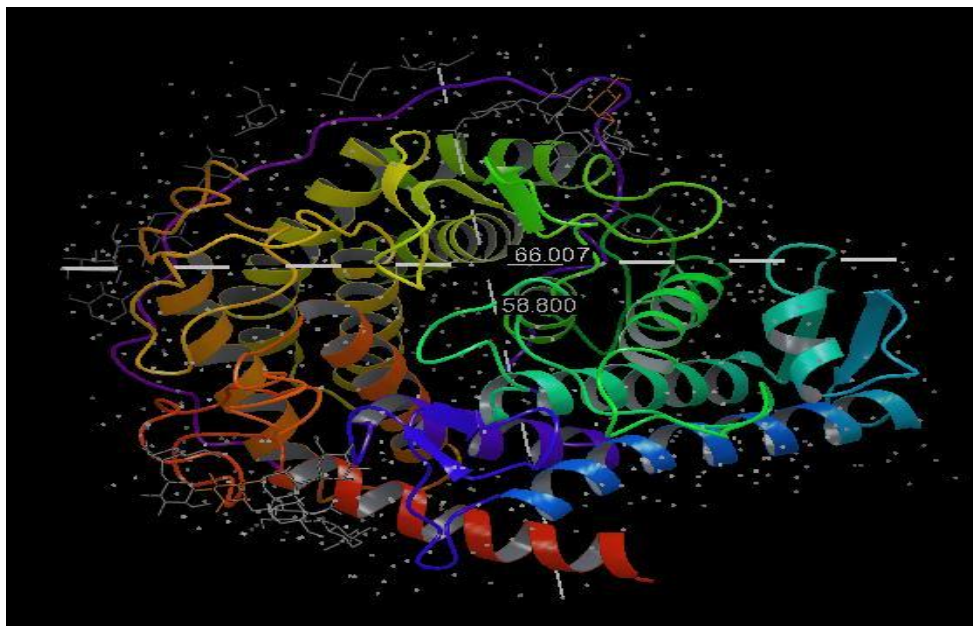


Рис. 33. Глобула глюкоамилазы с линейными размерами

Одним из современных методов изучения процесса иммобилизации ферментов на неорганических носителях и нанотрубках является исследование их топологии методом атомно силовой микроскопии [9, 55, 94].

Анализ АСМ топограмм глюкоамилазы, иммобилизованной на УНТ, показал, что гибридные структуры Глюкоамилаза-УНТ-SiO₂-Si представляли собой УНТ с адсорбированными на них молекулами фермента, причём при связывании с УНТ глюкоамилаза не изменяет надмолекулярную организацию. Выраженность сфероидальных глобул остаётся, но связывание с УНТ сопровождается объединением в более сложные агрегаты, создающие как бы чехол на поверхности УНТ (рис. 34).

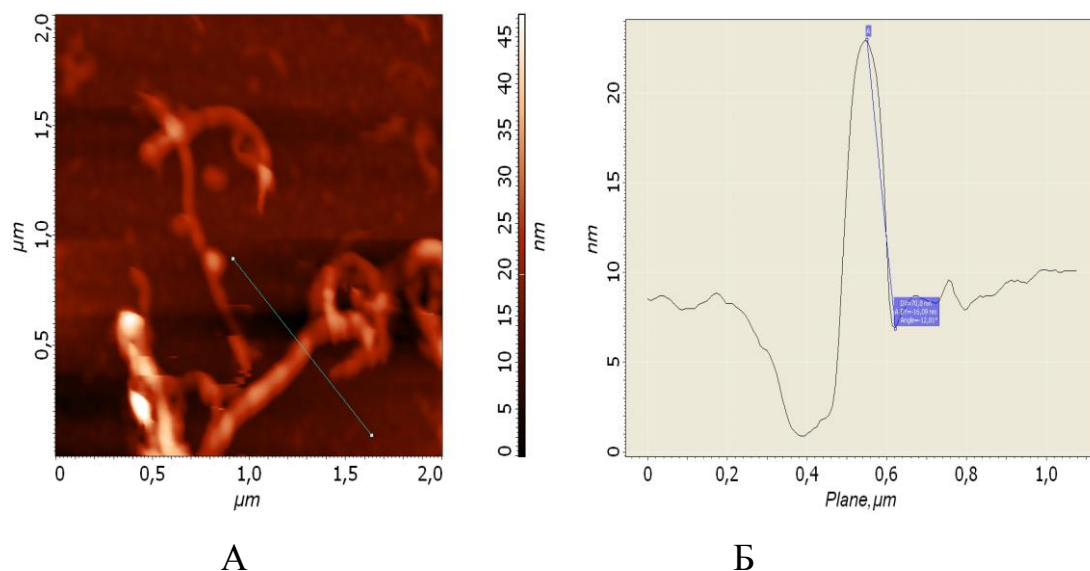


Рис. 34. Изображение глюкоамилазы и УНТ на $\text{SiO}_2\text{-Si}$ (размер кадра 2×2 мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

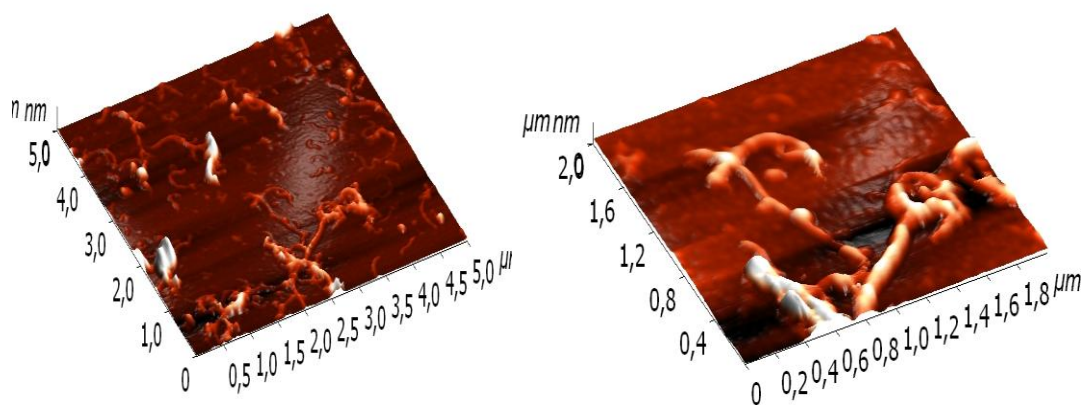


Рис 35. Трехмерные изображения гибридных наноструктур глюкоамилаза-УНТ- $\text{SiO}_2\text{-Si}$: А- (размер кадра 5×5 мкм), Б- (размер кадра 2×2 мкм)

Диаметр УНТ, взаимодействующих с молекулой глюкоамилазы, составляет 15-40 нм, что при сравнении этих значений с размерами немодифицированных УНТ (8-15 нм) является ещё одним подтверждением того, что адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы способствует усложнению структуры УНТ и образованию гибридного комплекса УНТ-глюкоамилаза.

Трёхмерные изображения гибридных наноструктур глюкоамилаза-УНТ-SiO₂-Si позволяют прийти к выводу о том, что крупные агрегаты глюкоамилазы (140, 210 нм) наблюдаются с большой частотой именно вблизи УНТ. На фазовом изображении этот эффект наиболее заметен (рис. 35).

На основе полученных результатов нами была разработана методика получения гибридной бионаноструктуры Глюкоамилаза-УНТ-SiO₂-Si, методом последовательной иммобилизации растворов глюкоамилазы и УНТ на кремниевую подложку. В гибридной структуре Глюкоамилаза-УНТ-SiO₂-Si обнаружено увеличение каталитической активности более чем в 1,5 раза по сравнению с нативным ферментом и полученный нами комплекс глюкоамилаза-УНТ можно считать перспективным для применения в медицинской практике.

7.2. Исследование физико-химических свойств глюкоамилазы, иммобилизованной на нанотрубках

В связи с тем, что основными характеристиками, влияющими на каталитическую активность свободного и иммобилизованного ферментов, являются температура, pH, мы изучили зависимость скорости реакции гидролиза субстрата от данных параметров [22].

Обнаружено, что для иммобилизованной глюкоамилазы характерен более широкий диапазон температур, при которых она проявляет максимальную каталитическую активность. Зона наибольшей активности

лежит в интервале температур 50-85 °С с максимумом при 80 °С. Следовательно, глюкоамилаза, иммобилизованная на УНТ, более стабильна к воздействию высоких температур, чем при иммобилизации на коллагене. Установлено, что для глюкоамилазы, адсорбционно иммобилизованной на УНТ, температурный оптимум реакции гидролиза крахмала смещается в сторону более высоких температур, что на 30 °С выше по сравнению с нативным энзимом (рис. 36).

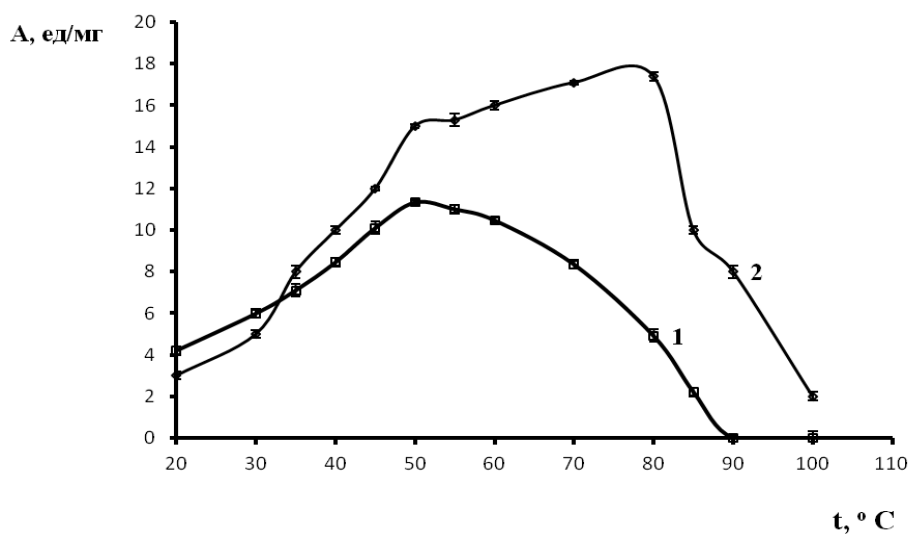


Рис. 36. Зависимость каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной на углеродных нанотрубках, от температуры: 1 - свободная глюкоамилаза; 2 - иммобилизованная глюкоамилаза

Анализ результатов экспериментов показывает, что иммобилизованная глюкоамилаза даже при 90 °С сохраняет 70,5 % активности, а при 100 °С - 17,6 %.

При адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на УНТ (рис. 37) имеет место расширение оптимальных значений pH (4,5-5,0) [207, 1].

Однако, характеризуя форму полученной кривой, нужно отметить, что нисходящая и восходящая части графика для иммобилизованного фермента отличаются от соответствующих участков для свободного

фермента, что может свидетельствовать о различии в количестве ионизированных аминокислотных остатков.

Нами установлено, что комплекс глюкоамилаза - УНТ обладает достаточной прочностью и не разрушается при гидролизе крахмала, в реакторе периодического действия при многократном применении.

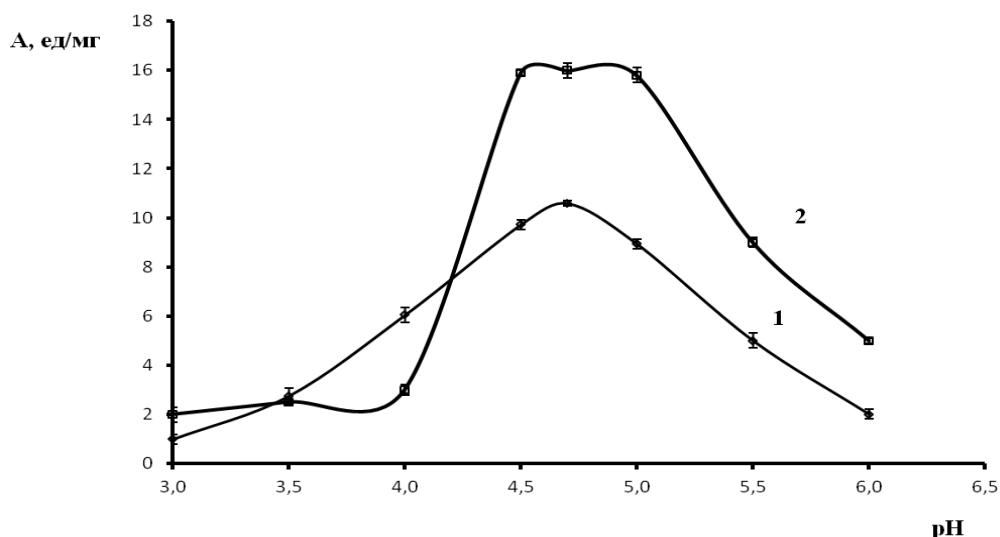


Рис. 37. Зависимость каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной на УНТ, от pH: 1 - свободная глюкоамилаза; 2 - иммобилизованная глюкоамилаза

Электрические свойства УНТ могут быть использованы при разработке различных видов биосенсоров. Одним из возможных способов применения УНТ в биосенсорике может быть конструирование на их основе методов регуляции *in vitro* каталитической активности ферментов и применение УНТ для очистки энзимов [63, 189].

Кроме того возможно создание на основе УНТ избирательных мембран. Наноструктурированные углеродные материалы, такие как углеродные нанотрубки (УНТ) и графен, по праву можно называть передовыми и перспективными материалами нанотехнологий [35, 178].

Анализ экспериментальных данных и литературы позволяет сделать заключение о возможности регуляции каталитической активности молекулы

глюкоамилазы с помощью зарядовых свойств носителя и возможности регуляции процессов взаимодействия субъединиц в процессе катализа. Полученный нами препарат проявляет каталитическую активность на 53 % больше, чем свободный фермент. С помощью АСМ показано, что при иммобилизации происходит образование более сложной структуры глюкоамилазы. Глюкоамилаза, иммобилизованная на УНТ, более устойчива к воздействию внешних факторов и сохраняет способность к многократному применению. Проведенные эксперименты являются первым этапом исследований, направленных на получение новых перспективных ферментных препаратов пролонгированного действия для использования в промышленности и медицине, а также способствуют пониманию закономерностей протекания процесса иммобилизации энзима на углеродных нанотрубках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время появляется все больше публикаций, связанных с изучением процесса адсорбционной иммобилизации энзимов на биологических материалах, которые способствуют изучению механизмов ассоциации ферментов с различными полимерами внутриклеточного окружения *in vivo*. Носители природного происхождения имеют динамичную структуру, высокую специфичность, что может затруднять прогноз происходящих при иммобилизации процессов за счет изменений конформации молекул фермента. В связи с вышеизложенным нами была проведена работа по исследованию закономерностей процесса адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на природных биополимерах и углеродных нанотрубках.

Результаты экспериментов по иммобилизации глюкоамилазы на коллагене, альгинате натрия, пищевых волокнах, а так же углеродных нанотрубках позволяют сделать заключение о том, что глюкоамилаза сохраняет наибольшую каталитическую активность при адсорбционной иммобилизации на углеродных нанотрубках (153 %) и пищевых волокнах (86 %).

Каталитическая активность глюкоамилазы, иммобилизованной на углеродных нанотрубках, определяется в некоторой степени гиперразветвленностью углеродных нанотрубок. Молекулы глюкоамилазы, оказываясь внутри структурированных углеродных нанотрубок, попадают в электромагнитное поле с высокой напряженностью, что может способствовать более жесткой фиксации функциональных групп активного центра и приводить к значительной деформации расщепляющихся связей молекулы субстрата.

Для исследования особенностей надмолекулярной организации белковых глобул в настоящее время успешно применяются различные сочетания классических методов биохимического анализа и современные биофизические подходы, в том числе метод атомно-силовой микроскопии,

который мы использовали для визуализации полученного нами комплекса глюкоамилаза-УНТ. Анализ результатов атомно-силовой микроскопии глюкоамилазы, иммобилизованной на УНТ, показал, что диаметр УНТ, взаимодействующих с молекулой глюкоамилазы, составляет 15-40 нм, размеры немодифицированных УНТ – 8-15 нм. Таким образом, адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы способствует усложнению структуры УНТ и образованию гибридного комплекса УНТ-глюкоамилаза.

Применение Protein-Protein Docking программ (GRAMM-X) для изучения процессов взаимодействия глюкоамилазы с коллагеном позволило прийти к заключению о том, что молекула глюкоамилазы взаимодействует с коллагеном на большом участке с образованием связей по одной из плоскостей поверхности фермента. Причем образование связей молекулы глюкоамилазы с носителем происходит на различном расстоянии от края полости активного центра и сопровождается частичным экранированием ее молекулой коллагена. Кроме того компьютерное моделирование (Maestro 9.6, Mole 2.0) позволяет наблюдать систему туннелей, которые могут участвовать в создании специальной микроструктуры активного центра, и определять объемы туннелей. Установлено, что при адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене происходят изменения внутренней структуры гидрофобного ядра молекулы, сопровождающиеся увеличением полостей и появлением дополнительной полости размером 71 \AA^3 .

Анализируя результаты наших экспериментов и компьютерного моделирования (Maestro 9.6, Mole 2.0, GRAMM-X) можно прийти к заключению о том, что наибольший вклад в стабилизацию комплексов глюкоамилаза - коллаген, глюкоамилаза - альгинат натрия, глюкоамилаза - пищевые волокна, вносят сильные и слабые водородные связи, гидрофобные взаимодействия, а также и одиночные ионные связи.

Определены оптимальные режимы протекания реакции гидролиза крахмала при использовании гетерогенного биокатализатора.

Максимальное увеличение температуры для наибольшего проявления каталитической активности обнаружено для глюкоамилазы, иммобилизованной на УНТ (50-85 °С), на пищевых волокнах (60-70 °С), при иммобилизации на альгинате натрия и коллагене оптимальная температура катализа сдвигается вправо только на 5 °С и составляет 55 °С. Для коллагена процент сохранения активности при воздействии температур 60-70 °С меньше, чем для углеводных носителей, так как коллаген, выступая в роли носителя, так же подвергается тепловой денатурации.

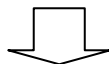
Анализ данных литературы и результаты экспериментов позволяют предположить, что процесс термической инактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы удовлетворяет теории диссоциативной инактивации и концепции конформационного замка. Механизм инактивации энзима предполагает постадийное изменение соединяющих участков в области взаимодействия между мономерами глюкоамилазы, последовательное разрушение которых приводит к потере ферментом каталитической активности.

С помощью компьютерного моделирования обнаружены кластеры гидрофобных аминокислот, которые могут принимать участие в образовании димеров глюкоамилазы. При адсорбционной иммобилизации число контактных площадок между мономерами уменьшается вдвое, что сопровождается снижением эффективной энергии инактивации.

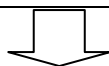
Исходя из литературных данных и результатов наших исследований, мы предлагаем схему процесса адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на альгинате натрия, пищевых волокнах и коллагене, имеющих на поверхности различные функциональные группы.

Схема адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на природных носителях

Изменение состояния гидратной оболочки носителей и глюкоамилазы.

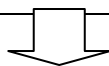


Вытеснение воды из фазы носителя, с поверхности молекулы глюкоамилазы и увеличение числа центров адсорбции фермента.



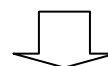
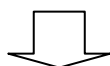
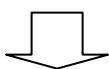
Неспецифическая адсорбция:

Резкое увеличение количества белка в фазе носителя за счет слабых взаимодействий.



Специфическая адсорбция:

1. На первом этапе образуются различные «многоочечные» связанные состояния, причем степень проявления зависит от разнообразных лигандных групп носителей.
2. Возникновение водородных связей, гидрофобных взаимодействий и ионных связей между лигандными группами носителей и соответствующими аминокислотными остатками глюкоамилазы.



Носитель- альгинат натрия	Носитель- пищевые волокна	Носитель-коллаген
<p>Образование водородных связей между COOH - и OH - группами альгината натрия и поверхностными аминокислотными остатками (Ser, Thr, Asp, Glu) глюкоамилазы (табл. 11).</p>	<p>Образование водородных связей между OH - группами пектина, целлюлозы и поверхностными аминокислотными остатками (Ser, Thr, Asp, Glu) глюкоамилазы (табл. 11). Гидрофобные взаимодействия образуются между CH₃ группой лигнина и остатками Ala, Val, Leu, Ile (табл. 11) фермента.</p>	<p>При адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на коллагене возникают гидрофобные взаимодействия между неполярными остатками глюкоамилазы (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe) и коллагена (Ala, Leu, Ile, Pro), а также водородные связи между двумя гидроксильными группами Ser и Thr глюкоамилазы и Arg и Thr коллагена. Возможно образование ионных связей между ионизированной COOH-группой (Asp) и ионизированной NH₂ – группой (Arg) коллагена.</p>

ВЫВОДЫ

1. Разработан адсорбционный способ иммобилизации глюкоамилазы на углеродных нанотрубках, коллагене, пищевых волокнах и альгинате натрия. Показано, что при иммобилизации глюкоамилазы на углеродных нанотрубках каталитическая активность фермента возрастает по сравнению со свободным энзимом (153 %), а на природных носителях происходит уменьшение каталитической активности (66 %, 86 %, 61 % соответственно).

2. С помощью компьютерных программ Maestro 9.6, Mole 2.0 была изучена сложная внутренняя структура гидрофобного ядра молекулы глюкоамилазы. Обнаружено 10 туннелей, 9 полостей, 5 пор.

3. С помощью Protein-Protein Docking программы (GRAMM-X) установлено, что молекула глюкоамилазы адсорбируется на коллагене около входа в полость активного фермента. При адсорбционной иммобилизации между ферментом и носителем возникают гидрофобные взаимодействия, «сильные и слабые» водородные связи, одиночные ионные связи.

4. Показано фотопротекторное действие коллагена по отношению к глюкоамилазе, подвергнутой УФ-облучению. Каталитическая активность свободной глюкоамилазы при УФ-облучении в дозе 1510 Дж/м² снижается на 90,6 %, а для фермента, иммобилизованного на коллагене, - на 55,2 %.

5. Исследованы физико-химические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на углеродных нанотрубках, коллагене, альгинате натрия, пищевых волокнах. При использовании в качестве носителя УНТ иммобилизованный фермент проявляет наибольшую каталитическую активность при температуре 80 °С, при применении пищевых волокон - 60-70 °С, альгината натрия и коллагена - 55 °С.

6. Препарат глюкоамилазы, иммобилизованной на пищевых волокнах, является более термостабильным, чем фермент, иммобилизованный на альгинате натрия и коллагене. Константа инактивации составляет для свободного энзима - 7,43; для глюкоамилазы, иммобилизованной на

альгинате натрия, - 2,9; для глюкоамилазы, иммобилизованной на пищевых волокнах, - 2,03; на коллагене - 3,96.

7. Выявлены механизмы термоинактивации свободной и иммобилизованной глюкоамилазы. Число минимальных стадий термоинактивации, соответствующее количеству контактных участков между глобулами димера, при адсорбционной иммобилизации на коллагене, уменьшается в 2 раза.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы из *Aspergillusawamori* на коллагене / Т.А. Ковалева [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – Вып. 11. – С.19-22.
2. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на амфотерных полиэлектролитах / И.В. Шкутина [и др.] // Журнал физической химии. - 2001. – Т. 75, №11. – С.2008-2010.
3. Аксенов В.В. Получение мальтозной и глюкозной паток из некоторых видов крахмалов / В.В. Аксенов, А.В. Максименко, Е.А. Федорова // Вестник КрасГАУ. – 2007. – Вып. 5. – С. 217 - 221.
4. Антипова Л.В. Получение функционального коллагенового гидролизата и применение его в технологии мясных продуктов / Л.В. Антипова, С.А. Сторублёвцев // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 12. – С.124.
5. Антипова Л.В. Получение коллагеновых субстанций на основе ферментной обработки вторичного сырья мясной промышленности / Л.В. Антипова, И.А. Глотова // Известия вузов. Пищевая технология. – 2000. – № 56. – С. 17-21.
6. Антипова Л.В. Использование вторичного коллагенсодержащего сырья мясной промышленности / Л.В. Антипова, И.А. Глотова. – Санкт-Петербург : ГИОРД, 2006. – 384 с.
7. Антипова Л.В. Получение и свойства коллагеновых субстанций из животных тканей / Л.В. Антипова, И.А. Глотова // Биотехнология. – 1999. – №5. – С.47-53.
8. Антипова, Л. В. Модифицированные белки вторичных продуктов убоя животных в производстве продуктов функционального назначения / Л.В. Антипова, И.А. Глотова // Пищевой белок и экология : материалы

- международной научно-технической конференции. – Москва, 2000. – С. 171-172.
9. Атомно-силовая микроскопия как метод исследования структурных свойств карбогидраз / Т.А. Ковалева [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2008. – № 6. – С. 70.
 10. Бабаев Т.А. Химическая природа биологического действия гликопротеинов / Т.А. Бабаев, Г.В. Виха, Н.Т. Алимбаева. – Ташкент : ФАН УзССР, 1988. – 150с.
 11. Безбородов А.М. Микробиологический синтез / А.М. Безбородов, Г.И. Квеситадзе. – Санкт-Петербург : Проспект Науки, 2011. – 144 с.
 12. Беккер Э.Э. Углеводы среды и характер онтогенеза у *Aspergillusawamori* в связи с биосинтезом глюкоамилазы / Э.Э. Беккер, Э.И. Бурцева, Е.И. Двадцатова // Микробиология. – 1980. – № 4. – С. 527-533.
 13. Беленький Д.М. Особенности ферментативного гидролиза α -1,4-глюкозидных связей / Д.М. Беленький // Успехи биологической химии. – 1971. – Т. 34, Вып. 12. – С. 164-181.
 14. Березин И.В. Инженерная энзимология. Биотехнология. Книга 8 / И.В. Березин, А.А. Клесов, В.К. Швядас. – Москва : Высшая школа, 1987. – 143 с.
 15. Березин И.В. Исследования в области ферментативного катализа и инженерной этимологии / И.В. Березин. – Москва : Наука, 1990. – 382 с.
 16. Березин И.В. Основы физической химии ферментативного катализа / И.В. Березин, К. Мартинек. – Москва : Высшая школа, 1977. - 280 с.
 17. Биодegradуемые материалы на основе полисахаридов и белковых компонентов. / С.С. Аванесян [и др.] // Перспективные разработки науки и техники. – 2008. – Вып. 11. – С. 42-46.

18. Биodeградируемые полимерные материалы / С.Ф. Андрусенко [и др.] // III ежегодная научная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН. – Ростов-на-Дону, 2007. – С. 21-22.
19. Биотехнология. Книга 7. Имобилизованные ферменты / И.В. Березин [и др.]. – Москва : Высшая школа, 1987. – 162 с.
20. Биофизика / В.Г. Артюхов [и др.]. – Москва : Академический Проект, 2009. – 294 с.
21. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии : учеб. пособие для вузов / В.В. Бирюков. – Москва : Колосс, 2004. – 296 с.
22. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология / С.Д. Варфоломеев. – Москва : Академия, 2005. – 480 с.
23. Варфоломеев С.Д. Кинетические методы в биохимических исследованиях / С.Д. Варфоломеев, С.В. Зайцев. – Москва : Изд-во МГУ, 1982. – 345 с.
24. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - Т. 6, № 12. - С. 13–19.
25. Влияние ферментативного и химического дегликозилирования на физико-химические свойства глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* XI00/D27 / К.Н. Неустроев [и др.] // Биохимия. – 1993. – Т.58, № 4. – С. 562-573.
26. Вудворд Д. Имобилизованные клетки и ферменты. Методы / Д. Вудворд. – Москва : Мир, 1988. – 215 с.
27. Галич И.П. Амилазы микроорганизмов / И.П. Галич. – Киев : Наукова думка, 1987. - 192 с.
28. Гетерогенные катализаторы на основе амфотерных ионообменников / О.Ф. Стоянова [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2004. – Т. 4, № 5. – С. 667-671.

- 29.Гладилин А.К. Стабильность ферментов в системах с органическими растворителями / А.К. Гладилин, А.В. Левашов // Биохимия. – 1998. – Т. 63. – Вып. 3. – С. 408-421.
- 30.Глюкоамилазная активность термотолерантных штаммов микроскопических грибов рода *Rhizopus* / А.Я. Панкратов [и др.] // Спиртовая промышленность. – 1969. – № 9. – С. 12-14.
- 31.Грачева И.М. Технология ферментных препаратов : учеб. пособие / И. М. Грачева, А.Ю. Кривова. – Москва : Элевар, 2000. – 512 с.
- 32.Григоров В.С. Получение высокоактивного по глюкоамилазе штамма рода *Rhizopus* / В.С. Григоров, Н.А. Жеребцов // Микробиология. – 1983. – Т. 52, вып. 3. – С. 408-412.
- 33.Диксон М. Ферменты : в 3 т. / М. Диксон, Э.Уэбб. – Москва : Мир,1982. – Т. 1. – 392 с.
- 34.Дудкин М.С. Об использовании термина «пищевые волокна» и их классификация / М.С. Дудкин, Л.Ф. Щелкунов // Вопросы питания. - 1997. - № 3. - С.42-43.
- 35.Елецкий А.В. Сорбционные свойства углеродных наноструктур / А.В. Елецкий // Успехи физических наук. – 2004. – Т. 174, № 11. – С. 1191–1231.
- 36.Еремин А.Н. Иммобилизация внеклеточной глюкозооксидазы *PenicilliumFuniculosum* 46.1 на геле гидроксидов алюминия и цинка / А.Н. Еремин, Т.В.Семашко, Р.В.Михайлова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 156-162.
37. Жеребцов Н.А. О механизме каталитического действия карбогидраз / Н.А. Жеребцов, О.С. Корнеева, Т.Н. Тертычная // Прикладная биохимия и микробиология. - 1999. – Т. 35, № 2. – С. 123-132.
- 38.Жеребцов Н.А. Амилолитические ферменты в пищевой промышленности/ Н.А. Жеребцов. – Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 160 с.

39. Жеребцов Н.А. Исследование механизма кислотной инактивации амилаз солода и плесневых грибов рода *Aspergillus* : автореф. дис....
... д-ра биол. наук / Н.А. Жеребцов. – Воронеж, 1971. – 39 с.
40. Жеребцов Н.А. О механизме кислотного и ферментативного гидролиза крахмала / Н.А. Жеребцов, И.Д. Руадзе, А.Н. Яковлев // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 31, № 6. – С. 599-603.
41. Збинден Р. Инфракрасная спектроскопия высокополимеров / Р. Збинден. – Москва : Мир, 1966. – 350 с.
42. Зимин Ю.В. Кластеро-кинетическая гипотеза ферментативного катализа / Ю.В. Зимин, А.А. Уланова, А.Г. Соловьева // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 9. – С. 559-562.
43. Иванников А.Т. Влияние альгисорба на деконтаминацию молока, загрязненного ^{90}Sr / А.Т. Иванников, Г.А. Алтухова, И.М. Парфенова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1994. – Т. 34, № 4-5. – С. 713-717.
44. Иванова А.А. Пищевая биотехнология / А.А. Иванова, Л.И. Войно, И.С. Иванова. – Москва : Колос С, 2008. – 427 с.
45. Изучение влияния ультрафиолетового излучения на коллаген методами микрокалориметрии и электронного парамагнитного резонанса / Н.О. Метревели [и др.] // Биофизика. – 2006. – Т. 51, № 1. – С. 39-43.
46. Иммобилизация гидролитических ферментов на анионитах Ковалева / Т.А. Ковалева [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8. – Вып. 6. – С. 1035-1041.
47. Иммобилизация глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* 466, некоторые свойства препарата / И.Д. Руадзе [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 2. – С. 202-208.
48. Иммобилизованная глюкоамилаза – биокатализатор процесса гидролиза декстринов / Г.А. Коваленко [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 163-168.

49. Имобилизованные клетки и ферменты / С.П. Бидей [и др.]. – Москва : Мир, 1988. – 215 с.
50. Имобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы : в 2 т. / под ред. И.В. Березина, В.К. Антонова, К. Мартинек. – Москва : Изд-во МГУ, 1976. – Т. 1. – 296 с.
51. Инженерная энзимология / И.В. Березин [и др.]. – Москва : Высшая школа, 1984. – 144 с.
52. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений : учебное пособие / А.В. Васильев [и др.]. – Санкт-Петербург : СПбГЛТА, 2007. – 54 с.
53. Исследование взаимодействия углеродных наноматериалов с клетками *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии / Д.Г. Дерябин [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т. 5, № 11–12. – С. 136–141.
54. Исследование механизма взаимодействия молекулы инулиназы с матрицей синтетических ионитов / М.Г. Холявка [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 4, Ч. 3. – С. 663–671.
55. Исследование процесса термической инактивации глюкоамилазы / Т.А. Ковалева [и др.] // Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация. – 2003. – №1. – С. 57–60.
56. Кантор Ч. Биофизическая химия / Ч. Кантор. – Москва : Мир, 1984. – Т. 1. – 336 с.
57. Каталитические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на углеродном носителе сибуните / Г.А. Коваленко [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 4. – С. 412–418.
58. Квачадзе Л.Л. Селекция микроскопических грибов – продуцентов глюкоамилазы / Л.Л. Квачадзе, Л.Ю. Кутателадзе, Р.И. Квеситадзе // Микробиология. – 1988. – Т. 57, Вып. 3. – С. 405–409.
59. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы / Г.И. Квеситадзе. – Тбилиси: Мецниереба, 1984. – 154 с.

60. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики / Т. Келети. – Москва : Мир, 1990. – 350 с.
61. Кислухина О.В. Ферменты в пищевом производстве / О.В. Кислухина. – Москва : ДеЛи принт, 2002. – 335 с.
62. Клайн Г. Аналитическая химия полимеров / Г. Клайн. – Москва : Мир, 1965. – 290 с.
63. Ковалева Т.А. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на кремниевых пластинках с целью разработки биосенсора // Биотехнология. – 2011. – № 3. – С. 50-56.
64. Ковалева Т.А. О механизме действия и строении активного центра глюкоамилазы / Т.А. Ковалева // Вестник Воронежского государственного университета. Серия химия, биология. – 2000. – № 1. – С. 104-107.
65. Ковалева Т.А. Физико-химические и кинетико-термодинамические аспекты катализа свободными и иммобилизованными амилазами : дис. ... д-ра биол. наук / Т.А. Ковалева ; Воронежский гос. ун-т. – Воронеж, 1998. – 421 с.
66. Ковалева Т.А. Кинетико-термодинамические аспекты катализа полисахаридов свободными и иммобилизованными амилазами / Т.А. Ковалева // Биофизика. – 2000. – Т. 45, № 3. – С. 439-444.
67. Коваленко Г.А. Современные технологии переработки растительного сырья в сахаристые крахмалопродукты (патоки, сиропы) / Г.А. Коваленко, Л.В. Перминова // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 1. – С. 80.
68. Кожокина О.М. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей глюкоамилаз рода *Aspergillus* / О.М. Кожокина, Т.А. Ковалёва // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 8. – С. 19-21.
69. Коллаген и его применение в медицине / А.М. Хилькин [и др.]. – Москва : Медицина, 1976. – 256 с.
70. Коллагенопластика в медицине / И.А. Сычеников [и др.]. – Москва : Медицина, 1978. – 256 с.

71. Компьютерный анализ пространственной структуры некоторых гидролитических ферментов / В.Г. Артюхов [и др.] // Биохимия. – 2005. – Т. 70, Вып. 10. – С. 1318-1327.
72. Координационно-ионная иммобилизация глюкоамилазы на ионообменниках / И.В. Шкутина [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Т. 11, Вып. 2. – С. 201-204.
73. Компьютерное моделирование структуры некоторых карбогидраз / Т.А. Ковалёва [и др.] // В мире научных открытий. – 2010. – № 2, Ч. 3. – С. 98-100.
74. Корнеева О.С. Карбогидразы : препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды : учеб. пособие / О.С. Корнеева. – Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 2001. – 184 с.
75. Котова Г.А. Глюкоамилаза микроорганизмов : учеб. пособие / Г.А. Котова, В.Б. Котов, А.С. Сорокина. – Москва : Пищепромиздат, 1975. – 41 с.
76. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетов. – Москва : Высшая школа, 1980. – 272 с.
77. Курганов Б.И. Регуляция активности ферментов в адсорбционных ферментных системах / Б.И. Курганов, Н.И. Лобода // Биоорганическая химия. – 1977. – Т. 3, № 10. – С. 1407-1419.
78. Ладур Т.А. Новые сахаристые продукты из крахмала / Т.А. Ладур // Пищевая промышленность. – 1999. – № 3. – С. 16-17.
79. Лосева В.А. Изучение влияния рН и способа подготовки экстрагента на свойства пищевых волокон свекловичного жома / В.А. Лосева // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2002. – № 8. – С. 12-15.
80. Лосева В.А. Разработка рационального режима получения пищевых волокон из боя и хвостиков свеклы / В.А. Лосева, О.Ю. Буравкина //

Вестник Воронежской государственной технологической академии. – 1997. – №2. – С. 134-135.

81. Лундовских И.А. Кинетика и механизм термоинактивации рекомбинантной люциферазы светляков *Luciola Mingrelica* / И.А. Лундовских, Е.И. Дементьева, Н.Н. Угарова // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2000. – Т. 41, № 6. – С. - 362-366.
82. Макарова Л.Л. Термодинамика химических процессов / Л.Л. Макарова. – Ижевск : Изд-во Удм. ун-та, 1996. – 240 с.
83. Марголис Л.Б. Липосомы и их взаимодействие с клетками / Л.Б. Марголис, Л.Д. Бергельсон. – Москва : Наука, 1986. – 240 с.
84. Модификация коллагена под воздействием света / Г.А. Реброва [и др.] // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57, Вып. 2. – С. 201-209.
85. Мономолекулярные слои белков и перспективы конструирования наноматериалов на их основе / Г.П. Ямпольская [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 2, Химия. – 2001. – Т. 42, № 5. – С. 355-362.
86. Мультиэнзимные системы в производстве спирта / Л.В. Римарева [и др.] // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2004. – №3. – С. 22-24.
87. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений / К. Наканиси. – Москва : Мир, 1967. – 216 с.
88. Неустроев К.Н. Кислая протеиназа и множественность форм глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* / К.Н. Неустроев, Л.М. Фирсов // Биохимия. – 1995. – Т. 55, № 5. – С. 776-785.
89. Номенклатура ферментов / под ред. А.Е. Браунштейна. – Москва : ВИНТИ, 1979. – 320 с.
90. Организация производства лекарственных средств с учетом правил GMP. Химико-фармацевтическое производство, обзорная информация / С.В. Шилова [и др.]. – Москва : ВНИИСЭНТИ, 1990. – 36 с.

91. От липосом семидесятых к нанобиотехнологии XXI века / В.И. Швец [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2008. – Т. 3, № 11-12. – С. 6-20.
92. Перспективы использования углеродных нанотрубок в качестве каркасного материала в инженерии биологических тканей / И.И. Бобринецкий [и др.]. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерии. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 85-90.
93. Пищевые волокна из сахарной свеклы / В.А. Лосева [и др.]. – Воронеж: ВГТА, 2001. – 256 с.
94. Плескова С.Н. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях / С.Н. Плескова. – Москва : Интеллект, 2011. – 288 с.
95. Полторак О.М. Физико-химические основы ферментативного катализа / О.М. Полторак, Е.С. Чухрай. – Москва : Высшая школа, 1971. – 311 с.
96. Полторак О.М. Термодинамика в физической химии / О.М. Полторак. – Москва : Высшая школа, 1991. – 318 с.
97. Полторак О.М. Диссоциативная термоинактивация, стабильность и активность олигомерных ферментов / О.М. Полторак, Е.С. Чухрай, И.Ю. Торшин // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 3. – С. 360-369.
98. Полторак О.М. Кинетика и механизм инактивации ферментов с четвертичной структурой / О.М. Полторак, Е.С. Чухрай // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 1979. – Т. 20, № 3. – С. 195-211.
99. Поляков В.А. Биотехнология переработки зернового сырья в производстве солода, пива, алкогольных и безалкогольных напитков / В.А. Поляков. – Москва : Пищепромиздат, 2002. – 173 с.
100. Поляновский О.Л. Роль функциональных групп белка в ферментах / О.Л. Поляновский // Ферменты. – Москва : Мир, 1964. – С. 101-117.

101. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков / Е.М. Попов.– Москва : Наука, 1992. - 358 с.
102. Преч Э. Определение строения органических соединений / Э. Преч, Ф. Бюльманн, К. Аффольтер. – Москва : Мир, Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 440 с.
103. Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов / Ф. Прист. – Москва : Мир, 1987. – 117 с.
104. Рабек Я. Экспериментальные методы в химии полимеров / Я. Рабек. – Москва : Мир, 1983. – Ч. 1. – 384 с.
105. Рухлядева А.П. Методы определения активности гидролитических ферментов / А.П. Рухлядева, Г.В. Польшалина. – Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 288 с.
106. Савельев А.Н. Изучение дополнительного субстратсвязывающего центра глюкоамилазы. О влиянии циклодекстринов на реакции, катализируемые глюкоамилазой / А.Н. Савельев, В.Р. Сергеев, Л.М. Фирсов // Биохимия. – 1989. – Т. 54, № 10. – С.1725-1731.
107. Савельев А.Н. Углеводный состав и некоторые свойства глюкоамилазы из *Aspergillusawamory* / А.Н. Савельев, М.Ф. Яковлева, Л.М. Фирсов // Биохимия. – 1984. – Т. 49, Вып. 11. – С. 1754-1765.
108. Сванидзе С.К. Термотолерантный штамм *R. rugosaes* – продуцент глюкоамилазы / С.К. Сванидзе, А.Я. Панкратов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1977. – Т. 13, Вып. 3. – С. 439-442.
109. Свойства α -химотрипсина, ковалентно включенного в сферические микрогранулы из полиакриламида / Р.Б. Айсина [и др.] // Биохимия. – 1980. – Т. 45, № 3. – С. 449-454.
110. Селекция активного продуцента глюкоамилазы / Е.И. Двадцатова [и др.] // Ферментная и спиртовая промышленность. – 1976. – Т.10, № 4. – С. 40-41.

111. Скрипников Ю.Г. Производство плодово-ягодных соков / Ю.Г. Скрипников. – Москва : Колос, 1983. – 256 с.
112. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия / А. Смит. – Москва : Мир, 1982. – 328 с.
113. Сорбенты для медицинской биотехнологии / О.В. Анисенко [и др.] // Наука Москвы и регионов. – 2004. – №1. – С. 72.
114. Справочник биохимика / Р. Досон [и др.]. – Москва : Мир, 1991. – 543 с.
115. Стабилизация щелочной фосфатазы ионами магния / О.М. Полторак [и др.] // Вестник московского университета. Серия 2. Химия. – 1998. – Т. 39, № 4. – С. 233-235.
116. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков / В.М. Степанов. – Москва : Высшая школа, 1996. –С. 313-313.
117. Тарутина Л.И. Спектральный анализ полимеров / Л.И. Тарутина, Ф.О. Позднякова. – Ленинград : Химия, 1986. – 248 с.
118. Термоинактивация щелочных фосфатаз в различных условиях / Л.Ф. Атякшева [и др.] // Журнал физической химии. – Т. 83, № 2. – С. 391-396.
119. Тривен М. Имобилизованные ферменты / М. Тривен. – Москва : Мир, 1983. – 213 с.
120. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов / Г.А. Коваленко [и др.] // Биотехнология. – 2002. – № 5. – С. 81-93.
121. Ферментный препарат «ГлюкоЛюкс-Ф» в комбикормах для супоросных и лактирующих свиноматок / В.В. Семенов [и др.] // Зоотехния. – 2009. – № 11. – С. 8-10.
122. Финкельштейн А.В. Физика белка / А.В. Финкельштейн, О.Б. Птицын. – Москва : КДУ, 2012. – 524 с.
123. Фурсова Т.И. Комплексное влияние ферментных препаратов на степень деструкции полисахаридов зерна кукурузы / Т.И. Фурсова, О.С. Корнеева,

- С.В. Востриков // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2007. – № 4. – С. 36-38.
124. Хаслам Д. Идентификация и анализ полимеров / Д. Хаслам, Г.Л. Виллис. – Москва : Химия, 1971. – 432 с.
125. Чакчир Б.А. Фотометрические методы анализа: Методические указания. / Б.А. Чакчир, Г.М. Алексеева. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФА, 2002. – 44 с.
126. Чухрай Е.С. Физико-химический взгляд на активность, стабильность и адсорбционные свойства ферментов / Е.С. Чухрай, Л.Ф. Атякшева // Журнал физической химии. – 2010. – Т. 84, № 5. – С. 805-818.
127. Шерман С.А. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул / С.А. Шерман. – Минск : Наука и техника, 1989. – 240 с.
128. Шкутина И.В. Влияние ионной формы полиамфолита АНКБ -2 на иммобилизацию ферментов / И.В. Шкутина, О.Ф. Стоянова, В.В. Лунина // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9, Вып. 2. – С. 247-253.
129. Шульц Г. Принципы структурной организации белков / Г. Шульц, Р. Ширмер. – Москва : Мир, 1982. – 361 с.
130. Эллиот А. Инфракрасные спектры и структура полимеров / А. Эллиот. – Москва : Мир, 1972. – 159 с.
131. Юрин В.О. Структурные изменения липидных мембран и коллагена, облученных УФ-светом, и защитное действие растительных экстрактов / В.О. Юрин, Ю.А. Ким, Е.Н. Музафаров // Биофизика. – 2004. – Т. 49, №4. – С. 666-673.
132. A Comprehensive Review of Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides / M.M. Rahman [et al.] // Sensors.– 2010. – Vol. 10. – P. 4855-4886.

133. A new immobilization method and their applications / P.A Peinado [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – Vol. 40. – P. 79-84.
134. Aleshin A.E. Refined structure for the complex of acarbose with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.4-Å resolution / A.E. Aleshin, L.M. Firsov, R.B. Honzatko // *Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269. – P. 15631-15639.
135. Allen J.D. Repetitive attack by *Aspergillus oryzae* α -amylases / J.D. Allen, J.A. Thoma // *Biopolymers*. – 1976. – Vol. 15. – P.729-746.
136. Allen T.M. Drug delivery systems: Entering the mainstream / T.M. Allen, P.R Cullis // *Science*. – 2004. – Vol. 303. – P. 1818–1822.
137. Amylo-glucosidase production by *Torula termophila* / A. Subrahmanyam [et al.] // *Indian journal of experimental biology*. – 1977. – Vol. 15. – P. 495-496.
138. Baltz R.H. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* / R.H. Baltz, J.E. Davies, A.L. Demain. – Washington : ASM Press, 2010. – 786 p.
139. Barthelmebs L. Physical and chemical immobilization methods of photosynthetic materials / L. Barthelmebs, R. Carpentier, R. Rouillon // *Methods in Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 684. – P. 247-56.
140. Bhatnagar A. A review on imidazoles: their chemistry and pharmacological potentials / A. Bhatnagar, P.K. Sharma, N. Kumar // *International Journal of Pharma Tech Research*. – 2011. – Vol. 3, N 1. – P. 268-282.
141. Bhattacharjee A. Collagen structure: the Madras triple helix and the current scenario / A. Bhattacharjee, M. Bansal // *IUBMB Life*. – 2005. – Vol. 57. – P. 161-172.
142. Bickerstaff G.F. *Immobilization of enzymes and cells* / G.F.Bickerstaff. – Totowa : Humana Press, 2006. – 449 p.
143. Blandino A. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules / A. Blandino, M. Macias, D. Cantero // *Process Biochemistry*. – 2001. – Vol. 36. – P. 601-606.

144. Bonifacio A. Effects of sample orientation in Raman microspectroscopy of collagen fibers and their impact on the interpretation of the Amide III band / A. Bonifacio, V. Sergo // *Vibrational Spectroscopy*. – 2010. – Vol. 53. – P. 314-317.
145. Bulaj G. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides / G. Bulaj // *Biotechnology Advances*. – 2005. – N 23. – P. 87-92.
146. Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection / H. Cai [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2003. – Vol. 375. – P. 287-293.
147. Chaperonin GroE-facilitated refolding of disulfide bonded and reduced Taka-amylase A from *Aspergillus oryzae* / Y. Kawata [et al.] // *Protein Engineering*. – 1998. – Vol. 11, № 12. – P. 1293-1298.
148. Collagen-like peptide as a matrix for enzyme immobilization in electrochemical biosensors / M. Yemini [et al.] // *Electroanalysis*. – 2006. – Vol. 18. – P. 2049-2054.
149. Controlled detachment of immobilized liposomes on polymer gel support / M.A. Khaleque [et al.] // *Chemistry Letters*. – 2000. – Vol. 29, № 12. – P. 1402-1403.
150. Covalently bonded adducts of deoxyribonucleic acid (DNA) oligonucleotides with single-wall carbon nanotubes: Synthesis and hybridization / S.E Baker [et al.] // *Nano Letters*. – 2002. – Vol. 2. – P. 1413–1417.
151. Cowan P.M. The polypeptide chain configuration of collagen / P.M. Cowan, S. M. Gavin, A.C.T. North // *Nature*. – 1955. – Vol. 176. – P. 1062-1064.
152. Crystal structure of beta-amylase from *Bacillus cereus* var. *mycoides* at 2.2 Å resolution / T.Oyama [et al.] // *Journal of Biochemistry*. – 1999. – Vol. 125, № 6. – P. 1120-1130.

153. Dan W. Urry Application of Thermodynamics to Biological and Materials Science / W. Dan.- Publisher InTech, 2011. – 628 p.
154. Darby N.J. Protein Structure / N.J. Darby, T.E. Creighton. – Oxford : Oxford University Press, 1993. – 97 p.
155. Deduced amino-acid sequence of a calcium-free amylase from a strain of Bacillus: implications by molecular modeling of high oxidation stability and chelator resistance of the enzyme / H. Hagihara H [et al.] // European Journal of Biochemistry. – 2001. – Vol. 268. – P. 3974-3982.
156. Detachable immobilization of liposomes on polymer gel particles / M.A. Khaleque [et al.] // Colloids and Surfaces B. – 2004. -Vol. 37. – P. 35-42.
157. Dong Z. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release / Z. Dong, Q. Wang, Y. Du // Journal of Membrane Science. – 2006. – Vol. 280. – P. 37-44.
158. Duzgunes N. Bionanotubules formed from liposomes / N. Duzgunes, J. Castillo, M. A. Hayes // Methods in Enzymology : Liposomes, Part F. – 2009. –Vol. 464. – P. 327-342.
159. Effect of chemical modification on structure and activity of glucoamylase from Aspergillus candidus and Rhizopus species / B.C. Shenoy [et al.] // Bioscience. – 1987. – Vol. 11. – P. 339-350.
160. Efficient Formation of Iron Nanoparticle Catalysts on Silicon Oxide by Hydroxylamine for Carbon Nanotube Synthesis and Electronics / H.C. Choi [et al.] // Nano Letters. – 2003. – Vol. 3, № 2. – P. 153-155.
161. Ertesvag H. Modification of alginate using mannuronan C-5-epimerases / H. Ertesvag, G. Skjak-Braek // Methods in Biotechnology. – 1999. – Vol. 10. – P. 71-78.
162. Experimental Approach To Optimize the Use of α -Amylases in Breadmaking / C.M. Rosell [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2001. – Vol. 49. – P. 2973-2977.

163. Fitter J. Structural and dynamical features contributing to thermostability in α -amylases / J. Fitter // *Journal Cellular and Molecular Life Sciences* . – 2005. – Vol. 62, N 17. – P. 1925–1937.
164. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms / Z.S. Olempska-Beer [et al.] // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2006. – Vol. 45, N 2. – P. 144–158.
165. Francis D.S. Handbook of Carbon Nano Materials / D.S. Francis, K.M. Kadish.– World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd, 2011. – 877 p.
166. Frank M.R. Enzymes with Molecular Tunnels / M.R. Frank, B.T. James, M.H. Hazel // *Accounts of Chemical Research*. – 2003. - Vol. 36. – P. 539-548.
167. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. –Vol. 14, N 1. – P. 1232-1277.
168. Fukui S. Immobilized Microbial Cells / S. Fukui, A. Tanaka // *Microbiology*. – 1982. – Vol. 36. – P. 145-172.
169. Glucoamylase : structure / function relationships, and protein engineering / J. Sauer [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 2000. – Vol. 1543. – P. 275-293.
170. Górecka E. Immobilization techniques and biopolymercarriers / E. Górecka, M. Jastrzębska // *Food Science and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 75. – P. 65-86.
171. Heino J. Evolution of collagenbased adhesion systems / J. Heino, M. Huhtala, M.S. Johnson // *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2009. – Vol. 41. – P. 341-348.
172. Hernandez K. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance / K. Hernandez, R. Fernandez-Lafuente // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2011. – Vol. 48, N 2. – P. 107-122.

173. Holmes D.F. Corneal collagen fibril structure in three dimensions: structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization / D.F. Holmes, C.J. Gilpin, K.E. Kadler // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2001. – Vol. 98. – P. 7307-7312.
174. Horváthová V. Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties / V. Horváthová, S. Janecek, E. Sturdík // *Biologia*. – 2000. Vol. 55, N 6. – P. 605-615.
175. Hoschke A. A study of the role of histidine side-chains at the active centre of aminolytic enzymes / A. Hoschke, E. Larso, J. Hollo // *Journal of Molecular Catalysis*. – 1980. – Vol. 81, N 1. – P.157-166.
176. Iizuki H. Studies on the Genus *Monascus*. I.Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Monascus Kaoliang* lov. sp. F-1 / H. Iizuki, S. Mineki // *Journal of General and Applied Microbiology*. – 1977. – Vol. 23. – P. 217-230.
177. Immobilization of Yeast on Polymeric Supports / I. Stolarzewicz [et al.] // *Chemical And Biochemical Engineering*. – 2011. – Vol. 25, N 1. – P. 135-144.
178. Immobilizationstabilization of proteins on nanofibrillated cellulose derivatives and their bioactive film formation / S. Arola [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2012. – Vol. 13, N 3. – P. 594-603.
179. Immobilized enzymes to convert N-sulfo, N-acetyl heparosan to acritical intermediate in the production of bioengineered heparin / J. Xiong [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2013. – Vol. 167. – P. 241-247.
180. Immobilized glucoamylase : a biocatalyst of dextrin hydrolysis / G. Kovalenko [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2006. – Vol. 42, N 2. – P. 145.

181. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques / C. Mateo [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2007. – Vol. 40. – P. 1451-1463.
182. Jonson D.B. Glucoamylase Immobilization on Hornblende / D.B. Jonson, M. Costolloe // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1976. – Vol. 18. – P. 421-424.
183. Kadler K.E. Collagen fibril formation / K.E. Kadler, D.F. Holmes, J.A. Chapman // *Biochemical Journal*. – 1996. – Vol. 316. – P. 1-11.
184. Katchalski-Katzir E. Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures / E. Katchalski-Katzir // *Trends in Biotechnology*. – 1993. – Vol. 11. – P. 471–478.
185. King H.J. The glucoamylase from *Coniophora cerebella* / H.J. King // *Biochemical Journal*. – 1967. – Vol. 105. – P. 577–583.
186. Klibanov A.M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts / A.M. Klibanov // *Science*. – 1983. - Vol. – 219. – P. 722-727.
187. Kobayashi M. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over / M. Kobayashi, T. Nagasawa, H. Yamada // *Trends Biotechnol.* – 1992. – Vol. 10. – P. 402-408.
188. Krzechowska M. Isolation and some properties of glucoamylase from *Cophalosporus charticola* Lindau / M. Krzechowska, H. Urbanek // *Applied Microbiology*. – 1975. – Vol. 30. – P. 163-166.
189. Lactate Dehydrogenase Biosensor Based on an Hybrid Carbon Nanotube-Conducting Polymer Modified Electrode / L. Agui [et al.] // *Electroanalysis*. - 2009. - Vol. 21, N 3-5. – P. 386-391.
190. Laidler K. The kinetics of immonbilized enzyme systems / K. Laidler, P. Bunting // *Methods in Enzymology*. – 1980. – Vol. 64. – P. 227-248.
191. Liposome immobilization on polymer gel particles by in situ formation of covalent linkages / M.A. Khaleque [et al.] // *Chemistry Letters*. – 2003. – Vol. 32. – P. 416-417.

192. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs / D. Felnerova [et al.] // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2004. – Vol. 15. – P. 518-520.
193. Liposomes as proteinase carriers for the accelerated ripening of St. Paulin type cheese / W. Alkhalaf [et al.] // *Journal of Food Science*. – 1988. – Vol. 53. – P. 1674-1679.
194. Liu H.L. Protein engineering to improve the thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* based on molecular dynamics simulations / H.L. Liu, W.C. Wang // *Protein Engineering*. – 2003. – Vol. 16, N 1. – P. 19–25. 85
195. Lopez A. The interphase technique: a simple method of cell immobilization in gel-beads / A. Lopez, N. Lazaro, A. M. Marques // *Journal of Microbiological Methods*. – 1997. – Vol. 30. – P. 231-234.
196. Machius M. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å resolution / M. Machius, G. Wiegand, R. Huber // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – Vol. 246, N 4. – P. 545-55.
197. Marangoni A.G. *Enzyme kinetics: a modern approach* / A.G. Marangoni. – Canada : Wiley, 2003. – 229 p.
198. Mijmoto K. On the immobilized enzyme activities using adsorbents ion exchanges / K. Mijmoto, T. Fujii, J. Miura // *Journal of Fermentation Technology*. – 1971. – Vol. 49. – P. 565-573.
199. Morris C. Impact of calcium on salivary α -amylase activity, starch paste apparent viscosity and thickness perception / C. Morris // *Chemosensory Perception*. – 2011. – Vol.4, № 3. – P. 112-116.
200. Nielsen J.E. Protein engineering of bacterial α -amylases / J.E. Nielsen, T.V. Borchert // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2000. – Vol. 1543, N 2. – P. 253-274.
201. Okada G. Glucoamylase from *Trichoderma viride* / G. Okada // *Journal of the Japanese Society of Starch Science*. – 1977. – Vol. 24. – P. 120-126.

202. Okuyama K. Revision of collagen molecular structure / K. Okuyama, X.Z. Xu, K. Noguchi // *Biopolymers*. – 2006. – Vol. 84. – P. 181-191.
203. Park J.K. Microencapsulation of microbial cells / J.K. Park, H.N. Chang // *Biotechnology Advances*. – 2000. – Vol. 18.– P. 303-319.
204. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*.– 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.
205. *Purification and properties of an α -glucosidase (glucoamylase) in sugar beet seed* / S. Chiba [et al.] // *Agricultural Biology and Chemistry*. – 1978. – Vol. 42. – P. 241-245.
206. Refined structure from the complex of 1-deoxynojirimycin with glucoamylase from *Aspergillus awamori* Var. X100 to 2.4 angstrom resolution / A. Aleshin [et al.] // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32. – P. 1618-1825.
207. Reversible immobilization of glucoamylase onto magnetic carbon nanotubes functionalized with dendrimer / Z. Guanghai [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 91. – P. 591-601.
208. Roos G. Enzymatic catalysis: the emerging role of conceptual density functional theory / G. Roos, P. Geerlings, J. Messens // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2009. – N 113. – P. 13465–13475.
209. Rost B. Bridging the protein-sequence–structure gap by structure predictions / B. Rost, C. Sander // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. – 1996. – Vol. 25. – P. 113- 136.
210. Roy I. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads / I. Roy, M.N. Gupta // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2004. – Vol. 34, N 1. – P. 26–32. 102
211. Ryan G. C. Finding and Characterizing Tunnels in Macromolecules with Application to Ion Channels and Pores / G. C. Ryan, A. S. Kim // *Biophysical Journal*. – 2009. – Vol. 96. – P. 632–645.

212. Saboury A.A. Stability, activity and binding properties study of α -amylase upon interaction with Ca^{2+} and Co^{2+} / A.A. Saboury // *Biologia*. - Bratislava, - 2002. - Vol. 57, N 11. - P. 221-228.
213. Savich A. N. Improving the efficiency of bleaching beet sugar syrups using cellulose / A. N. Savich, Y. I. Sidorenko, T. V. Sheiko // *Sugar*. - 2009. - Vol. 9. - P. 60-61.
214. Sheldon R.A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance / R.A. Sheldon // *Advanced Synthesis & Catalysis*. - 2007. - Vol. 349, N 8-9. - P. 1289-1307.
215. Shoulders M.D. Collagen structure and stability / M.D. Shoulders, R.T. Raines // *Annual Review of Biochemistry*. - 2009. - Vol. 78. - P. 929-958.
216. Similarity of and Differences between the mechanisms of thermal Inactivation beta-galactosidases of different origins / L.F. Atyksheva [et al.] // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. - 2008. - T. 82, N 5. - P. 804-809.
217. Site-directed mutagenesis of active site residues in *Bacillus subtilis* alpha-amylase / K. Takase [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 1992. - Vol. 1120. - P. 281-288.
218. Slominska L. Studies on the Application of Maltogenic Amylase in the Production of Maltose Containing Syrup / L. Slominska, G. Starogardzka // *Starch - Stärke*. - 1986. - Vol. 71, N 6. - P. 205-210.
219. Spherezymes: a novel structured self-immobilization enzyme technology / D. Brady [et al.] // *BMC Biotechnology*. - 2008. - Vol. 8. - P. 8-19.
220. Structure of the raw starch affinity site on the *Aspergillus awamori* var. kawachi glucoamilase / S. Hayashida [et al.] // *Agricultural Biology and Chemistry*. - 1989. - Vol. 53. - P. 135-141.
221. Surface-Sensitive Raman Spectroscopy of Collagen I Fibrils / C. Gullekson [et al.] // *Biophysical Journal*. - 2011. - Vol. 100, N 7. - P. 1837-1845.

222. Tagaki S. Improvement of cellulase for biomass conversion to fermentable sugar / S. Tagaki, H. Sakaguchi // *Cellulose Communication*. – 2004. – N 11. – P. 129-130.
223. Takagi T. Bacterial and mold amylases / T. Takagi, H. Toda, T. Isemura // *Enzymes*. – 1971. – N 5. – P. 235-271.
224. Tatsumi H. Kinetic Analysis of Glucoamylase-Catalyzed Hydrolysis of Starch Granules from Various Botanical Sources / H. Tatsumi, H. Katano, T. Ikeda // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2007. – Vol. 71, N 4. – P. 946 - 950.
225. Tatsumi H. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose by cellobiohydrolase using an amperometric biosensor / H. Tatsumi, H. Katano, T. Ikeda // *Analytical Biochemistry*. – 2006. – Vol. 357. – P. 257-261.
226. Taylor P.M. Some properties of a glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* / P.M. Taylor, E.I. Napier, I.D. Fleming // *Carbohydrate Research*. – 1978. – Vol. 61. – P. 301-308.
227. Thorne J.L. Combining Protein Evolution and Secondary Structure / J.L. Thorne, N. Goldman, D.T. Jones // *Molecular Biology and Evolution*. – 1996. – N 13. — P. 666–673.
228. Tredberg F. NMR spectra for distinguishing α - and β -amylase action / F. Tredberg, A.M. Turner, C.B. Storm // *Naturwissenschaften*. – 1985. – Vol. 72, N 9. – P. 486-487.
229. Velasco-García M.N. Biosensor technology addressing agricultural problems / M.N. Velasco-García, T. Mottram // *Biosystems Engineering*. – 2003. – Vol. 84. – P. 1-12.
230. Weetall H.H. Preparation, characterization and application of enzymes immobilized on inorganic supports / H.H. Weetall // *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*. – 1974. – Vol. 42. – P. 191-212.

231. Williamson G. O-Glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase; conformation and role in binding / G. Williamson, N.J. Belshaw, M.P. Williamson // *Journal of Biochemistry*. – 1992. – Vol. 282. – P. 423-428.
232. Wnek G.E. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering* : Volume 1-4 / G.E. Wnek, G.L.Bowlin. - New York : Informa Healthcare, 2008. – 3552 p.
233. Yamasaki Y. Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Penicillium oxalycium*-Agr / Y. Yamasaki, Y. Susuki, J. Ozawa // *Biological Chemistry*. – 1977. – Vol. 41. – P. 755-762.
234. Yamasaki Y. Purification *and* properties of α -glucosidase and glucoamylase from *Lentinus edodes* / Y. Yamasaki, Y. Susuki // *Agricultural Biology and Chemistry*. – 1978. – Vol. 42. – P. 971-980.

ПРИЛОЖЕНИЕ

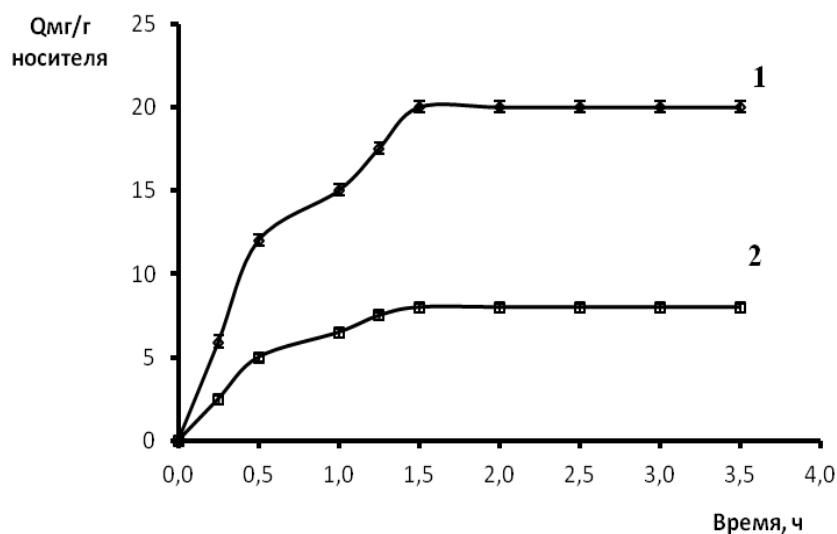


Рис. 1. Кинетическая кривая сорбции глюкоамилазы на коллагене:

1 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС; 2 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, выделенном из дермы прудовых рыб

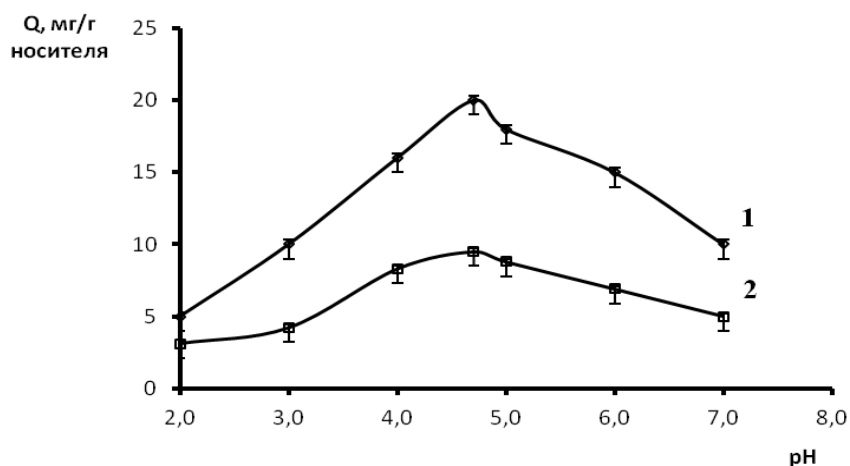


Рис. 2. Зависимость количества сорбированной глюкоамилазы от pH:

1 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС; 2 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, выделенном из дермы прудовых рыб

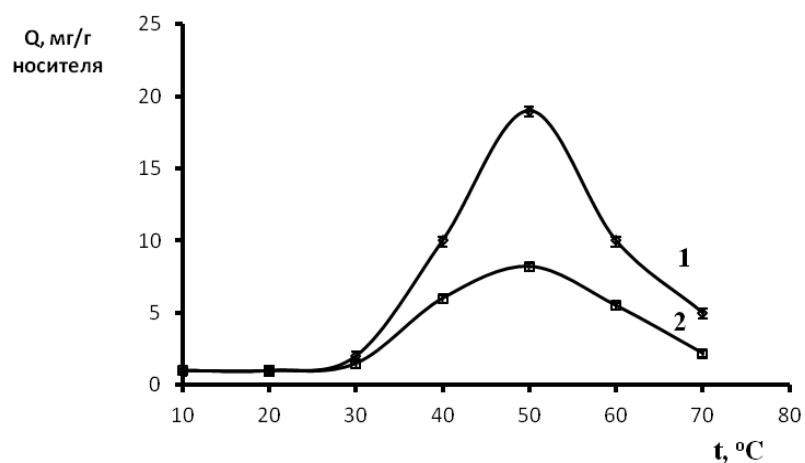


Рис. 3. Зависимость количества сорбированной глюкоамилазы от температуры:

1 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, полученном из соединительной ткани КРС; 2 - глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, выделенном из дермы прудовых рыб

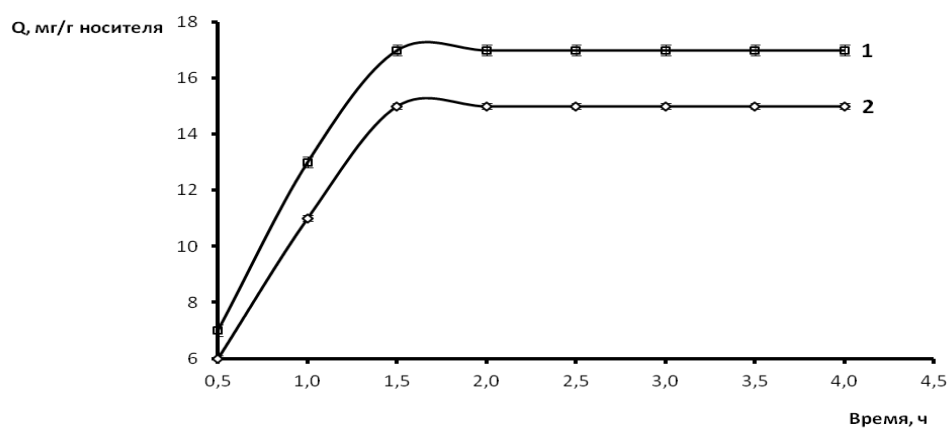


Рис. 4. Кинетическая кривая сорбции глюкоамилазы на альгинате Na и пищевых волокнах: 1 - пищевые волокна; 2 - альгинат натрия

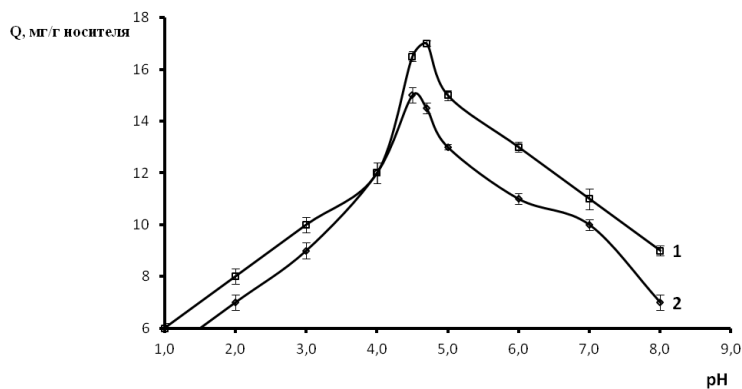


Рис. 5. Зависимость количества сорбированной глюкоамилазы от рН: 1 - пищевые волокна; 2 - альгинат натрия

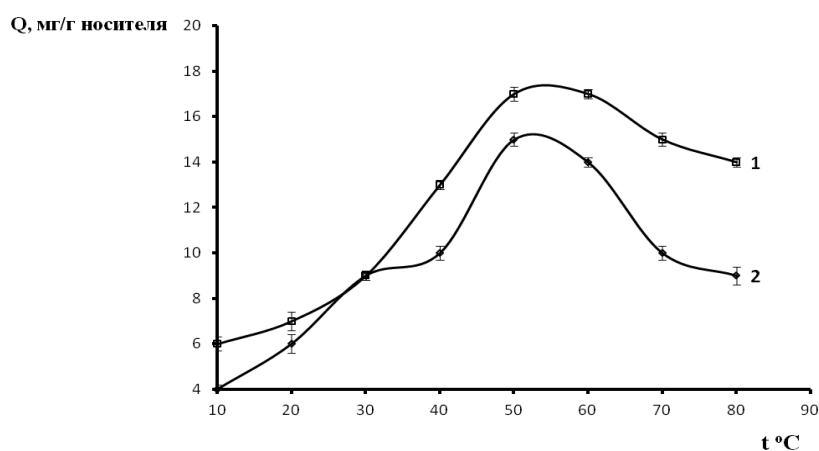


Рис. 6. Зависимость количества сорбированной глюкоамилазы от температуры: 1- пищевые волокна; 2 - альгинат натрия

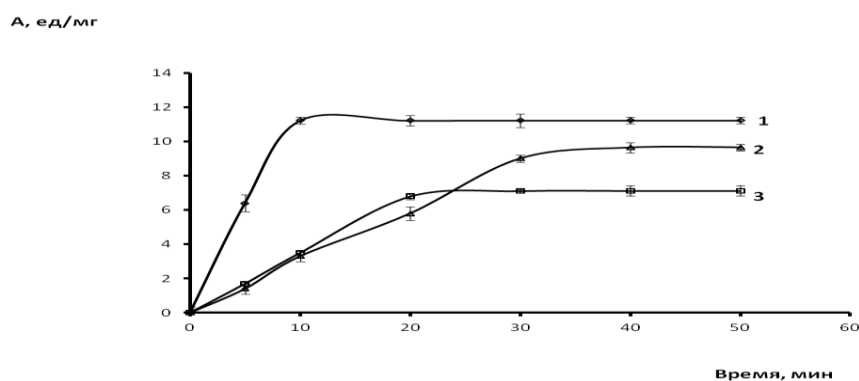


Рис. 7. Зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной глюкоамилазы от времени взаимодействия с субстратом: 1 - свободный фермент; 2 - глюкоамилаза, иммобилизованная на альгинате натрия; 3 - глюкоамилаза, иммобилизованная на пищевых волокнах

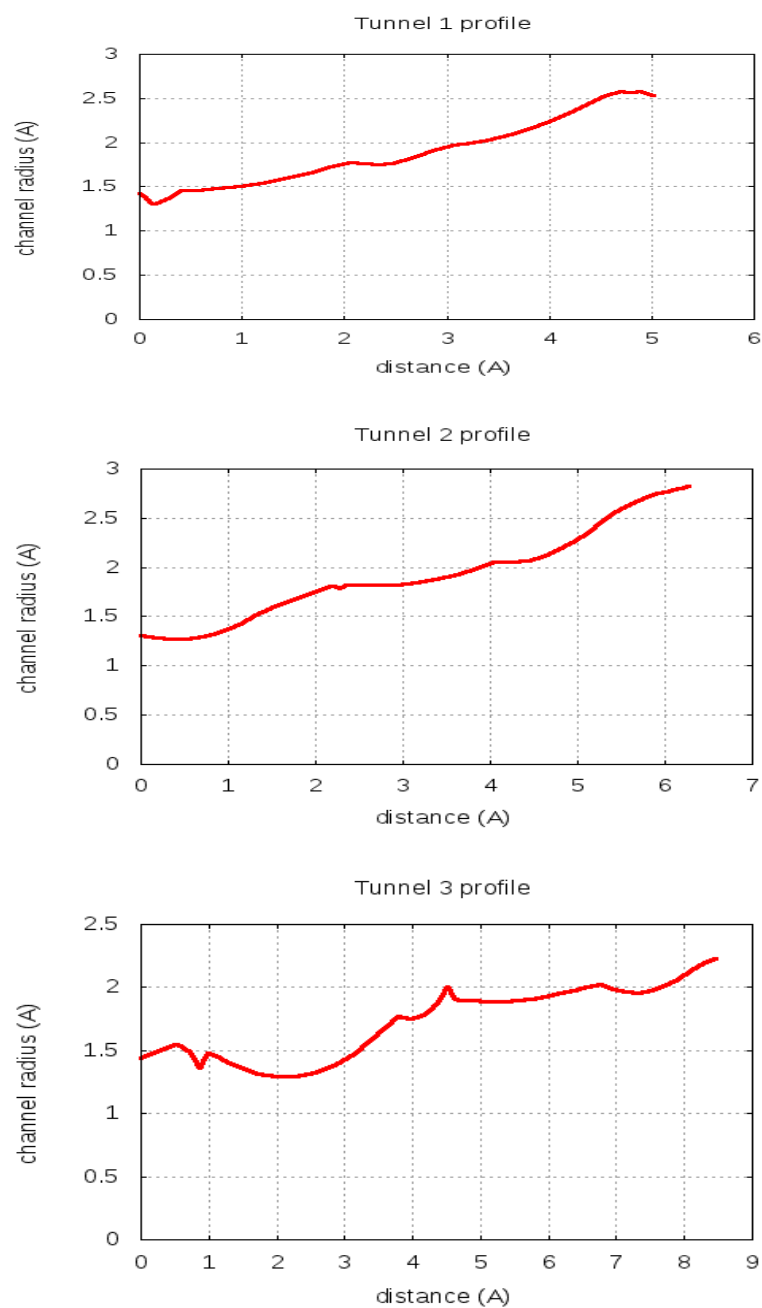
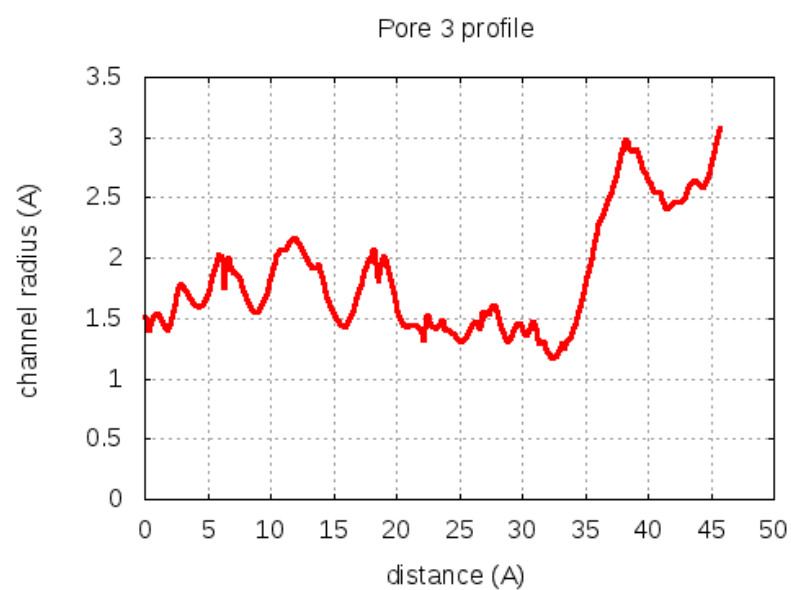
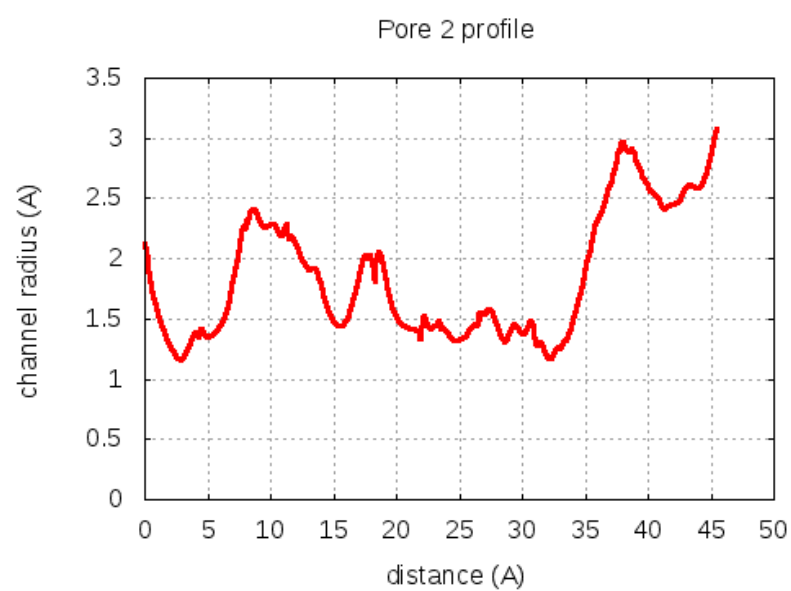
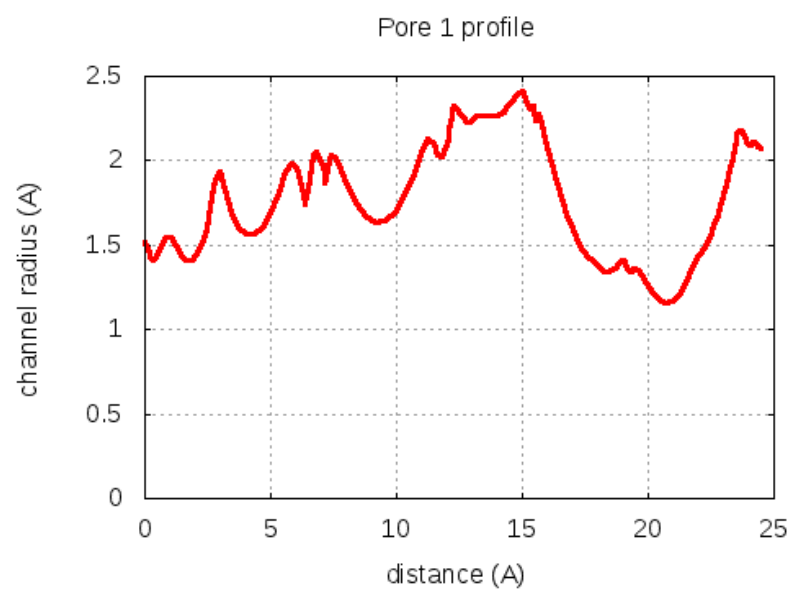


Рис. 8. Зависимость диаметра туннелей от длины: А - первый туннель;
В - второй туннель; С - третий туннель



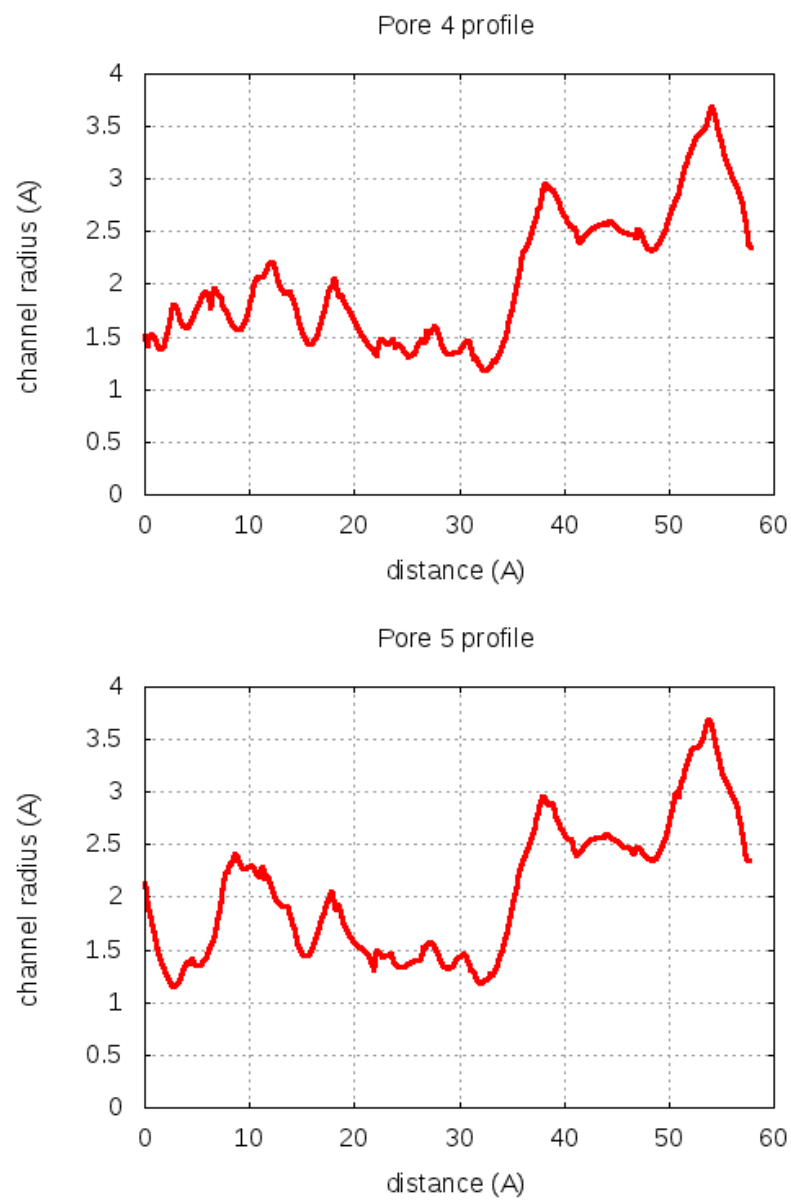


Рис. 9. Профили пор в молекуле глюкоамилазы

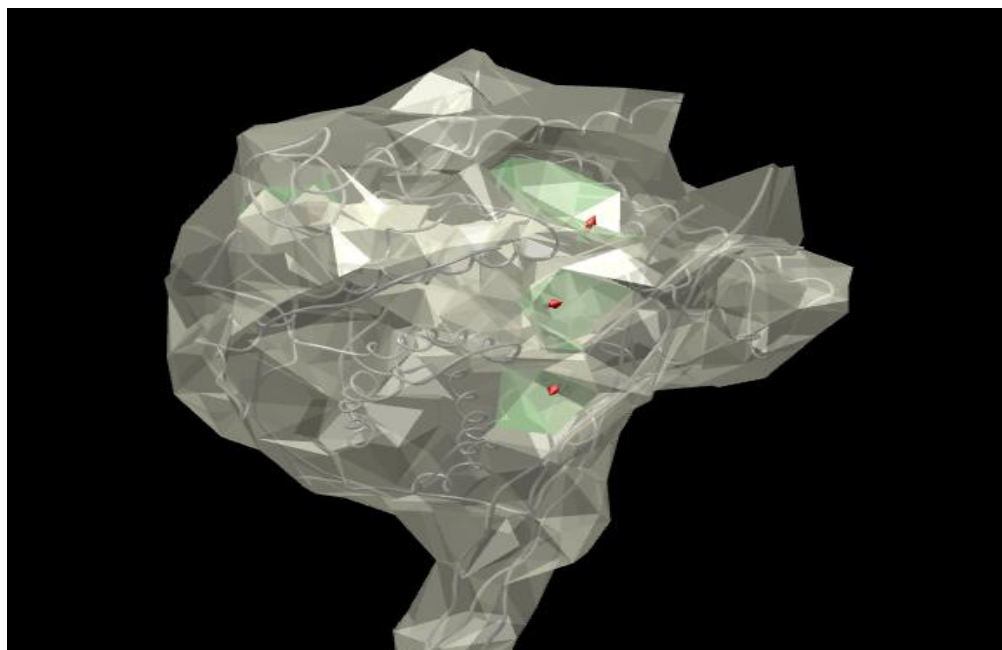


Рис.10. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген
(2 вариант взаимодействия)

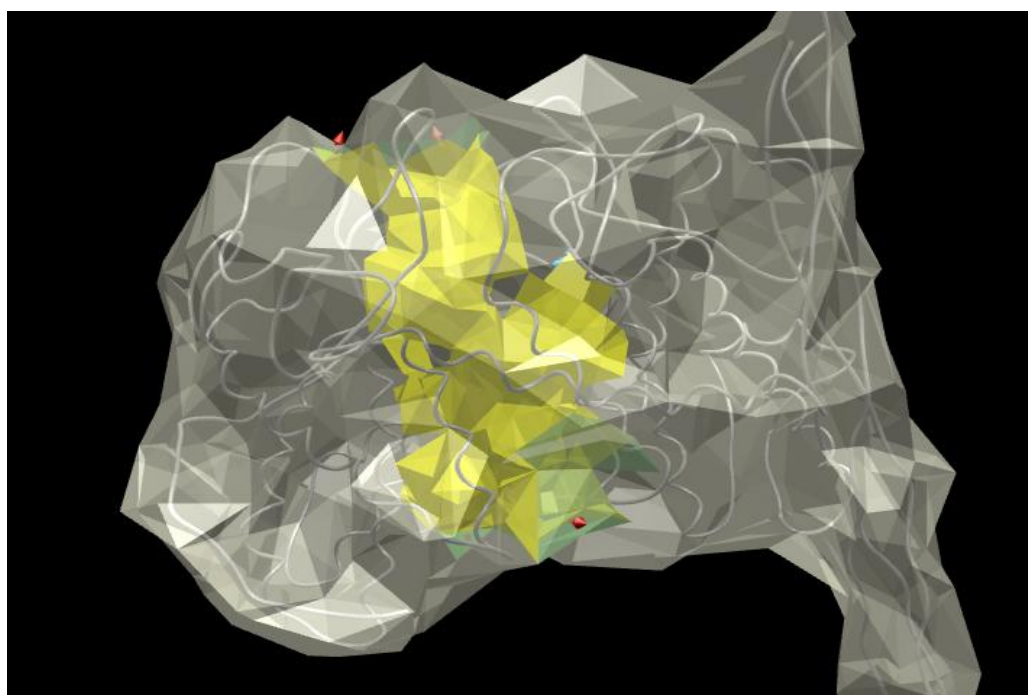


Рис. 11. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген
(3 вариант взаимодействия)

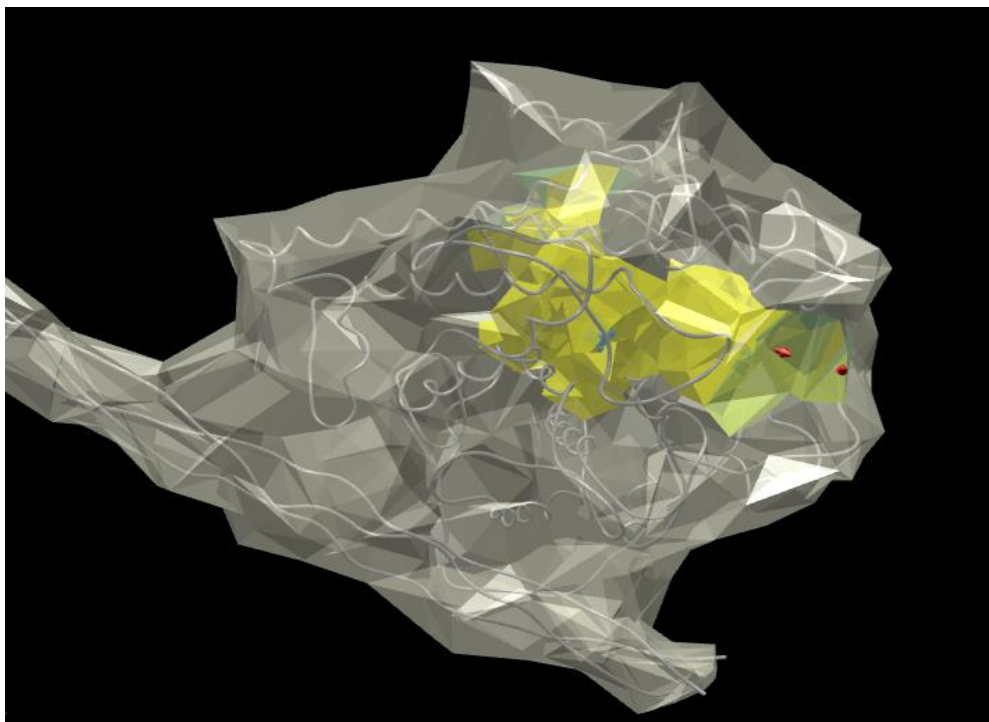


Рис. 12. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген
(4 вариант взаимодействия)

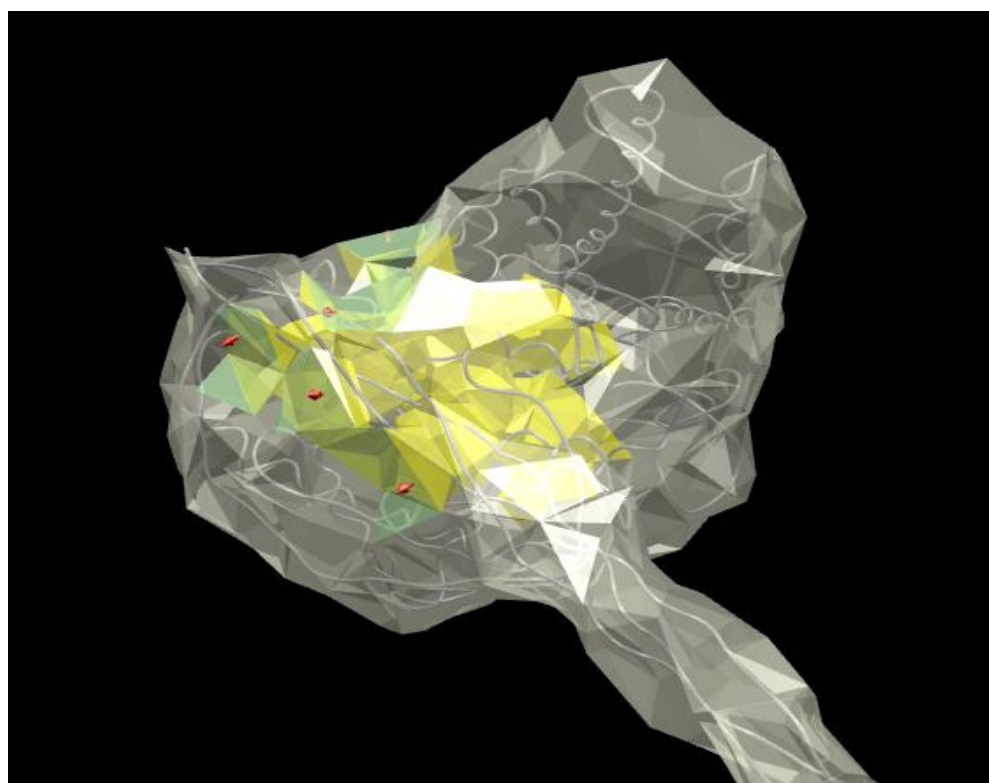


Рис. 13. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген
(5 вариант взаимодействия)

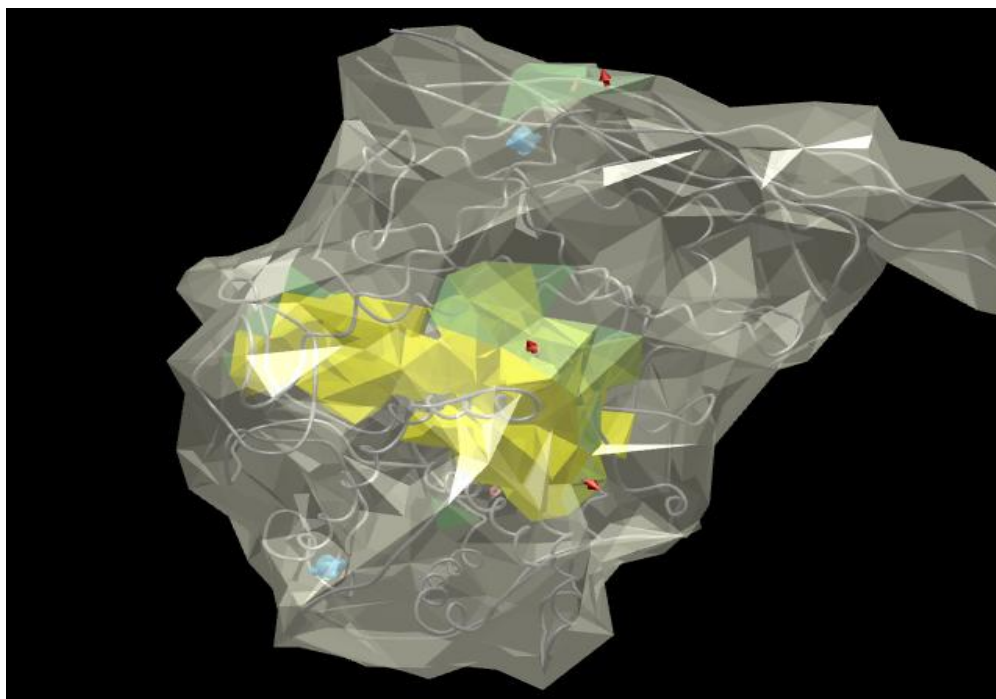


Рис. 14. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген
(6 вариант взаимодействия)

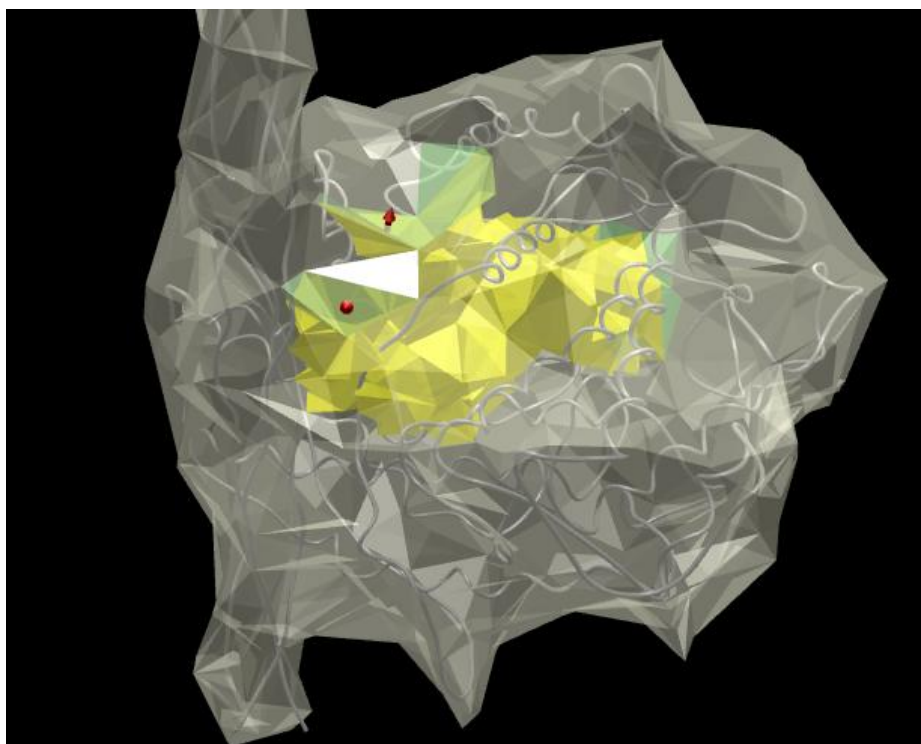


Рис. 15. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген
(7 вариант взаимодействия)

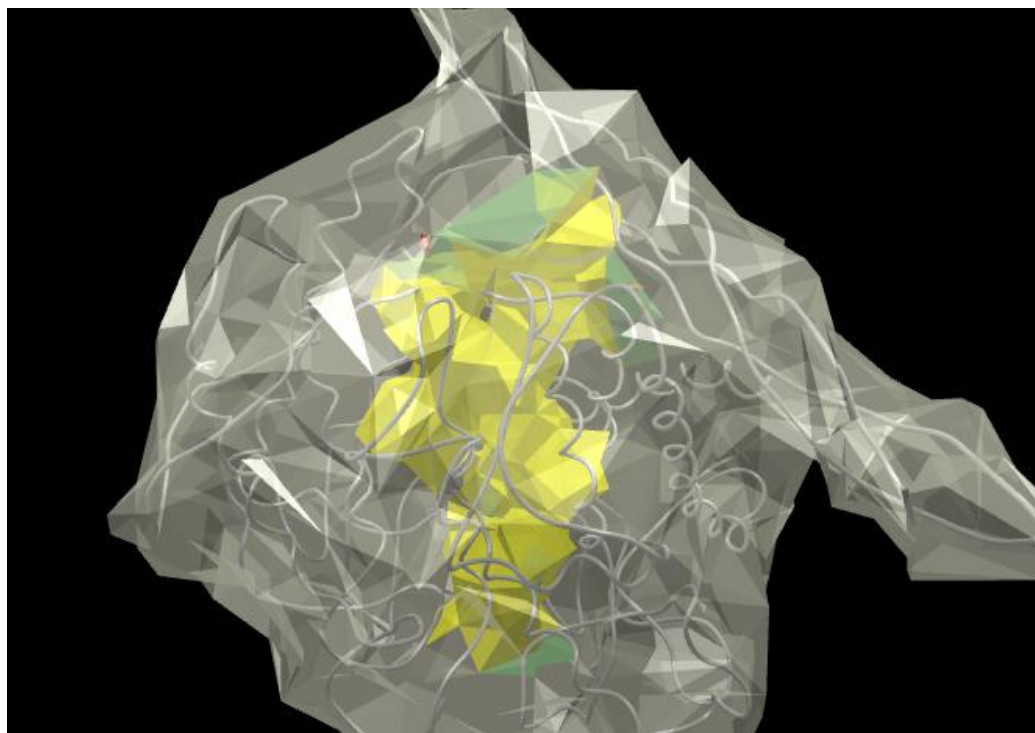


Рис. 17. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген
(8 вариант взаимодействия)

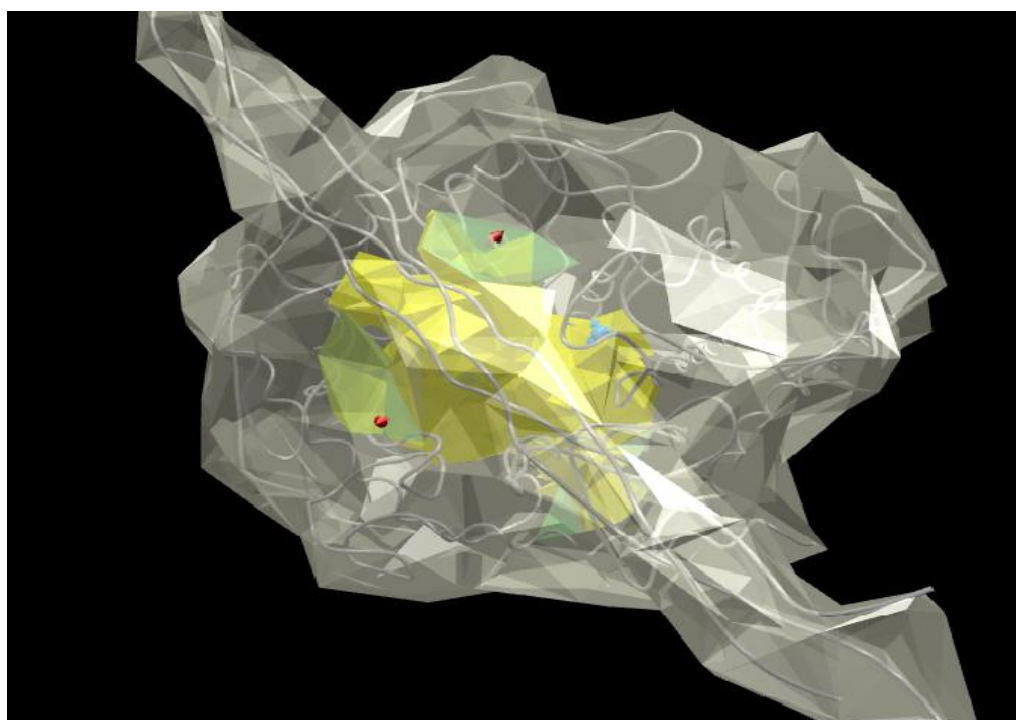


Рис. 18. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген
(9 вариант взаимодействия)

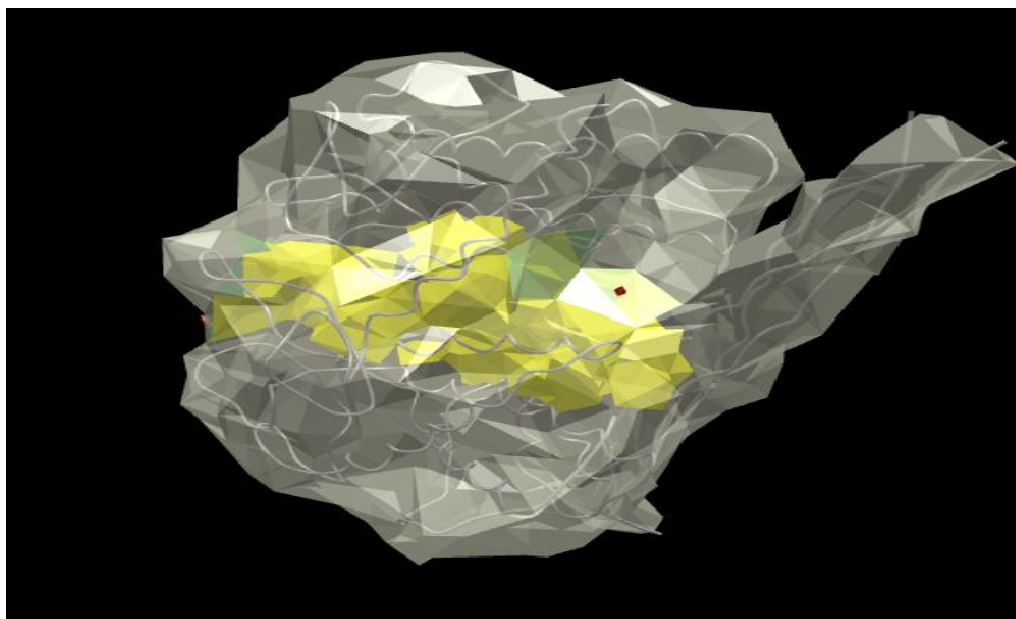


Рис. 19. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген
(10 вариант взаимодействия)