На правах рукописи

Макарова Екатерина Леонидовна

ЗАКОНОМЕРНОСТИ АДСОРБЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА БИОПОЛИМЕРАХ И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБКАХ

Специальность 03.01.02. − Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж − 2014

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО
«Воронежский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ковалева Тамара Андреевна

Официальные оппоненты: **Ревин Виктор Васильевич**
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарева», кафедра биотехнологии, биоинженерии и биохимии, заведующий

Шуваева Галина Павловна
кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», кафедра биохимии и биотехнологии, доцент

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Защита диссертации состоится «23» января 2015 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006, Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.
С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте http://www/science.vsu.ru

Автореферат разослан «_ » ноября 2014 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 pH 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 ^{o}C, 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. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2009), Международной научной конференции «Биотехнология начала

III тысячелетия» (Саранск, 2010), XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «ЛОМОНОСОВ», (Москва, 2011), 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» (Пущино, 2012), Международной конференции «Dny Vedy-2013» (Чехия, 2013), 17-ой Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века» (Пущино, 2013).

Публикации. По теме диссертационной работы имеется публикаций: 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 ^{o}C 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 173 страницы машинописного текста; состоит из «Введения», 7 глав, «Заключения», «Выводов» и «Приложения». Список литературы содержит 234 источника. Иллюстрационный материал включает 37 рисунков и 11 таблиц в основном тексте и 19 рисунков в «Приложении».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе дана характеристика физико-химических и структурных свойств амилолитических ферментов, охарактеризован механизм ферментативного гидролиза крахмала. Рассмотрены наиболее эффективные методы иммобилизации, их практическое значение, изложены современные представления о носителях, используемых при сорбции биологически активных

веществ.

Глава 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служил коммерческий препарат глюкоамилазы (КФ 3.2.1.3.) из Aspergillus awamori. В качестве субстрата использовали растворимый картофельный крахмал фирмы «Экрос», носителями для иммобилизации служили коллаген, выделенный из соединительной ткани крупного рогатого скота 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».

Каталитическую активность глюкоамилазы анализировали с помощью набора реагентов «Оксохром ГЛЮКОЗА С» («Lachema», Чехия). Содержание белка определяли по методу Лоури (O.H. Lowry et al., 1951). Подготовку к работе коллагена и пищевых волокон, сорбционную иммобилизацию осуществляли по стандартным методикам (Л.В. Антипова и др., 2006; В.А. Лосева и др., 2001; В.Ф. Селеменев и др., 2000). Подготовку и анализ образцов методом инфракрасной спектроскопии проводили по стандартной методике с помощью ИК-спектрофотометров SPECORD M-80 и Vertex-70. Для выявления деталей третичной структуры молекулы глюкоамилазы применяли компьютерные программы Maestro 9.6, Mole 2.0, для изучения процессов взаимодействия глюкоамилазы с коллагеном - Protein-Protein Docking программу GRAMM-X. Визуализацию углеродных нанотрубок, молекул глюкоамилазы, иммобилизованных на углеродных нанотрубках, проводили методом атомно-силовой микроскопии в лаборатории наноскопии и нанотехнологии ЦКПНО ВГУ на сканирующем зондовом микроскопе SOLVER P47PRO. Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента.

Глава 3. РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА

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

Выявлено, что иммобилизованный фермент проявляет максимальную каталитическую активность при температуре 55 °С, что на 5 °С выше, чем

для свободного энзима. При изучении зависимости каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, выделенном из соединительной ткани крупного рогатого скота, мы наблюдали более широкий диапазон температур (45 °С - 60 °С), при которых она проявляет максимальную каталитическую активность. Свободный фермент и глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, выделенном из соединительной ткани крупного рогатого скота и из дермы прудовых рыб, характеризуются одинаковым pH-оптимумом (pH 4,7). Однако при иммобилизации глюкоамилазы на коллагене, выделенном из соединительной ткани крупного рогатого скота, наблюдается расширение диапазона значений pH (4,5-5,0), при которых имеет место максимальная каталитическая активность.

С помощью преобразования кривых 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, выделенном из соединительной ткани крупного рогатого скота, K_m' и V_{max}' - $0{,}45 \cdot 10^{-5}$ моль/л и 8,1 мкмоль·мг/мин соответственно.

Нами были изучены УФ-индуцированные изменения каталитической активности глюкоамилазы в нативном состоянии и при адсорбционной иммобилизации на коллагене. Анализ наших экспериментов позволяет придти 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 %. Установлено, что 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.

Таким образом, образование связи между глюкоамилазой и коллагеном оказывает значительное влияние на устойчивость иммобилизованного фермента к УФ-излучению за счет повышения жесткости третичной структуры глюкоамилазы при адсорбции на коллагене, а также влияния матрицы на диффузию свободнорадикальных продуктов, возникающих при воздействии УФ-излучения на изучаемые препараты.

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

С целью выяснения механизма термоинактивации нами были изучены кинетические кривые свободной и иммобилизованной на коллагене глюкоамилазы в полулогарифмических координатах (рис. 1, 2, 3, 4).

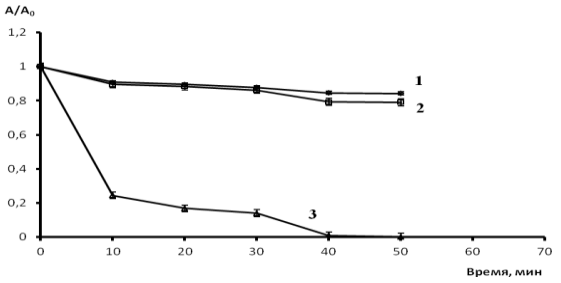


Рис. 1

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

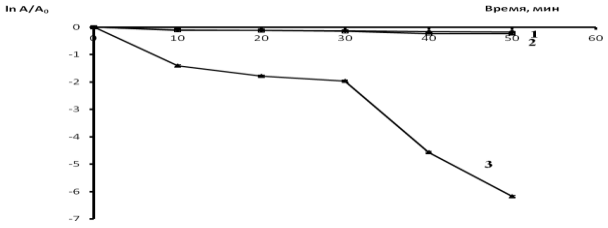


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость lnA/A_0 от времени термоинактивации свободной глюкоамилазы при : 1 - 50 ^oC; 2 - 60 ^oC; 3 - 70 ^oC

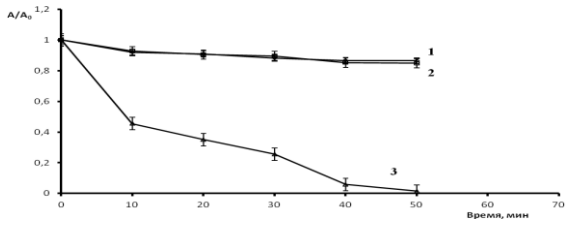


Рис. 3

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

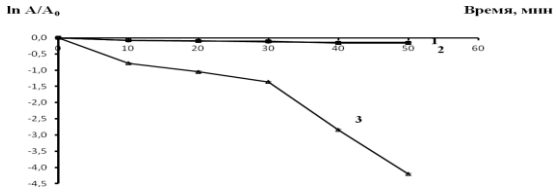


Рис. 4

Рис.4. Зависимость lnA/A_0 от времени термоинактивации иммобилизованной глюкоамилазы при: 1 - 50 ^oC; 2 - 60 ^oC; 3 - 70 ^oC

Наличие точек «излома» в полулогарифмических координатах подтверждает тот факт, что данные по термоинактивации глюкоамилазы удовлетворяют основным положениям теории диссоциативной инактивации. Концепция конформационного замка предполагает постадийное изменение соединяющих участков в области межбелкового взаимодействия, последовательное разрушение которых приводит к потере ферментом каталитической активности.

Определение положения точки излома на кинетической кривой термоинактивации олигомерного фермента позволяет провести расчет элементарных констант процесса термоинактивации. В соответствии с уравнениями, рекомендуемыми теорией диссоциативной инактивации, был

проведен расчет константы диссоциации ($k_{дисс.}$) глюкоамилазы при температурах 50 °С, 60 °С, 70 °С и эффективной константы скорости инактивации ($k_{эфф.}$). Для определения константы скорости денатурации ($k_{ден.}$) использовали значение $k_{эфф.}$ и координаты точки излома на кинетической кривой (табл. 1).

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, а процесс диссоциации глюкоамилазы на мономеры замедляется, что сопровождается снижением эффективной энергии инактивации.

Таблица 1

Расчетные кинетические константы термоинактивации глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене

Температура, °С	$K_{эфф.}$,$с^{-1}$		$K_{дисс.}$, моль/л		$K_{ден.}$,$с^{-1}$	
	1	2	1	2	1	2
50	$1,6\cdot10^{-2}$	$0,85\cdot10^{-2}$	$0,18\cdot10^{-6}$	$0,13\cdot10^{-6}$	$9,8\cdot10^{-2}$	$5,9\cdot10^{-2}$
60	$2,7\cdot10^{-2}$	$1,6\cdot10^{-2}$	$0,24\cdot10^{-6}$	$0,11\cdot10^{-6}$	$12,1\cdot10^{-2}$	$10,1\cdot10^{-2}$
70	$2,9\cdot10^{-2}$	$1,6\cdot10^{-2}$	$4,66\cdot10^{-5}$	$1,3\cdot10^{-5}$	$1,48\cdot10^{-2}$	$0,9\cdot10^{-2}$

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

Особую значимость для ферментов с четвертичной структурой при потере 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 (n), свидетельствующее о числе скрытых изменений, предшествующих потере способности фермента осуществлять превращение молекулы субстрата (рис. 1, 2, 3, 4). По данным ряда авторов, оно соответствует числу контактных участков между глобулами димера. На поверхности глобул, входящих в состав глюкоамилазы, имеется ряд «гидрофобных пятен», которые могут определять взаимодействие между мономерами.

Значение n вычисляли из соотношения: $n = (0,13+ \delta) / (0,13-0,05\ \delta)$, где δ - безразмерный индукционный период, а δ получали графическим способом. Для этого в точке перегиба кинетической кривой (рис. 1, 3) проводили касательную, по величине отрезка, отсекаемого на оси ординат, определяли величину δ.

Нами установлено, что для свободного фермента δ=0,08; для иммобилизованного фермента δ=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.

Глава 5. РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА УГЛЕВОДНЫХ ПОЛИМЕРАХ

Показано, что адсорбционно иммобилизованная глюкоамилаза на альгинате натрия сохраняет 63 % от каталитической активности нативного энзима, а на пищевых волокнах – 86 %, на коллагене, выделенном из соединительной ткани крупного рогатого скота - 66 %. При адсорбционной иммобилизации на альгинате натрия оптимум реакции гидролиза крахмала сдвинулся вправо на 5 °С (55 °С - максимальная каталитическая активность иммобилизованного препарата), для глюкоамилазы, адсорбционно иммобилизованной на пищевых волокнах - на 20 °С (70 °С).

Значения K_m (K_m') и V_{max} (V_{max}') для реакции гидролиза крахмала свободной и иммобилизованной глюкоамилазой на альгинате натрия и пищевых волокнах составили: ($0{,}24\cdot10^{-5}$ моль/л и 11,55 мкмоль·мг/мин; $0{,}4\cdot10^{-5}$ моль/л и 7,28 мкмоль·мг/мин; $0{,}47\cdot10^{-5}$ моль/л и 9,91 мкмоль·мг/мин соответственно), то есть адсорбционная иммобилизация приводит к достоверному увеличению K_m' и уменьшению V_{max}'.

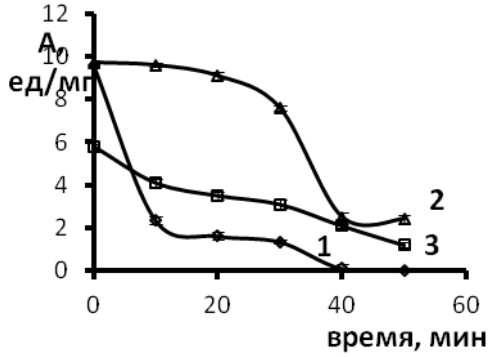


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной глюкоамилазы от времени термической инактивации при 70 °С: 1 - свободная глюкоамилаза; 2 - иммобилизованная на пищевых волокнах; 3 - иммобилизованная на альгинате натрия

На основании результатов экспериментов были рассчитаны константы термоинактивации свободной глюкоамилазы и глюкоамилазы, иммобилизованной на альгинате натрия и пищевых волокнах. Константы термоинактивации при 70 °С составляют 7,43; 2,9; 2,03 соответственно. Наименьшая константа скорости термической инактивации характерна для

глюкоамилазы, иммобилизованной на пищевых волокнах, что подтверждается результатами экспериментов по изучению физико-химических свойств глюкоамилазы, иммобилизованной на природных полимерах.

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

Анализ ИК-спектров глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене, показал, что сорбционная иммобилизация приводит к появлению в ИК-спектре интенсивных полос в области 3400-3200 см$^{-1}$ и 3200-2500 см$^{-1}$, которые указывают на образование 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 (1565-1530 см$^{-1}$) и амид II 1699-1619 см$^{-1}$), что также может быть обусловлено увеличением числа водородных связей, участвующих в стабилизации вторичной структуры глюкоамилазы при иммобилизации на коллагене, и свидетельствует о перераспределении α-спиральных участков, β-слоев и нерегулярных структур. На основании этих данных можно предположить, что связывание белковой глобулы с матрицей носителя происходит за счет водородных связей. Изменение формы и интенсивности пиков в области 3300-2500 см$^{-1}$ (2856 см$^{-1}$, 2918 см$^{-1}$, 2954 см$^{-1}$), обусловленных колебанием связанных групп-ОН, указывает на их участие в образовании водородных связей.

Сорбция глюкоамилазы на коллагене сопровождается изменением формы, интенсивности пиков в областях 3000-2800 см$^{-1}$, 1049 см$^{-1}$ – соответствующих зоне поглощения неполярных аминокислотных остатков, что может указывать на формирование более плотного гидрофобного ядра по сравнению с нативной формой фермента и снижение каталитической активности препарата после иммобилизации.

Данные, полученные с помощью ИК-спектроскопии, согласуются с результатами компьютерного моделирования. Для визуализации пространственной структуры молекулы глюкоамилазы из Aspergillus awamori, имеющей 471 аминокислотный остаток, нами была использована программа Maestro 9.6, которая открывает широкие возможности для изучения пространственной организации белков на основе данных рентгеноструктурного анализа. На рис. 6 видно, что молекула глюкоамилазы окружена 224 молекулами воды.

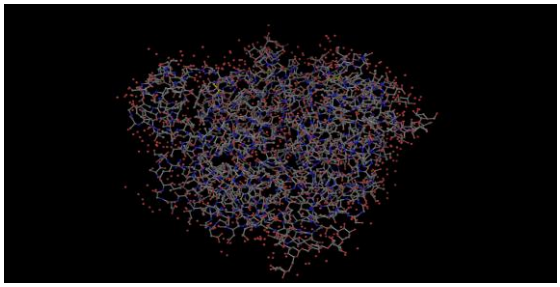


Рис. 6. Пространственная структура глюкоамилазы из Aspergillus awamori (красным цветом обозначены молекулы воды)

По результатам компьютерного моделирования диаметр молекулы глюкоамилазы порядка 7 нм (рис. 7).

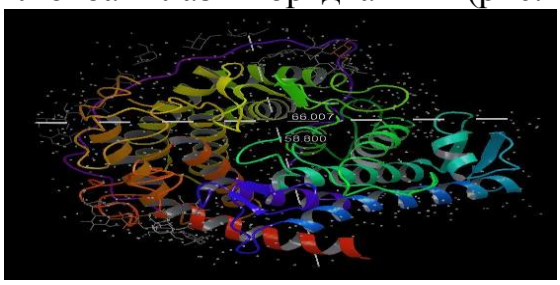


Рис. 7. Глобула глюкоамилазы с линейными размерами

Очень важную информацию для изучения механизма ферментативного катализа свободными и иммобилизованными энзимами позволяет получить визуализация распределения заряженных участков на поверхности молекулы. С помощью программы Maestro 9.6 показано, что количество отрицательных аминокислотных остатков, локализованных на поверхности глюкоамилазы, в 2 раза превышает положительно заряженные области (рис. 8). Выявлено, что молекула обладает отрицательным зарядом (-29 элементарных единиц заряда).

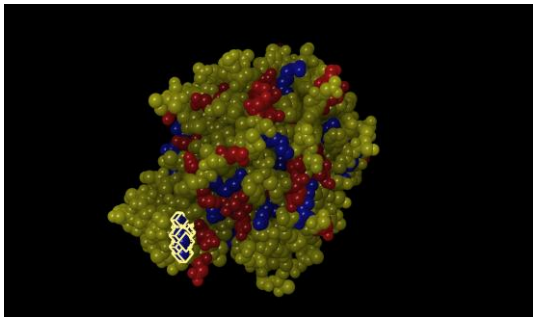


Рис. 8. Расположение аминокислот на поверхности глюкоамилазы (положительно заряженные аминокислоты обозначены синим цветом, а отрицательно заряженные – красным)

По данным компьютерного моделирования на поверхности молекулы располагаются и радикалы гидрофобных аминокислотных остатков. Гидрофобные участки могут возникать за счет α-спиралей, которые превалируют во вторичной структуре, и они могут быть выдвинуты на периферию молекулы глюкоамилазы. Показано, что на поверхности располагаются следующие аминокислотные остатки: val432, leu143, val470, ile469, val206, val13, ile87, ile154, leu295, leu3, leu332, val374, val181, ile88, val463, val91, leu75, leu19, ile288, phe237, ile78.

Проведенный подробный анализ трехмерной модели глюкоамилазы, а также результаты наших исследований по ИК-спектрофотомерии свободной и иммобилизованной на коллагене глюкоамилазы позволяют предположить механизм взаимодействия между глюкоамилазой и коллагеном. При адсорбционной иммобилизации фермента с носителем важную роль играют поверхностные аминокислотные остатки (положительно заряженные, отрицательно заряженные, гидрофобные и полярные), при этом возможно образование водородных связей, гидрофобных взаимодействий и ионных связей.

Анализ ИК-спектров глюкоамилазы, иммобилизованной на углеводных полимерах, показал, что увеличение и расширение полос в области

3400-3200 см$^{-1}$, 3650-3580 см$^{-1}$, 3300-2500 см$^{-1}$ свидетельствует о появлении внутри- и межмолекулярных водородных связей. При иммобилизации интенсивность пика в области 1000 см$^{-1}$ резко возрастает, что может объясняться участием фенилпропановых звеньев лигнина, входящего в состав пищевых волокон, в образовании комплекса фермент-носитель. Появление новых пиков поглощения 2848 см$^{-1}$ и 2920 см$^{-1}$ свидетельствует о появлении гидрофобных взаимодействий между молекулой глюкоамилазы и носителем. Сдвиг и увеличение интенсивности полос поглощения 3249-3325 см$^{-1}$, может указывать на изменение характера взаимодействия между субъединицами. 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.

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. 9).

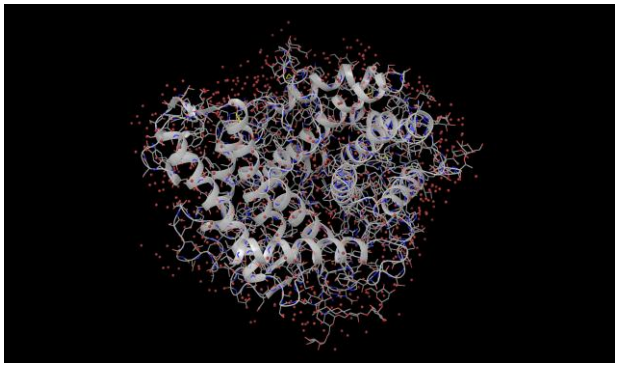


Рис. 9. Пространственная структура глюкоамилазы

Данные по вторичной структуре глюкоамилазы, полученные с помощью программы Maestro 9.6, соответствуют результатам экспериментальных исследований и компьютерного моделирования других авторов и согласуются с результатами наших опытов. Мы исследовали степень изменения вторичной структуры для глюкоамилазы при иммобилизации на коллагене, пищевых волокнах, альгинате натрия. Установлено, что при иммобилизации глюкоамилазы уменьшается количество неупорядоченных структур: на 22,3%, 16,02%, 26% соответственно, что указывает на компактизацию глобулы, формирование более плотного гидрофобного ядра и подтверждает повышение термостабильности полученного препарата.

Программа Mole 2.0 позволяет не только визуализировать пространственную структуру глюкоамилазы, но и уточнять детали внутренней структуры ядра молекулы, дает подробную информацию о форме и расположении полости активного центра (рис. 10). Показано, что она расположена в центре молекулы и пронизывает её насквозь, имея два выхода с

противоположных сторон. Полость активного центра имеет объем 2639 A^3, 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 A^3, V_2=411 A^3, V_3=275 A^3, V_4=205 A^3, V_5=191 A^3, V_6=188 A^3, V_7=177 A^3, V_8=147 A^3, V_9=131 A^3.

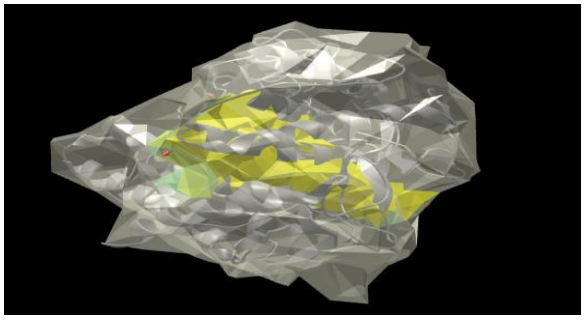


Рис. 10. Полость активного центра молекулы глюкоамилазы из Aspergillus awamori

С помощью программы Mole 2.0 можно, имея результаты рентгеноструктурного анализа белка, определить расположение и конфигурацию различных туннелей, содержащихся в молекуле, по которым может осуществляться передача энергии и электронов из одной части молекулы в другую (рис. 11).

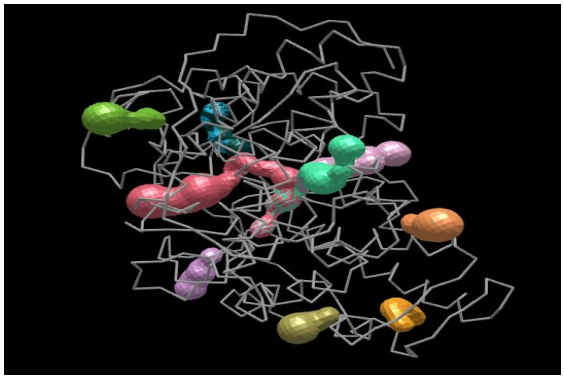


Рис. 11. Конфигурация туннелей в молекуле глюкоамилазы из Aspergillus awamori

Как показано на рис. 11, вся молекула глюкоамилазы пронизана 10 туннелями различной длины, причем 3 самых длинных выходят из полости активного центра. Все туннели имеют переменный радиус (по длине туннеля) и увеличивают свой диаметр по мере углубления примерно в 1,5 раза. Наличие изменений структуры туннеля на выходе в виде “бутылочного горлышка” определяет размеры частиц, которые могут пройти через этот туннель.

Обнаружено, что молекула глюкоамилазы кроме полостей и туннелей имеет еще 5 пор сложной конфигурации, пронизывающих молекулу глюкоамилазы насквозь по её центру. 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 (рис. 12).

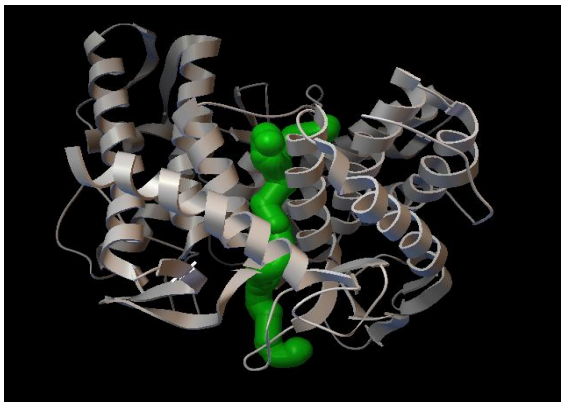


Рис. 12. Система пор внутри гидрофобного ядра молекулы глюкоамилазы

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. 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 сопровождаться изменением соотношения упорядоченных и неупорядоченных участков третичной структуры.

Далее мы применили программу Gramm-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). После загрузки файлов из международной базы данных программа Gramm-X производит докинг-процесс путем многомерного поиска через перемещение и вращение молекул (рис. 13). Таким способом определяются возможные места контактов, далее вычисляются образовавшиеся при контакте связи между группами фермента и коллагена.

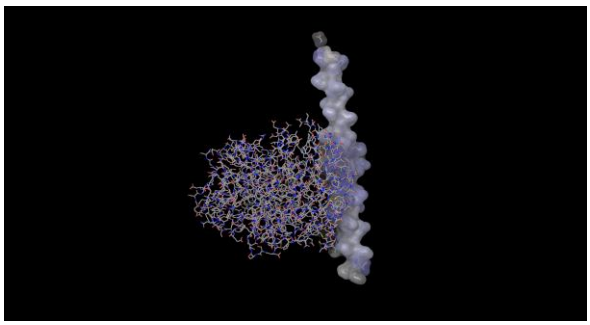


Рис. 13. Пространственная структура глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене

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.

Показано, что молекула глюкоамилазы при адсорбционной иммобилизации присоединяется к коллагену участком, расположенным около входа в полость активного центра (рис. 14).

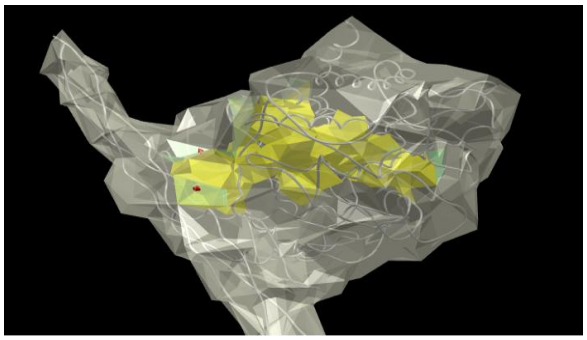


Рис. 14. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген

При этом полость активного центра (рис. 14) изменила свою геометрию по сравнению со свободным ферментом (рис. 10). 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. 15 показана молекулярная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген. Пунктирными линиями выделены связи между атомами носителя и фермента.

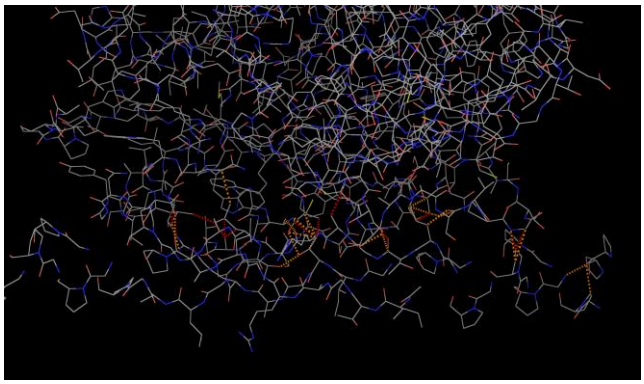


Рис. 15. Пространственная структура комплекса глюкоамилаза-коллаген

Показано, что 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.

Выявлено, что длины связей между ферментом и носителем от 2,15 до 3,4 А, что позволяет отнести их к гидрофобным взаимодействием, «слабым и сильным» водородным связям. Результаты моделирования показывают образование одиночных ионных связей между глюкоамилазой и коллагеном.

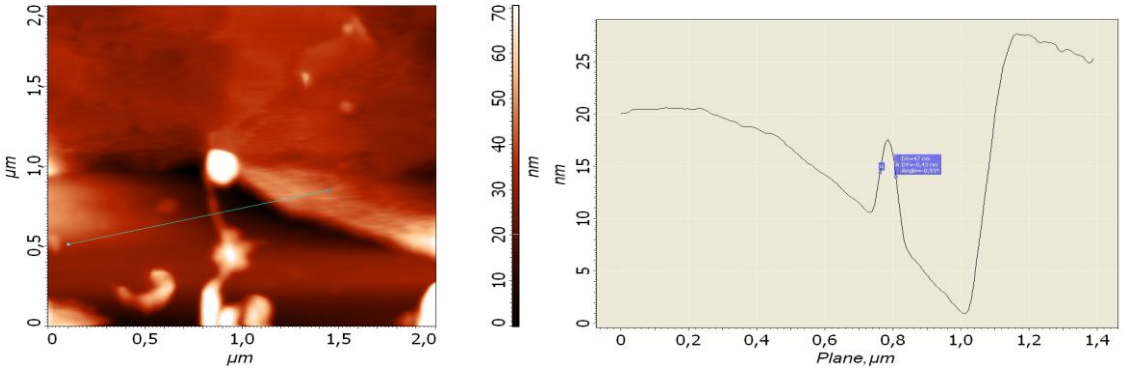
Анализируя результаты компьютерного моделирования (Maestro 9.6, Mole 2.0, Gramm-X), можно прийти к заключению о том, что при адсорбционной

иммобилизации глюкоамилазы на коллагене между носителем и ферментом возникают гидрофобные взаимодействия, «слабые и сильные» водородные связи, а также одиночные ионные связи. При этом происходит достоверное увеличение объемов полостей гидрофобного ядра молекулы глюкоамилазы, в некоторых случаях имеет место увеличение количества полостей.

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.

Глава 7. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ АДСОРБЦИОННЫМ МЕТОДОМ НА УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБКАХ

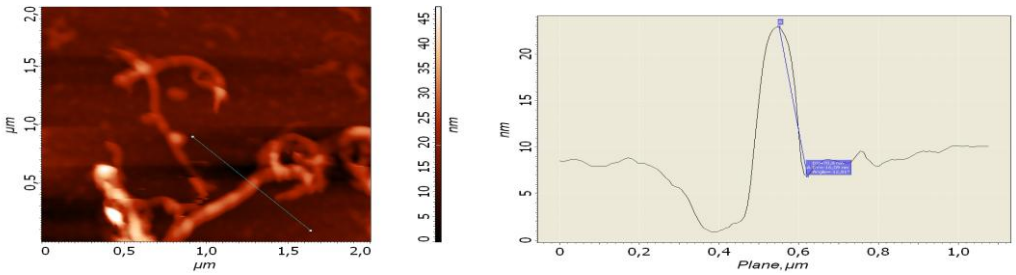
После тщательного анализа носителей кремниевых пластин и УНТ (рис. 16) была осуществлена адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на этих подложках. Установлено, что глюкоамилаза, адсорбционно связанная с углеродными нанотрубками, сохраняет 153 % от каталитической активности нативного энзима. Каталитическая активность свободного фермента составляет 11,3 ед/мг, а иммобилизованного - 17,4 ед/мг.



А Б

Рис. 16. Изображение УНТ на SiO_2-Si (размер кадра 2×2 мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

Анализ АСМ топограмм глюкоамилазы, адсорбционно иммобилизованной на УНТ, показал, что гибридные структуры представляли собой УНТ со связанными на них молекулами фермента. Диаметр УНТ, взаимодействующих с молекулой глюкоамилазы, составляет 15-40 нм, что при сравнении этих значений с размерами немодифицированных УНТ (8-15 нм) и размерами молекулы фермента (≈7нм) является ещё одним подтверждением того, что адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы способствует усложнению структуры УНТ и образованию гибридного комплекса УНТ-глюкоамилаза. При связывании с УНТ глюкоамилаза не изменяет надмолекулярную организацию (рис. 17).



А Б

Рис. 17. Изображение глюкоамилазы и УНТ на SiO_2-Si (размер кадра 2×2 мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

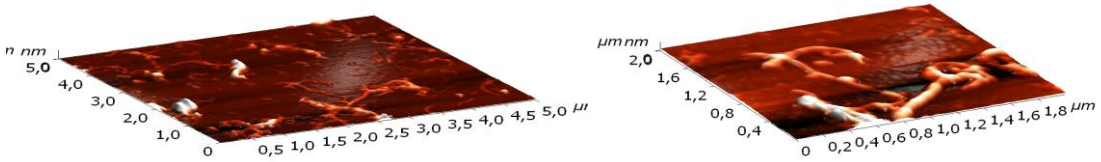


Рис. 18. Трехмерные изображения гибридных наноструктур глюкоамилаза-УНТ-SiO_2-Si: А- (размер кадра 5×5 мкм), Б- (размер кадра 2×2 мкм)

Трехмерные изображения гибридных наноструктур Глюкоамилаза-УНТ-SiO_2-Si позволяют придти к выводу о том, что крупные агрегаты глюкоамилазы наблюдаются с большой частотой именно вблизи УНТ. На фазовом изображении этот эффект наиболее заметен (рис. 18).

В гибридной структуре Глюкоамилаза-УНТ-SiO_2-Si обнаружено увеличение каталитической активности более чем в 1,5 раза по сравнению с нативным ферментом. Зона наибольшей активности лежит в интервале температур 50-85 ^{o}C с максимумом при 80 ^{o}C. Установлено, что для глюкоамилазы, адсорбционно иммобилизованной на УНТ, температурный оптимум реакции гидролиза крахмала смещается в сторону более высоких температур, что на 30 ^{o}C выше по сравнению с нативным энзимом.

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 придти 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 A^3.

Анализируя результаты наших экспериментов и компьютерного моделирования (Maestro 9.6, Mole 2.0, GRAMM-X) можно придти 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 «многоточечные» 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
Образование водородных связей между COOH - и OH - группами альгината натрия и поверхностными аминокислотными остатками (Ser, Thr, Asp, Glu) глюкоамилазы.	Образование водородных связей между OH - группами пектина, целлюлозы и поверхностными аминокислотными остатками (Ser, Thr, Asp, Glu) глюкоамилазы (табл. 11). Гидрофобные взаимодействия образуются между CH_3 группой лигнина и остатками Ala, Val, Leu, Ile фермента.	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 NH_2 – группой (Arg) коллагена.

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/м^2 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ковалева Т.А. Влияние синтетических и природных ингибиторов на физико-химические свойства глюкоамилазы / Т.А. Ковалева, Е.Л. Макарова, А.В. Гладнева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9, вып. 4. – С. 537-544.

2. Ковалева Т.А. Сорбция глюкоамилазы из Aspergillus awamori на коллагене / Т.А. Ковалева, Е.Л. Макарова, Е.В. Короткова // Вестник ВГУ. Серия : Химия. Биология. Фармация.– 2011. – № 1. – С. 32-36.

3. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы из Aspergillus awamori на коллагене / Т.А. Ковалева, Е.Л. Макарова, А.И. Сливкин, Е.В. Короткова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – № 11. – С. 19-22.

4. Воздействие УФ-излучения на физико-химические и функциональные свойства свободной и иммобилизованной глюкоамилазы из Aspergillis awamori / В.Г. Артюхов, Т.А. Ковалева, Е.Л. Макарова, О.М. Кожокина // Радиационная биология. Радиоэкология – 2013. – Т. 53, № 4. – С. 394-400.

5. Иммобилизация гидролаз как один из путей регулирования и стабилизации их активности / М.Г. Холявка, А.С. Беленова, Е.Л. Макарова, Т.А. Ковалева, В.Г. Артюхов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 7. – С. 29-36.

6. Макарова Е.Л. Разработка технологии получения энзимотических препаратов на биополимерах белковой природы / Е.Л. Макарова, Т.А. Ковалева // Материалы IV Международной научной конференции молодых ученых-медиков. – Курск, 2010 . – Т. 1. – С. 221-224.

7. Макарова Е.Л. Исследование сорбционных свойств биополимеров на примере коллагена / Е.Л. Макарова, Т.А. Ковалева // Нано- и супрамолекулярная химия в сорбционных и ионообменных процессах : материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи, Белгород, 14-17 сентября 2010. – Белгород, 2010. – С. 94-98.

8. Макарова Е.Л. Разработка сорбционных материалов для создания препаратов пролонгированного действия / Е.Л. Макарова, Т.А. Ковалева, Е.В. Короткова // Симбиоз Россия 2011: Материалы 4-го Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов, Воронеж, 23-27 мая 2011. – Воронеж, 2011. – Т. 1. – С. 142-145.

9. Макарова Е.Л. Исследование устойчивости глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене в процессе хранения и использования в реакторе периодического действия / Е.Л. Макарова, Т.А. Ковалева, И.В. Петракова // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии : 12 молодежная научная конференция, 11 апр. 2012. — Москва, 2012 .— С. 46-47.

10. Макарова Е.Л. Влияние концентрации водорода на стабильность глюкоамилазы из Aspergillius Awamori, иммобилизованной на коллагене / Е.Л. Макарова // Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы : сборник тезисов Всероссийской школы -семинара для студентов , аспирантов и молодых ученых, 14-17 окт. 2009 , г. Белгород .— Белгород, 2009 .— С. 29-32.

11. Макарова Е.Л. Термостабильность глюкоамилазы из Aspergillius Awamori, иммобилизованной на коллагене / Е.Л. Макарова, Т.А. Ковалева, Е.В. Короткова // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины : материалы 3-й Международной научно –практической конференции, Ростов - на -Дону , 1-4 октября 2009. — Ростов - на -Дону, 2009 .— С. 19-20.

12. Макарова Е.Л. Влияние внешних факторов на стабильность иммобилизованной глюкоамилазы на коллагене / Е.Л. Макарова, Т.А. Ковалева // Медико-биологические и педагогические основы адаптации, спортивной деятельности и здорового образа жизни : сборник научных статей Всероссийской заочной научно –практической конференции с междунароным участием .— Воронеж, 2012 .— С. 273-276.

13. Ковалева Т.А. Исследование термостабильности глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене / Т.А. Ковалева, Е.Л. Макарова // Dny vedy - 2012 : materialy VIII mezinar. vedecko-prakt. konf., 27 brezen-05 dubna 2012 roku.

Dil 76. Biologicke vedy Chemie a chemicka technologie .— Praha, 2012 .— P. 26-29.
14. Ковалева Т.А. Разработка технологии получения фармацевтических препаратов с применением биодеградируемых полимеров / Т.А. Ковалева, Е.Л. Макарова // IV съезд биофизиков России : материалы докл., Нижний Новгород, 20-26 авг. 2012. Симпозиум I : Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток. — Нижний Новгород, 2012 .—— С. 141.
15. Каталитическая активность глюкоамилазы, адсорбированной на углеродных нанотрубках / Е.Л. Макарова, М.И. Черных, Т.А. Ковалева, Л.А. Битюцкая, М.В. Гречкина // Анализ сложных биологических систем. Математические модели субклеточных систем. Радиационная биофизика и спектрофотометрия. Математика. Компьютер. Образование : тезисы 19-ой международной школы-конференции г. Дубна, 30 января - 4 февраля 2012. — Москва ; Ижевск, 2012 .— Вып. 19. – С. 33-34.
16. Ковалева Т.А. Стабилизация глюкоамилазы с помощью адсорбции на коллагене / Т.А. Ковалева, Е.Л. Макарова // Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно- образовательные процессы : Международная научно-методическая конференция, 24-27 июня 2013, Воронеж . — Воронеж, 2013.— С. 55-58.
17. Макарова Е.Л. Разработка биотехнологических способов переработки отходов с целью создания иммобилизованных препаратов / Е.Л. Макарова, Т.А. Ковалева, И.В. Петракова // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии : 13 молодежная научная конференция, Москва, 10 апреля 2013. — Москва, 2013 .– С. 33-34.
18. Макарова Е.Л. Определение срока хранения иммобилизованной глюкоамилазы и использование в реакторе периодического действия / Е.Л. Макарова, Т.А. Ковалева // Dny Vedy-2013 : Materialy 9 mezinarodny vedecko-prakticka konference, 27 brezen-05 dubna 2013 roku .— Praha (Чехия), 2013 .— P. 58-59.
19. Макарова Е.Л. Термоинактивация свободной и иммобилизованной глюкоамилазы из ASPERGILLUS AWAMORI / Е.Л. Макарова, Т.А. Ковалева, И.В. Петракова // Биология - наука 21 века : 17-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых, Пущино, 21-26 апреля 2013 : тезисы докладов. — Пущино, 2013 .— С. 133-134.
20. Исследование пространственной структуры молекулы глюкоамилазы с помощью программы Maestro 9.6 / Т.А. Ковалева, Л.А. Битюцкая, И.И. Долгих, Э.А.Л. Карлос, Е.Л. Макарова // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. Вып. 16. – Воронеж: ВГУ, 2014. – С. 66-70.

Статьи № 1, 2, 3, 4, 5 опубликованы в печатных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ.