

Н.Е. КУЛИКОВА, А.Г. ЧЕРНОБРОВИНА, Н.Н. РОЕВА, О.Ю. ПОПОВА

Изучение некоторых свойств активированного ферментного препарата высокой степени очистки методами спектрального и седиментационного анализов

Как известно, амилолитические ферменты, образуемые различными продуцентами, различаются по своим свойствам и механизму действия. Применение амилазы в промышленных реакциях зависит от ее уникальных свойств, таких как особенность действия, главные и побочные продукты реакции, оптимальная температура и рН среды.

Для получения максимального эффекта от добавления фермента в сырье (сусло, тесто) и выбора оптимальных дозировок, температурных режимов использования и других особенностей применения были изучены некоторые физико-химические свойства ферментного препарата высокой степени очистки.

*Полученные методами спектрального анализа экспериментальные данные об увеличении активности ферментного препарата кристаллической α -амилазы *Asp. oryzae* после тепловой обработки в присутствии ионов кальция и некоторых физико-химических свойствах фермента позволяют предположить наличие связи между повышением каталитической активности указанного препарата после нагревания в оптимальных температурных режимах и происходящими при этом конформационными изменениями в молекуле белка. Таким образом, создаются условия, способствующие возникновению наиболее эффективного индуцированного соответствия фермента и субстрата, результат которого проявляется в увеличении ферментативной активности.*

*Ключевые слова: кристаллическая α -амилаза *Aspergillus oryzae*, ферментный препарат, спектр люминесценции, спектр поглощения, ферментативная активность.*

Study of some properties of an activated enzyme preparation of a high degree of purification by methods of spectral and sedimentation analyses. N.E. KULIKOVA, A.G. CHERNOBROVINA, N.N. ROEVA, O.Yu. POPOVA (Moscow State University of Food Production, Moscow).

As is known, amylolytic enzymes formed by different producers differ in their properties and action mechanisms. The use of amylase in industrial reactions depends on its unique features, such as its action feature, the main and by-products of the reaction, the optimal temperature and pH of the medium.

To obtain the maximum effect from the addition of the enzyme to the raw materials (wort, dough) and the choice of optimal dosages, temperature conditions of use, and other application features, some physicochemical properties of the high-purity enzyme preparation were studied.

*The obtained experimental data on the increase in the activity of the enzyme preparation of crystalline α -amylase *Asp. oryzae* after heat treatment in the presence of calcium ions and some physicochemical properties of the enzyme by spectral analysis methods suggest a connection between the increase in catalytic activity after heating in optimal temperature conditions and the conformational changes in the protein molecule that occur during this process. Thus, conditions are created that contribute to the emergence of the most effective induced correspondence of the enzyme and the substrate, the result of which is manifested in an increase in enzymatic activity.*

*КУЛИКОВА Наталия Евгеньевна – кандидат технических наук, доцент, ЧЕРНОБРОВИНА Антонина Григорьевна – кандидат технических наук, доцент, РОЕВА Наталья Николаевна – доктор химических наук, профессор, ПОПОВА Ольга Юрьевна – преподаватель (Московский государственный университет пищевых производств, Москва). *E-mail: nataliyakulikova67@mail.ru

Введение

В последнее время для выяснения структуры биополимеров все большее применение находят методы, основанные на изучении спектров люминесценции [1, 10, 15, 19]. Особое значение люминесценции как метода исследования обусловлено тем, что способностью люминесцировать в растворах (или в парах) обладают только ароматические или гетероциклические молекулы.

В составе белков ферментов имеются остатки гетероциклических аминокислот триптофана и тирозина [2, 15, 19]. Кроме того, гетероциклическими являются большинство коферментов.

Обращает на себя внимание способность различных белков в водном растворе к существованию в двух или трех различающихся конформациях нативной макромолекулы, переходящих друг в друга при характерных для каждого белка температурах [1, 2, 15]. Наблюдаемые при этом структурные переходы во многих случаях не приводят к инактивации фермента, хотя могут сопровождаться изменением количественного соотношения функциональных групп в макромолекуле белка [3, 23, 24].

Эффективными при изучении конформационных свойств белков являются оптические методы и методы спектрополяриметрии [1, 10, 11, 15, 19, 22, 28].

Конформационные переходы в белках обнаруживаются и при наблюдении интенсивности и поляризации люминесценции.

При неблагоприятных условиях происходят денатурация и инактивация фермента. Денатурацию вызывают различные агенты и факторы: нагрев, ультрафиолетовое излучение, органические растворители и т.д. [7, 21, 33].

В то же время существует много разнообразных факторов, стабилизирующих молекулу белка, и в частности фермента. Среди них можно отметить воздействия физического и физико-химического характера. Сюда относится изменение температуры и pH среды, приводящее белок к точке наибольшей устойчивости; денатурационная стабилизация – изменение конформации белка, возникающее под влиянием денатурирующего агента и обуславливающее повышение стабильности макроструктуры; повышение давления в определенных пределах; и т.д. К воздействиям химического характера относятся специфическое действие некоторых ионов металлов, влияние субстрата, продуктов реакции, коферментов, минеральных солей, углеводов и олигосахаридов [8, 9, 11, 12, 29].

Альфа-амилаза – ферментный препарат микробного происхождения, который оказывает комплексное воздействие на крахмалосодержащее сырье. В частности, фермент α -амилаза уменьшает вязкость крахмала и катализирует процесс преобразования его в глюкозу. Наиболее востребованным препарат является при производстве спирта и хлебобулочных изделий [9, 13, 16, 17, 21, 22, 24]. Основными продуцентами α -амилаз являются грибы рода *Aspergillus*, которые обладают способностью к чрезвычайно подвижному обмену, способны синтезировать как отдельные ферменты, так и их комплексы [14, 16, 18, 24].

Данная работа посвящена изучению некоторых свойств активированного ферментного препарата высокой степени очистки методами спектрального и седиментационного анализов.

Объекты и методы исследования

Объектом послужил ферментный препарат – кристаллическая α -амилаза *Aspergillus oryzae*. Данный препарат является опытным образцом (поэтому штамм не указывается) и проходит апробацию для использования в пищевой промышленности.

Амилолитическую активность (АС) определяли методом, основанным на фотоэлектроколориметрировании окраски йодокрахмального комплекса при длине волны 656 нм. За единицу амилолитической активности принималось такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 г растворимого крахмала в строго определенных стандартных условиях: температура 30 °С, время гидролиза – 60 мин; рН раствора для грибных препаратов 4,7; соотношение в реакционной смеси фермент–субстрат должно быть постоянным и обеспечивать гидролиз крахмала на 30 % за 10 мин. Амилолитическая активность рассчитывалась по эмпирическим формулам¹. Поскольку препарат является опытной наработкой и кристаллическое состояние фермента еще не является доказательством его гомогенности, были проведены опыты по установлению степени чистоты α -амилазы *Asp. oryzae*. Для этого использовались методы электрофореза в полиакриламидном геле и ультрацентрифугирования [25, 26].

Метод вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с концентрацией акриламида 7,5 % позволяет получать достаточно четкое разделение белковых фракций [6]. Для дискового электрофореза использовались стеклянные трубки длиной 70 мм с внутренним диаметром 6 мм, в которые сначала заливали мелкопористый гель до высоты 40 мм, после его полимеризации наносили слой (15 мм) крупнопористого антиконвекционного геля.

Полимеризацию этих двух гелей проводили на расстоянии 8–10 см от лампы дневного света в течение 10–15 мин. На столбик антиконвекционного геля помещали крупнопористый гель, содержащий исследуемый ферментный препарат. Трубки укрепляли вертикально в отверстиях дна верхнего резервуара так, чтобы их концы погружались на 10 мм в нижний резервуар. Резервуары заполняли трис-глицериновым буфером рН 8,3 (0,0005 М трис (гидроксиметил) аминметан и 0,037 М глицин).

В качестве свидетеля в верхний резервуар добавляли несколько капель 0,001%-го бромфенолового синего красителя, растворенного в дистиллированной воде. На каждую трубку подавали ток 2,5 мА при начальном напряжении 50 В. Электрофорез заканчивали, когда полоса красителя подходила к нижнему краю геля, что занимало около 45 мин.

Столбики геля извлекали из трубок, подвергали фиксации и окраске в течение 1 ч в растворе 0,5%-го амидо-черного красителя в 75%-й уксусной кислоте. Не связанный белком краситель удаляли электрофоретически в аналогичном аппарате в 7%-й уксусной кислоте (ток 12 мА на каждую трубку при нагревании 150 В). По количеству полос, проявленных на геле, судили о степени чистоты препарата.

Ультрацентрифугирование проводили на ультрацентрифуге фирмы Beckman (США) при следующих условиях: скорость вращения ротора – 56 000 об/мин; температура раствора – 20 °С. Седиментационная картина фиксировалась через каждые 16 мин. Коэффициенты седиментации определяли по эмпирическим формулам и выражали в сведбергах (Св): 1 св = 10⁻¹³ с. По количеству пиков на седиментограмме судили о степени чистоты кристаллического препарата [5, 6, 20, 30].

Результаты и обсуждение

Как при электрофорезе, так и при ультрацентрифугировании разделения ферментного препарата на отдельные белки не произошло: электрофореграмма содержала только одну полосу, а седиментограмма – только один пик. Исследования показали, что степень белковой чистоты препарата составляет 95 %. Кроме того, кристаллическая α -амилаза обладала высокой амилолитической (20 000 ед. АС/г) и осаживающей (500 ед. ОС/г) активностью.

Таким образом, можно считать, что исследуемый ферментный препарат является гомогенной высокоочищенной α -амилазой.

¹ ГОСТ 34440-2018. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилолитической активности. 19 с

Амилолитические ферментные препараты микробного происхождения получают при культивировании специфических микроорганизмов, способных вырабатывать определенные ферменты. В нашем случае продуцентом α -амилазы являлись плесневые грибы *Aspergillus oryzae* [16, 20, 23].

Как известно, амилолитические ферменты, образуемые различными продуцентами, различаются по своим свойствам и механизму действия [14, 18, 20]. Применение амилазы в промышленных реакциях зависит от ее уникальных свойств, таких как особенность действия, главные и побочные продукты реакции, оптимальная температура и pH среды [4, 7–9, 12, 21, 27, 29]. Ферментный препарат полностью безопасен в применении и безвреден для здоровья человека – альфа-амилаза вырабатывается во всех живых организмах. Он имеет высокую активность и длительный срок хранения [4, 10, 13, 18].

Для получения максимального эффекта от добавления фермента в сырье (сусло, тесто) и выбора оптимальных дозировок, температурных режимов использования и других особенностей применения необходимо изучить некоторые физико-химические свойства ферментного препарата.

Удешевления целевых продуктов, полученных с применением ферментных препаратов, можно достичь путем снижения дозировки вносимого фермента без ухудшения качества получаемой продукции. К одним из основных факторов, влияющих на активность ферментных препаратов, относится температура. Повышение температуры приводит к увеличению скорости ферментативных реакций, однако при этом также увеличивается скорость инактивации фермента [4, 8, 21, 27, 29]. С целью увеличения термостойкости ферментного препарата было изучено влияние ионов кальция в качестве стабилизатора раствора кристаллической α -амилазы. Выбор данного стабилизатора обусловлен тем, что характерной особенностью α -амилаз является наличие в их молекуле ионов кальция, которые, стабилизируя вторичную и третичную структуры молекулы фермента, предохраняют их от денатурации, в том числе тепловой [3, 4, 24, 31, 32].

Предварительный прогрев 0,1%-х водных растворов ферментного препарата проводили в ультратермостате при различных температурах (40, 45, 50, 60, 700 °C) в течение 10, 30 и 60 мин. В прогреваемую смесь добавляли 0,1%-й водный раствор хлористого кальция, 0,1%-й раствор растворимого крахмала. Активность прогретого раствора ферментного препарата выражали в процентах от активности препарата, не подвергавшегося тепловой обработке [19].

Исследование термостабильности позволило установить, что инактивация α -амилазы *Asp. oryzae* наступает после прогрева препарата при 70 °C в течение 40 мин. После 10-минутного нагревания α -амилазы *Asp. oryzae* при 40 °C и 30-минутного – при 50 °C наблюдается повышение активности на 20–25 %. При добавлении к раствору фермента стабилизатора (ионов кальция) ферментативная активность увеличивается в среднем на 40–45 %. Этот прирост активности остается постоянным в течение 3 ч.

С целью изучения влияния тепловой обработки препарата кристаллической α -амилазы на структурные изменения молекулы фермента были получены спектры люминесценции и поглощения растворов α -амилазы, прогретой в присутствии стабилизатора и без него.

Согласно полученным данным, все три раствора при длине волны возбуждающего света 280 нм имели максимум люминесценции при длине волны излучаемого света 335 нм. Изменение интенсивности излучения показано в таблице.

Данные таблицы свидетельствуют о том, что рост ферментативной активности при нагреве раствора исследуемого ферментного препарата соответствует увеличению интенсивности люминесценции, т.е. существует корреляция между ферментативной активностью α -амилазы и интенсивностью люминесценции.

Наблюдались различия в поведении растворов в полосе возбуждения: в растворе прогретой α -амилазы замечено легкое помутнение, что можно объяснить частичной денатурацией белка (рис. 1). В растворах α -амилазы, прогретых в присутствии ионов кальция, помутнение заметно снижается, что означает уменьшение эффекта денатурации.

**Данные спектрального и седиментационного анализов
препарата кристаллической α -амилазы *Asp. oryzae***

Вариант опытов	ФА, %	Интенсивность люминесценции, %	D_{260} / D_{280}	Коэффициент седиментации, Св
Непрогретая α -амилаза	100	100	0,450	2,71
Прогретая α -амилаза	120–125	108–110	0,501	2,55
Прогретая в присутствии $CaCl_2$ α -амилаза	140–145	120–124	0,460	2,62

В связи с тем что колебание интенсивности люминесценции белка может быть вызвано изменением взаимного расположения остатков триптофана и тирозина, полученные данные позволяют предположить, что при нагревании происходят конформационные изменения белка, которые приводят к увеличению или уменьшению интенсивности люминесцентного излучения [1, 19].

Важной оптической характеристикой вещества кроме молярного коэффициента поглощения является индекс поглощения 1%-го раствора вещества в полосе поглощения ультрафиолетовой или видимой области спектра (200–320 нм) [1, 11].

Методика определения индекса поглощения 1%-го раствора α -амилазы состояла в следующем: в опытах готовили растворы кристаллической α -амилазы точно известной концентрации. Навеску вещества, взятую на аналитических весах, растворяли ацетатным буфером pH 5,0. Спектр поглощения приготовленных растворов получали на приборе Spesord, причем концентрация белка в растворе подбиралась такой, чтобы оптическая плотность раствора в полосе поглощения находилась в области, близкой к единице оптической плотности (0,3–1,2 единиц оптической плотности).

Путем подбора концентрации выяснилось, что этому условию удовлетворяет концентрация белка, равная 1,0 мг/мл. Поглощение при этом составило 1,23 ед. оптической плотности, а максимальное поглощение раствора кристаллической α -амилазы наблюдалось при длине волны 280 нм (рис. 2).

Аналогичным образом были приготовлены растворы требуемой концентрации и в тех же условиях сняты спектры поглощения в интервале длин волн 260–300 нм. Оптическую плотность этих растворов при длине волны 280 нм приводили к оптической плотности 1%-го раствора, увеличивая значения D_{280} в 10 раз. Полученный таким образом индекс поглощения 1%-го раствора кристаллической α -амилазы составляет 12,3 ед. оптической плотности.

С другой стороны, индекс поглощения 1%-го раствора кристаллической α -амилазы, полученный путем определения оптической плотности 0,02%-го раствора фермента при D_{280} (рис. 3) и увеличением этой величины в 50 раз, составил 12,5 ед. оптической плотности. Таким образом, значения индексов поглощения практически совпадают.

При снятии спектров поглощения для всех исследуемых растворов максимум поглощения наблюдается при длине волны 280 нм (рис. 2).

Эффект денатурации можно охарактеризовать в спектрах поглощения отношением D_{260} / D_{280} , чем больше эта величина, тем больше денатурационный эффект. Отношение D_{260} / D_{280} для исследуемых растворов представлено в таблице. Наименьший денатурационный эффект наблюдается у нативной амилазы, при прогреве раствора денатурация увеличивается. Прогрев раствора α -амилазы в присутствии ионов Ca^{2+} приводит к снижению денатурации.

Анализируя спектры люминесценции и спектры поглощения, можно отметить, что наряду со структурными изменениями в молекуле прогретой α -амилазы, приводящими к увеличению ее ферментативной активности, вероятно, происходит частичная денатурация фермента, вследствие которой активация проявляется не в полной мере. С другой стороны, прогрев раствора α -амилазы в присутствии солей хлорида кальция препятствует

Рис. 1. Спектры люминесценции: 1 – нативный раствор α -амилазы, 2 – прогретый раствор α -амилазы, 3 – прогретый с CaCl_2 раствор α -амилазы; J – интенсивность излучения, λ – длина волны, нм

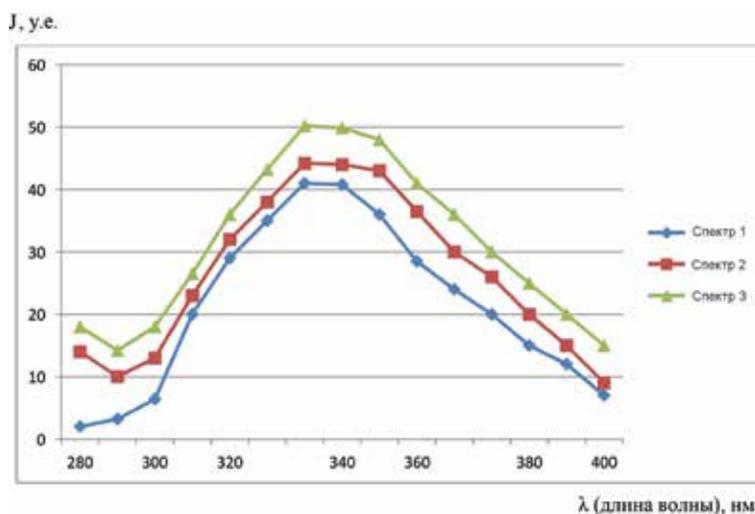


Рис. 2. Спектры поглощения: спектр 1 – нативный раствор α -амилазы; спектр 2 – прогретый раствор α -амилазы; спектр 3 – прогретый с CaCl_2 раствор α -амилазы

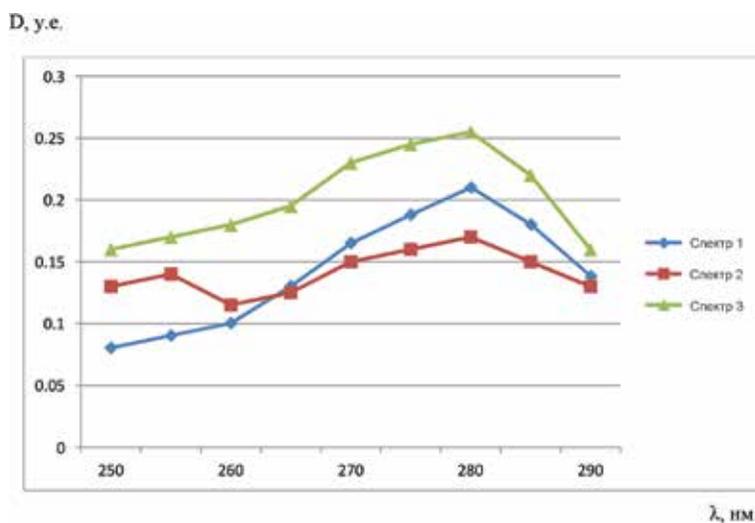
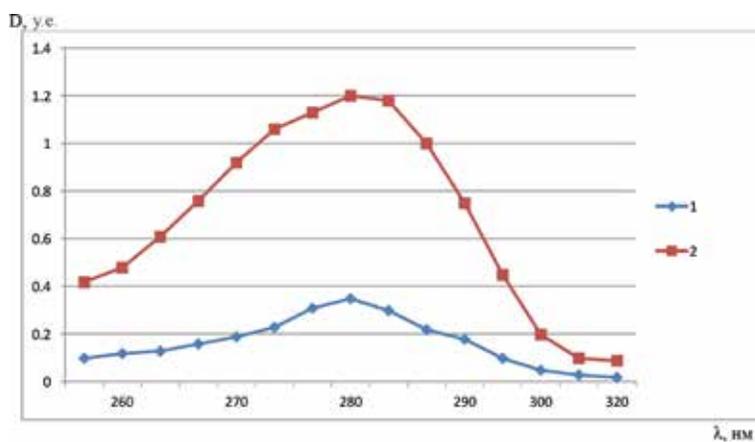


Рис. 3. Определение индекса поглощения: 1 – спектр поглощения 0,1%-го раствора препарата, 2 – спектр поглощения 0,02%-го раствора препарата



его денатурации, так как ионы кальция оказывают стабилизирующее воздействие на молекулу фермента.

Одним из распространенных методов изучения структуры биополимеров является метод ультрацентрифугирования, который дает возможность исследовать седиментационные свойства белка. Ультрацентрифугирование также позволяет на основании различной скорости седиментации белков испытывать белковые препараты на однородность в отношении размеров их частиц [25, 26].

Молекулярная масса белка пропорциональна его коэффициенту седиментации, коэффициенту диффузии и плотности. Измерив в независимых опытах коэффициент диффузии и плотность, можно вычислить молекулярную массу. Поскольку наибольшие трудности вызывает измерение коэффициента диффузии, нередко ограничиваются указанием только коэффициента седиментации белка [6].

Согласно полученным данным (см. таблицу), разница в значениях коэффициента седиментации была в пределах погрешности определения. Таким образом, предположение о том, что тепловая обработка α -амилазы *Asp. oryzae* будет влиять на коэффициент седиментации, не нашло экспериментального подтверждения. Тем не менее полученные данные являются одной из характеристик препарата.

Полученные экспериментальные данные об увеличении активности ферментного препарата кристаллической α -амилазы *Asp. oryzae* после тепловой обработки в присутствии ионов кальция и изучения некоторых физико-химических свойств фермента позволяют предположить наличие связи между повышением каталитической активности после нагревания в оптимальных температурных режимах и происходящими при этом конформационными изменениями в молекуле белка. Наблюдаемые физико-химические изменения, происходящие в молекулярной структуре клеток, отражаются на их спектральных характеристиках, регистрируемых с помощью методов люминесцентного спектрального анализа.

Это приводит к созданию условий, способствующих возникновению наиболее эффективного индуцированного соответствия фермента и субстрата, результат которого проявляется в увеличении ферментативной активности, что позволит в дальнейшем дать рекомендации по оптимальным режимам применения данного ферментного препарата в различных областях пищевой промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова И.М. Научное обоснование методологии комплексного контроля спиртового и ликероводочного производства с целью повышения качества и безопасности алкогольной продукции. М.: Всерос. науч.-исслед. ин-т пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности РАСХН, 2014. 52 с.
2. Акчурина С.В. Перспективные направления использования в ветеринарной медицине люминесцентного спектрального анализа // Докл. ТСХА: сб. статей. 2019. Вып. 292, ч. 4. С. 573.
3. Алеева С.В., Кокшаров С.А. Исследование температурной зависимости каталитической активности полиферментных амилолитических препаратов // Изв. высш. учеб. заведений. Химия и химическая технология. 2005. Т. 48, № 2. С. 49–53.
4. Белогорцев Ю.А., Черныгина Т.Б., Быкова О.Н. Некоторые физико-химические свойства бактериальной β -глюканазы // Фермент. и спиртовая пром-сть. 2008. № 3. С. 35–37.
5. Бердникова Д.В., Королева М.Ю., Спицын Б.В. Седиментационный анализ дисперсий наноалмаза // Успехи в химии и химической технологии. 2007. Т. 21, № 8 (76). С. 53–56.
6. Бридский Е.В., Мякишев А.М. Седиментационный анализ. Кривые седиментации монодисперсных и полидисперсных систем // Молодежь и XXI век. 2019. С. 14–17.
7. Гамаюрова В.С., Зиновьева М.С., Васина К.Л. Активация и стабилизация ферментных препаратов неорганическими соединениями // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2009. № 6. С. 121–130.
8. Гамаюрова В.С. Методы активизации амилолитических ферментов с целью снижения их удельного расхода // Современные ресурсо- и энергосберегающие технологии в спиртовой и ликероводочной промышленности: тез. докл. науч.-практ. конф., 17–18 марта 2000 г. Казань, 2000. С. 35.
9. Голёта М.В. Влияние физических факторов и pH среды на активность амилолитических и протеолитических ферментов при производстве солода // Биотехнология: достижения и перспективы развития: материалы II Междунар. науч.-практ. конф. 07–08 декабря 2017 г. Пинск, 2017. С. 5–6.

10. Горбунков М.В. Физико-химические свойства протеолитического комплекса и применение ферментного препарата «Протепсин» для обработки сырья животного происхождения: дис. ... канд. техн. наук. Воронеж. гос. ун-т инж. технологий, 2016. 22 с.
11. Дьяконова Г.В. Исследование некоторых физико-химических свойств молокосвертывающих ферментов вешенки обыкновенной. Ростов-н/Д., 2010. 44 с.
12. Зиновьева М.Е., Закиуллин И.И., Курбанов С.М. Изучение процессов активации целлюлолитических ферментов // Пищевые технологии и биотехнологии: материалы XVI Всерос. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов с междунар. участием, посвящ. 150-летию Периодической таблицы химических элементов: в 3 ч. Казань, 16–19 апреля 2019. С. 315–317.
13. Иванов С.В., Шиян П.Л., Мудрак Т.Е., Ковальчук С.С. Ресурсосберегающие технологии подготовки крахмалсодержащего сырья к сбраживанию // Хранение и переработка сельхозсырья. 2015. № 1. С. 24–28.
14. Кабанов А.В., Горбатовская Н.А., Шлейкин А.Г. Структура и субстратная специфичность амилаз грибов рода *Aspergillus* // Механика и технологии. 2014. № 2. С. 47–56.
15. Карпенко Д.В., Шалагинов К.В. Влияние волновых воздействий на активность амилаз микробного происхождения // Здоровье, питание и биотехнология (Health, food and biotechnology). 2019. Т. 1, № 1. С. 83–91.
16. Качан А.В., Русь О.Б., Евтушенков А.Н. Селекция микробных продуцентов α -амилазы и глюкоамилазы // Вестн. БГУ. 2016. Сер. 2, № 3. Р. 92–97.
17. Колупаева Т., Клевцев М. Амилолитические ферменты в производстве пшеничного хлеба // Хлебопродукты. 2010. № 5. С. 39–41.
18. Костылева Е.В. и др. Разработка схем индуцированного мутагенеза для повышения продуктивности штаммов рода *Aspergillus*-продуцентов амилолитических ферментов // Микробиология. 2017. Т. 86, № 4. С. 483–493.
19. Куликова Н.Е. и др. Исследования конформационных изменений в молекуле фермента под действием тепловой обработки в присутствии ионов некоторых металлов // Вестн. ДВО РАН. 2020. № 5. С. 133–137.
20. Польшалина Г.В., Чердниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов: справочник. М.: ДеЛи принт, 2003. 375 с.
21. Поляков В.А., Римарева Л.В. Перспективные ферментные препараты и особенности их применения в спиртовой промышленности // Пиво и напитки. 2012. № 2. С. 52–55.
22. Распопова Е.А., Красноштанова А.А. Характеристика свойств и оценка эффективности биокатализатора на основе иммобилизованной грибной амилазы // Катализ в промышленности. 2015. № 5. С. 54–59.
23. Римарева Л.В., Серба Е.М., Оверченко М.Б., Рачков К.В., Орлова Е.В., Абрамова И.М. Использование биомассы гриба *Aspergillus oryzae* в качестве источника биологически активных веществ // Продукты питания и переработка сельхозсырья. 2012. № 9. С. 46–50.
24. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Серба Е.М., Игнатова Н.И. Ферментные препараты и их влияние на биокаталитические процессы глубокой переработки зернового сырья, технологические показатели зернового сула, процессы генерации дрожжей и спиртовое брожение // Современные биотехнологические процессы, оборудование и методы контроля в производстве спирта и ликероводочных изделий. М., 2015. С. 10–27.
25. Спутьник С.В., Гусаров А.А., Перельман М.В. Способ определения фенотипов гаптоглобина в жидкой крови и в пятнах крови методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле: метод. рекомендации. М.: Корина-офсет, 2012. 16 с.
26. Стручкова И.В., Кальясова Е.А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле // Нижний Новгород: Нижегород. госуниверситет, 2012. 60 с.
27. Стурова Ю.Г., Кригер А.В., Жидких К.В. Факторы, влияющие на активность ферментных препаратов животного происхождения // Сыроделие и маслоделие. 2014. № 3. С. 47–49.
28. Сутормин О.С., Суковатая И.Е., Кратасюк В.А. Спектры флуоресценции ферментов биолюминесцентной реакции бактерий в вязких средах // Изв. Иркут. гос. ун-та. Серия: Биология. Экология. 2014. Т. 7. С. 20–25.
29. Ташмухамедова Ш.С., Сотвалдиева Д.М. Стабилизация амилолитических ферментов в системах с твердыми фазами // Вестн. КазНУ. Серия биол. 2013. Т. 59, № 3/1. С. 183–185.
30. Тertyшный В.А., Тertyшный А.М. Сравнение методов седиментации высокодисперсных систем // Вісн. Націон. тех. ун-т України; Київський політех. ін-т. Серія: Радіотехніка. Радіоапаробудування. 2013. № 53. С. 68–72.
31. Шишкин А.С. Разработка модели процесса седиментационного анализа: дис. ... канд. техн. наук. Екатеринбург: Урал. гос. техн. ун-т, 2004. 20 с.
32. Baldrian P., Gabriel J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium // FEMS Microbiology Letters. 2013. Vol. 220, N 2. P. 235–240.
33. Bialasiewicz D. Wplyw obnizenia temperatury na aktywnosc enzymow hydrolitycznych *Geotrichum candidum* Link // Przem. spoz. 2017. Vol. 51, N 2. P. 34–36.