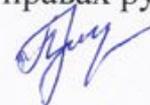


На правах рукописи



Приворотская Елизавета Александровна

**Получение стабилизированных форм
гидролитических ферментов технического и
фармацевтического назначения**

Специальность: 03.01.06 – Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва -2017

Работа выполнена на кафедре биотехнологии Российского химико-технологического университета имени Д. И. Менделеева

Научный руководитель доктор химических наук, доцент
Красноштанова Алла Альбертовна
профессор кафедры биотехнологии Российского хими-
ко-технологического университета им. Д.И. Менделеева

Официальные оппоненты доктор химических наук, доцент
Понаморева Ольга Николаевна
заведующая кафедрой биотехнологии Федерального госу-
дарственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Тульский государственный универ-
ситет»

кандидат химических наук
Балабушевич Надежда Георгиевна
старший научный сотрудник кафедры химической энзимо-
логии химического факультета Федерального государствен-
ного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова»

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образова-
тельное учреждение высшего образования «Воронеж-
ский университет инженерных технологий»

Защита состоится «31» января 2018 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета
Д 999.095.03 при РХТУ им. Д.И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в
конференц-зале ауд. 443.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ
им. Д.И. Менделеева и на официальном сайте diss.muctr.ru/author/204.

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д999.095.03

_____ Шакир И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

В соответствии с программой развития биотехнологий РФ в период до 2020 года одним из приоритетных направлений является создание препаратов на основе ферментов, биосовместимых полимеров, экологически чистых материалов с высокой степенью сохранения активности и стабильности.

Уникальная специфичность ферментов делает биокаталитические процессы более технологичными по сравнению с химическими. Наиболее широкое применение нашли гидролитические ферменты. В настоящее время ферментные препараты (ФП) на основе гидролитических ферментов все шире применяются в фармацевтических производствах, медицине, пищевой и химической промышленности. Практическое применение протеолитических ферментов разнообразно, наиболее значимо их использование в хирургии для лечения раневых поверхностей различной этиологии, что обусловлено локальностью действия: быстрым отторжением нежизнеспособных тканей, без воздействия при этом на здоровые участки [Белов А.А., 2009; Юданова Т.Н., 2004]. В современной медицинской практике успешно применяются полиферментные препараты, в состав которых, помимо протеаз, входят амилолитические и липолитические ферменты. Такие препараты обладают противовоспалительным, анальгезирующим действием, фибринолитическим и антиагрегантным эффектом, а также иммуномодулирующей способностью [Ефименко Н.А., 2011; Толстых М.П., 2004; Eriksson E. и др., 2000]. Также амилазы и липазы применяются в пищевой, химической и др. отраслях промышленности, для создания новых био- и энергоресурсов (производство биотоплива) [Шнайдер К.Л., 2009; Гарабаджиу А.В., 2010].

Промышленно выпускаемые препараты гидролаз медицинского назначения такие, как Мультиферм, ПАМ-ТЛ, Протеокс-ТМ и др. достаточно широко известны и востребованы в качестве эффективных раневых покрытий [Романовская И.И., 2009]. Однако срок их действия не превышает 48 часов, в них отсутствуют иммуностимулирующие и смягчающие агенты. Поэтому остается актуальным вопрос о повышении эффективности ферментных препаратов, увеличении сроков их хранения, многократном использовании и повышении качества.

Одним из путей повышения эффективности ферментных препаратов является их иммобилизация на природные и синтетические носители.

Природные полимеры в качестве носителей для иммобилизации имеют ряд преимуществ в сравнении с синтетическими (органическими и неорганическими). В отличие от синтетических природные полимеры экологически безопасны и не токсичны. Такие полимеры, как хитозан, альгинат натрия обладают функциональной физиологической активностью, необходимой в медицинской практике [Жоголев К.Н., 2000].

В связи с этим актуально изучение физико-химических и термодинамических свойств нативных и иммобилизованных гидролаз, оценка эффективности различных методов иммобилизации, подбор условий и носителей, выбор способов повышения стабильности ферментных препаратов, используемых в промышленности.

Цели и задачи исследований

Целью работы является разработка стабилизированных форм гидролитических ферментов, способных найти применение в технических и фармацевтических целях, а также оценка их эффективности на основе анализа их кинетических и термодинамических параметров.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- провести оценку кинетических и термодинамических параметров нативных гидролитических ферментов (трипсина крупного рогатого скота (КРС), протеолитического комплекса (ПК) из гепатопанкреаса краба, пан-креатической липазы и амилазы гриба *Aspergillus oryzae*);

- научно обосновать выбор носителей, оптимальных условий и метода иммобилизации гидролаз;

- исследовать влияние типа носителя на функциональную, операционную, конформационную стабильность и стабильность при хранении гидролитических ферментов путем сравнения их кинетических и термодинамических параметров и обосновать выбор наиболее эффективных форм препаратов гидролаз;

- оценить эффективность практического применения подобранных иммобилизованных препаратов гидролаз.

Научная новизна.

Разработаны гетерогенные биокатализаторы на основе гидролитических ферментов (трипсина КРС, протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба, липазы КРС и амилазы гриба *Aspergillus oryzae*), иммобилизованных на целлюлозе, диальдегидцеллюлозе, альгинате натрия, хитозане, а также микрокапсулированные в гель на основе хитозана и альгината натрия.

Получены основные термодинамические и кинетические параметры иммобилизованных и нативных форм гидролаз. Установлено, что иммобилизация на природные носители (целлюлозу, хитозан, альгинат натрия) приводит к снижению ферментативной активности исследованных гидролаз не более, чем на 5-15% в сравнении с нативными, тогда как иммобилизация на синтетические носители вызывает снижение ферментативной активности на 30-50%. Найдены общие для всех исследованных гидролаз закономерности по влиянию иммобилизации на стабильность ферментов. Показано, что иммобилизация способствует повышению операционной, функциональной, конформационной стабильности и стабильности при хранении гидролитических ферментов.

Установлено, что наиболее высокой каталитической активностью обладают: иммобилизованные на хитозансодержащей целлюлозе трипсин и ПК; иммобилизованная на хитозансодержащей целлюлозе амилаза; микрокапсулированная в альгинатный гель липаза. На основе анализа кинетических характеристик установлено повышение стабильности при хранении протеолитических ферментов (ПК и трипсина), иммобилизованных на целлюлозные носители в присутствии 5% глицерина и 0,2% витаминов (аскорутин и С) в 2 раза, что позволяет создавать эффективные перевязочные материалы пролонгированного действия (до 72 ч), обладающие атравматичностью. Исследована динамика высвобождения фермента в раневую среду, что позволяет прогнозировать величину его пролонгированного действия.

Теоретическая и практическая значимость.

На примере трипсина, ПК, амилазы и липазы научно обоснован выбор наиболее эффективных метода, носителя, условий иммобилизации гидролитических ферментов. Получены кинетические и термодинамические параметры иммобилизованных форм гидролаз, проведено их сравнение с соответствующими параметрами нативных гидролаз. На основе анализа полученных экспериментальных и расчётных данных доказано преимущество полисахаридных носителей для иммобилизации в сравнении с синтетическими.

Разработан новый вариант комплексного атравматичного раневого покрытия пролонгированного действия, включающего протеолитический фермент (комплекс ПК или трипсин), 5% глицерина и 0,2% витамина С или аскорутин (в расчете на витамин С).

Даны рекомендации по условиям гидролиза субстратов, используемых в промышленности (ячменного солода и жиросодержащих отходов) наиболее эффективными препаратами, соответственно, грибной амилазы, иммобилизованной на хитозансодержащей целлюлозе, и панкреатической липазы, иммобилизованной в хитозан-альгинатные микрочастицы. Показано, что применение иммобилизованных ферментных препаратов позволяет повысить выход продуктов гидролиза в 1,3-1,5 раз по сравнению с нативными формами.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена с использованием современных методов биотехнологии, препаративной и аналитической химии. Полученные результаты подтверждены многочисленными экспериментами и обработаны с использованием современных методов статистического анализа.

Обработку результатов экспериментов (с числом повторов ≥ 3) проводили статистическим методом анализа и обработки данных – методом определения грубых ошибок («промахов»).

Материалы диссертации были доложены на 7-ом и 8-ом Московском Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, март 2013 г, март 2014 г, март 2015 г), 13-ой Ежегодной Международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, октября 2013 г), 5-ой международной научно-практической конференции «Современные достижения биотехнологии. Актуальные проблемы молочного дела» (Ставрополь, сентябрь 2015 г), научно-практической конференции «Современные проблемы химической технологии БАВ» (Москва, май 2016 г).

Публикации: по теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах, рецензируемых ВАК, и 8 материалов научных конференций.

Структура и объем работы: диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальной части, включающей описание результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы (246 наименований, в том числе 98 на иностранных языках) и 1 приложения. Работа изложена на 170 стр. машинописного текста и содержит 27 таблиц и 44 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

В обзоре литературы представлены характеристики свойств и практического значения гидролитических ферментов, путей повышения стабильности ферментов, методов их иммобилизации; дана характеристика свойств природных полисахаридов, используемых в качестве носителей для иммобилизации гидролаз, а также области применения иммобилизованных препаратов.

2. Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны препараты гидролитических ферментов: трипсин из поджелудочной железы крупного рогатого скота (“Спофа”, Чехия и “Самсон Мед”, Россия) с активностью $3,22 \pm 0,02$ Ед/мг по казеину; протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба (НПО «Биопрогресс», Россия) с активностью $0,016 \pm 0,004$ Ед/мг по азоколлу; грибная амилаза, выделенная из *Aspergillus oryzae* (AB Enzymes GmbH, Германия) с активностью $25,05 \pm 1,15$ Ед/мг по крахмалу; липаза из под-

желудочной железы крупного рогатого скота («Sigma-Aldrich», США) с активностью $7,76 \pm 0,11$ Ед/мг по оливковому маслу.

В качестве субстратов использовали: казеин по Гаммерстену– («Биолар», Латвия); азоколл (НПФ "Диагностикум", Россия); картофельный крахмал («Лабтех», Россия); оливковое масло («ExtraVirgin», Испания); ячменный солод («Souffiet», Россия); жиросодержащий отход мясоперерабатывающей промышленности («КампоМос», Россия). В качестве носителей для иммобилизации гидролаз использовали природные полисахариды: хитозан со степенью деацелирования 75%, молекулярной массой 480 Да, с содержанием основного вещества не менее 87% («Sigma-Aldrich», США) и альгинат натрия с молекулярной массой 10 кДа, с содержанием основного вещества не менее 85% («Sigma-Aldrich», США). Химические реактивы имели квалификацию не ниже «ХЧ», все растворы для проведения исследований готовили на дистиллированной воде.

Содержание белковых веществ определяли с помощью модифицированного метода Лоури. Протеолитическую активность ПК определяли по азоколлу фотометрическим методом, трипсина – по казеину модифицированным методом Ансона, амилолитическую активность грибной амилазы – по крахмалу с применением 3,5-динитросалициловой кислоты, липазную активность – по оливковому маслу титриметрическим методом.

Спектрометрические измерения выполняли на спектрофотометре UV 2600 фирмы Shimadzu. Идентификацию функциональных групп и образование новых химических связей проводили путем ИК-спектроскопии с использованием спектрофотометра Thermoavatar330 (США). Размер микрочастиц определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL 1610LV с энергодисперсионным спектрометром для электронно-зондового микроанализа SSD X-Max Inca Energy. Для обработки данных по ИК-спектроскопии использовали программу SpectraSuite.

3. Экспериментальная часть и обсуждение результатов

3.1 Характеристика физико-химических свойств нативных гидролаз

На первом этапе работы определяли параметры уравнения Михаэлиса – Ментен для нативных гидролитических ферментов (трипсина КРС, протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба, липазы КРС и грибной амилазы). Рассчитанные значения константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости (V_{max}) представлены в табл. 1. Таблица 1 – Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен нативных форм гидролаз при различных температурах

Фермент	Значения V_{max} ($\cdot 10^3$) (моль/дм ³ ·с) при температурах, °С			
	25	37	45	55
Трипсин	0,54±0,03	0,94±0,05	1,33±0,07	1,48±0,07
	$K_m = 2,12 \pm 0,11$ г/дм ³			
Протеолитический комплекс	0,06±0,01	0,07±0,01	0,12±0,01	0,24±0,01
	$K_m = 0,76 \pm 0,04$ г/дм ³			
Липаза	0,03±0,01	0,07±0,01	0,11±0,01	0,13±0,01
	$K_m = 4,00 \pm 0,20$ г/дм ³			
Фермент	Значения V_{max} ($\cdot 10^3$) (моль/дм ³ ·с) при температурах, °С			
	25	45	55	65
Амилаза	34,08±1,71	57,42±2,87	65,33±3,27	77,50±3,88
	$K_m = 1,78 \pm 0,09$ г/дм ³			

Для характеристики операционной стабильности гидролаз (т.е. способности сохранять активность в расширенном диапазоне значений температур и pH среды) были найдены оптимальные значения pH и температуры, которые составили: для протеаз – 37°C, pH 7,8; для амилазы – 45°C, pH 5,0; для липазы – 37°C, pH 8,0. Следует отметить значительное снижение операционной стабильности нативных гидролаз в условиях, отличных от оптимальных: с повышением температуры до 75°C остаточная активность составляет 20-38%, в области значений pH 4,0-5,0 – 10-17%.

Для анализа функциональной стабильности (т.е. способности сохранять активность в условиях, приводящих к денатурации белка) нативных гидролаз были проведены процессы термо- и pH-инактивации. Термоинактивацию осуществляли в диапазоне температур 37-65°C при оптимальном для каждого фермента значении pH в течение 72 часов. pH-инактивацию проводили в диапазоне значений pH среды 5,0-8,5 при оптимальной для каждого фермента температуре в течение 4 часов. По результатам экспериментов были рассчитаны значения констант инактивации, представленные в табл. 2.

Таблица 2 – Эффективные константы скорости термо- и pH-инактивации нативных форм гидролаз

Фермент	Значения константы инактивации $k_{ин}$ ($\cdot 10^{-3}$) (c^{-1})			
	Термоинактивация		pH-инактивация	
	37°C	45°C	pH 5,0	pH 8,0
Протеолитический комплекс	1,30±0,07 0,24±0,02	1,56±0,08 0,26±0,01	2,03±0,10	1,12±0,06
Трипсин	0,76±0,04 0,11±0,01	0,87 ±0,04 0,15 ±0,01	3,00 ±0,15	0,78±0,04
Липаза	0,19±0,01	0,22±0,01	0,49 ±0,07	0,79±0,04
Амилаза	0,11±0,01	0,14±0,01	0,59 ±0,03	2,86±0,14

Для рассчитанных значений максимальной скорости и константы инактивации нативных гидролаз были определены значения энергии активации и параметры уравнения кислотно-основного катализа (табл. 3).

Таблица 3 - Значения энергии активации и параметров уравнения кислотно-основного катализа для нативных гидролаз в оптимальных условиях

Параметр		Ферментный препарат			
		Трипсин	ПК	Липаза	Амилаза
V_{max}	E_a , кДж/моль	34,20±1,71	26,57±1,33	17,16±1,38	33,67±1,68
	K_a , ($\cdot 10^{-3}$), дм ³ /моль	22,45±1,12	32,15±1,61	12,15±1,18	39,22±1,96
	k_0 , ($\cdot 10^3$), моль/(дм ³ ·с)	0,58±0,03	0,06±0,01	110,51±5,50	0,02±0,01
$k_{ин}$	E_a , кДж/моль	41,50±2,07	38,55±1,93	42,82±2,14	40,65±2,03
	K_a , ($\cdot 10^{-3}$), дм ³ /моль	31,78±1,59	26,78±1,34	43,65±4,12	75,12±3,76
	k_0 , ($\cdot 10^3$), моль/(дм ³ ·с)	0,02±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01

Для оценки конформационной стабильности ферментов при термоинактивации были рассчитаны термодинамические характеристики данного процесса: свободная энергия Гиббса ΔG_i , энтальпия ΔH_i и энтропия ΔS_i (табл. 4).

Таблица 4 – Значения термодинамических характеристик нативных гидролаз

Ферментный препарат	ΔG_i , кДж/моль	ΔH_i , кДж/моль	ΔS_i , Дж/К·моль
Трипсин	116,4±5,8	15,6±0,8	-(325,3±16,3)
Протеолитический комплекс	121,3±6,1	17,2±0,9	-(335,9±16,8)
Амилаза	101,2±7,1	13,3±0,7	-(276,4±13,8)
Липаза	117,9±5,9	9,9±0,5	-(348,4±17,4)

Еще одной важной характеристикой, отражающей эффективность действия фермента, является стабильность при хранении (т.е. способность сохранять ферментативную активность во времени). Было выявлено, что остаточная активность ферментов при хранении в растворах в условиях оптимальных значений pH и температуры в течение 96 часов для нативных протеаз и липазы составляет 22-33% от исходной, амилазы – 5%. Столь значительное снижение активности исследуемых ферментов может быть обусловлено неустойчивостью конформации белка и разрывом внутримолекулярных связей.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что нативные гидролазы обладают низкой стабильностью, легко инактивируются под действием экстремальных значений температуры и pH среды, а также быстро теряют активность при хранении. Все эти факторы ограничивают возможность их применения в промышленности. Поэтому актуальной является задача создания модифицированных форм ферментных препаратов, лишенных вышеуказанных недостатков. Одним из наиболее простых и эффективных способов модификации ферментов является их иммобилизация на природных и синтетических носителях.

3.2. Получение иммобилизованных форм гидролаз

Для получения иммобилизованных препаратов гидролаз в качестве носителей были выбраны наиболее распространенные природные полисахариды: целлюлоза, хитозан и альгинат натрия. Первоначально оценили эффективность стабилизации ферментов в присутствии альгината натрия и хитозана. Эксперименты показали, что степень сохранения активности гидролаз в среде данных полисахаридов в сравнении с нативными гидролазами возрастает: для трипсина в 1,3 раза (с 33% до 42%), для протеолитического комплекса – в 1,12 раз (с 25% до 28%), для амилазы – в 9,5 раз (с 2% до 19%), для липазы – в 1,09 раз (с 22% до 24%). Следует отметить, что повышения стабильности при хранении ПК в среде альгината натрия не наблюдалось, что делает нецелесообразным использование альгината натрия для иммобилизации данного ферментного комплекса.

В промышленной практике ферменты чаще всего закрепляют на неподвижном носителе, поэтому была проведена оценка сохранения активности гидролаз, стабилизированных полисахаридами и иммобилизованных на полиэтиленовой матрице (пленке). Было установлено, что высушенные пленки с иммобилизованными ферментами в течение более 5 месяцев сохраняли ферментативную активность на уровне 40 - 70% от исходной. Таким образом, ферменты, иммобилизованные на полиэтиленовую матрицу, и в присутствии полисахаридов (хитозана, альгината натрия), более стабильны при хранении.

На следующем этапе работы процесс иммобилизации гидролаз проводили на подготовленные текстильные носители (целлюлозу и диальдегидцеллюлозу (ДАЦ)). В работе для каждой гидролазы готовили два типа образцов: 1) фермент, иммобилизованный на неокисленной целлюлозе и ДАЦ, 2) фермент, иммобилизованный на целлюлозе

и стабилизированный альгинатом или хитозаном. Иммунизацию проводили при рН 6,2, комнатной температуре, концентрации фермента 2 мг/мл. Через 2 часа инкубации в образцах определяли содержание белка и остаточную активность, как во влажных образцах после удаления избыточной влаги, так и сразу после высушивания. Результаты приведены в табл 5.

Из данных табл. 5 следует, что максимальная степень иммобилизации белка наблюдается при иммобилизации гидролаз, стабилизированных хитозаном, на текстильный носитель. В той же таблице приведены известные промышленные препараты гидролаз. Сравнение характеристик промышленных образцов с полученными в работе препаратами протеаз показывает, что они по удельной активности и удельному содержанию белка не уступают промышленным препаратам, используемым для создания раневых покрытий.

Таблица 5– Характеристики препаратов на основе иммобилизованных ферментов

Ферментный препарат	Количество иммобилизованного белка, мг/г препарата	Ферментативная активность, ед/г
Целлюлоза-трипсин	5,85	0,10
Диальдегидцеллюлоза-трипсин	5,95	0,09
Целлюлоза-хитозан-трипсин	6,05	0,11
Целлюлоза-альгинат-трипсин	6,00	0,10
Целлюлоза-протеолитический комплекс	7,73	0,11
Диальдегидцеллюлоза - протеолитический комплекс	7,80	0,12
Целлюлоза-хитозан- протеолитический комплекс	8,30	0,13
Целлюлоза-амилаза	8,95	0,08
диальдегидцеллюлоза -амилаза	9,06	0,08
Целлюлоза-хитозан-амилаза	9,42	0,09
Целлюлоза-альгинат-амилаза	9,34	0,08
Целлюлоза-липаза	5,75	0,03
диальдегидцеллюлоза -липаза	5,60	0,03
Целлюлоза-хитозан-липаза	5,79	0,04
Целлюлоза-альгинат-липаза	5,70	0,04
Промышленные образцы ферментных препаратов		
Мультиферм (диальдегидцеллюлоза, хитозан, трипсин)	8,0	0,1
Протеокс-ТМ (диальдегидцеллюлоза, трипсин, мексидол)	3,5	0,1
ПАМ-ТЛ (диальдегидцеллюлоза, трипсин, лизоцим)	2,5	0,1

Еще одним перспективным методом иммобилизации является микрокапсулирование, т. е. включение высокомолекулярных биологически активных веществ в полупроницаемые мембраны. При этом молекулы фермента удерживаются в полисахаридной капсуле за счёт слабых взаимодействий без образования при этом ковалентных связей. В качестве полимеров для получения микрочастиц были использованы альгинат натрия и

хитозан. Размер полученных микрочастиц, который определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа, составил 0,8-1,2 мкм (рис. 1).



Рисунок 1 – Определение размера микрочастиц, нагруженных панкреатической липазой (сканирующий электронный микроскоп JEOL 1610LV с энергодисперсионным спектрометром для электронно-зондового микроанализа SSD X-Max Inca Energy)

Аналогично нативным формам ферментных препаратов для иммобилизованных гидролаз были определены: максимальная скорость (V_{max}) и константа Михаэлиса (K_m). Было установлено, что значения K_m иммобилизованных и нативных форм ферментов близки, тогда как значения V_{max} увеличились для иммобилизованных на хитозансодержащей целлюлозе трипсина в 2 раза, ПК и амилазы - в 1,5 раза, для микрочастиц липазы - в 1,4 раза. Однако для ПК, иммобилизованного на целлюлозе и ДАЦ, липазы, иммобилизованной на ДАЦ и хитозансодержащей целлюлозе, происходит снижение V_{max} (на 14%), что может быть обусловлено пространственными затруднениями, создаваемыми нерастворимой матрицей при взаимодействии субстрата и фермента. Также на данном этапе работы было проведено сравнение степени сохранения начальной активности для препаратов, иммобилизованных на природные полисахариды (по результатам эксперимента) и на синтетические (по литературным данным). Результаты приведены в табл. 6. Таблица 6 – Степень сохранения активности ферментных препаратов при иммобилизации на полисахаридные и синтетические носители

Ферментный препарат	Носитель	% сохранения активности
Амилаза	Целлюлоза	81,6
	целлюлоза-хитозан	86,2
	целлюлоза-альгинат	80,5
	полиамфолит АНКБ-2	57,0
	сульфакатионообменник К-1	73,0
Трипсин	Целлюлоза	83,1
	целлюлоза-хитозан	86,6
	целлюлоза-альгинат	82,3
	поли-N-винилпирролидон	75,6
	Силохром	73,0
Липаза	Целлюлоза	81,0
	целлюлоза-хитозан	87,1
	целлюлоза-альгинат	84,3
	Полистирол	86,4
	АВ-17-2П	46,7

Данные таблицы 7 доказывают преимущества использования природных полисахаридных носителей для иммобилизации гидролаз в сравнении с синтетическими с точки зрения сохранения активности ферментов.

3.3. Изучение механизмов иммобилизации ферментов на полисахаридные носители

Из литературных данных известно, что иммобилизация ферментов может осуществляться, как за счёт образования ковалентных связей между молекулами белка и молекулами носителя, так и за счёт адсорбции. Для установления типа иммобилизации были проведены исследования с применением ИК-спектрометрии.

Важнейшим условием химического метода иммобилизации ферментов является образование ковалентных связей между функциональными группами фермента с носителем. Для того, чтобы выяснить, происходит ли образование новых ковалентных связей при иммобилизации гидролаз на полисахаридные носители было проведено наложение спектров с помощью программы SpectraSuite. На рисунке 2 представлены полученные результаты.

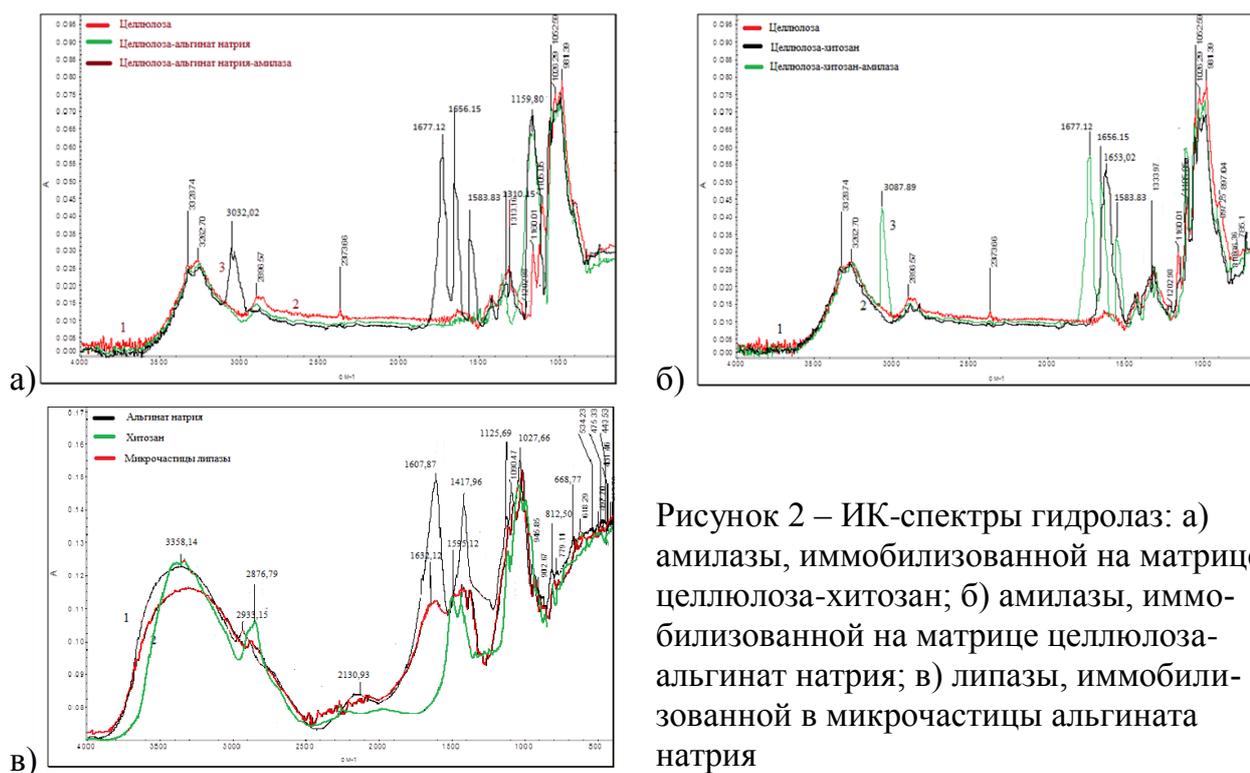


Рисунок 2 – ИК-спектры гидролаз: а) амилазы, иммобилизованной на матрице целлюлоза-хитозан; б) амилазы, иммобилизованной на матрице целлюлоза-альгинат натрия; в) липазы, иммобилизованной в микрочастицы альгината натрия

На ИК-спектрах ферментных препаратов, в отличие от спектра носителя, видны соответствующие колебательные переходы пептидной связи, а именно: появление связи $C=O$ ($1630-1700\text{ см}^{-1}$, полоса амид I) и деформация связи $N-H$ ($1650-1550\text{ см}^{-1}$, полоса амид II). В случае носителя целлюлоза-хитозан (рис. 3.22 (а)) на спектре присутствует полоса поглощения $1690-1630\text{ см}^{-1}$, соответствующей азометиновой связи $C=N$, которая может образоваться в результате взаимодействия с карбонильными группами целлюлозы как аминокрупп хитозана, так и аминокрупп фермента. В случае носителя целлюлоза-альгинат (рис. 3.22 б) азометиновая связь появляется только на спектре, содержащем фермент, что доказывает взаимодействие аминокрупп фермента и карбонильных групп целлюлозы. Также появляются колебания в области $3300-2500\text{ см}^{-1}$, свидетельствующие о деформации OH -группы, что обусловлено образованием новых водородных связей. Таким образом, можно предположить, что иммобилизация на полисахаридные носители является химической. На рис. 2 (в) на всех спектрах присутствуют полосы поглощения, соответствующие несвязанным аминокруппам хитозана ($1650-1590\text{ см}^{-1}$), гидроксиль-

ным (1150-1000 см⁻¹) и карбонильным (2900-2820 см⁻¹) группам. Сравнение данного спектра поглощения со спектрами индивидуальных соединений показывает, что в результате иммобилизации фермента методом микрокапсулирования не происходит образования новых ковалентных связей, что позволяет предположить физическую иммобилизацию ферментов в альгинатные микрочастицы.

3.4. Влияние иммобилизации на операционную стабильность гидролаз

Изучение влияния рН среды и температуры на операционную стабильность иммобилизованных форм гидролаз показало, что для препаратов протеаз и липазы температурный оптимум действия не изменяется в сравнении с нативными и составляет 37°C. Операционная стабильность иммобилизованных ферментов возросла, а именно: при 75°C степень сохранения активности трипсина увеличилась в 2, ПК – в 2,5, амилазы – в 1,3, липазы – в 1,9 раз в сравнении с нативными. Кроме того, в случае иммобилизованной амилазы наблюдалось смещение температурного оптимума в сторону более высоких температур – до 55°C.

рН-оптимум для иммобилизованных форм гидролаз не изменился в сравнении с нативными. Этот факт указывает на то, что при иммобилизации ферментов не затрагиваются ионогенные группы, участвующие в формировании их активного центра. Однако следует отметить, что иммобилизация как на целлюлозные носители, так и в микрочастицы сужает оптимум рН ферментативной активности в сравнении с нативными ферментами.

3.5. Влияние иммобилизации на функциональную стабильность гидролаз

Для оценки функциональной стабильности проводили термическую инактивацию иммобилизованных гидролаз в 0,067 М фосфатном буфере при оптимальном для каждого ФП значении рН в диапазоне температур 25-65°C. Было установлено, что иммобилизация повышает термостабильность ферментов, при этом наибольшее снижение $k_{ин}$ по сравнению с нативными формами наблюдается при термоинактивации иммобилизованных на хитозансодержащей целлюлозе гидролаз: трипсина в 2, ПК в 3,5, амилазы в 1,8 и микрочастиц липазы в 3 раза.

Исследование функциональной стабильности иммобилизованных ферментных препаратов в процессе рН-инактивации проводили в фосфатном буфере (рН 4,0-9,0) при оптимальной температуре для каждого фермента. Было установлено, что при рН-инактивации наибольшее снижение значений констант инактивации происходит в случае иммобилизованных на хитозансодержащей целлюлозе препаратов гидролаз: трипсина и ПК в 1,5, амилазы и микрочастиц липазы в 2 раза.

Для количественной оценки стабилизации гидролаз при термо- и рН-инактивации была рассчитана величина эффекта стабилизации (θ) при данной температуре и рН как отношение констант скорости инактивации нативного и модифицированного фермента (табл. 7).

Таблица 7 – Значения эффекта стабилизации (θ) различных форм гидролаз при оптимальной температуре и рН

Ферментный препарат	Термоинактивация	рН-инактивация
Целлюлоза-хитозан-трипсин	2,00	1,50
Целлюлоза-хитозан-ПК	2,38	1,50
Целлюлоза-хитозан-амилаза	2,33	1,97
Микрочастицы липазы	3,80	2,03

Полученные для всех случаев значения $\theta > 1$ подтверждают, что иммобилизация ферментов приводит к повышению их функциональной стабильности в процессах термо- и рН-инактивации. Наибольшее увеличение наблюдается при иммобилизации протеаз и амилазы на носитель целлюлоза-хитозан, а также в случае микрочастиц липазы.

3.6. Влияние иммобилизации на стабильность гидролаз при хранении

Для оценки влияния иммобилизации на стабильность при хранении исследовали изменение ферментативной активности в ФП в течение 24 месяцев при комнатной температуре. При этом наибольшее сохранение активности иммобилизованного препарата амилазы на хитозансодержащей целлюлозе достигает 52%, для аналогичных препаратов трипсина и ПК – 28% и 15% соответственно. Иммобилизация липазы на целлюлозные носители не позволяет сохранять активность фермента в течение такого же длительного времени (после месяца хранения препаратов остаточная активность составляет 3-8%).

Оценка стабильности при хранении микрочастиц гидролаз в течение 96 часов при комнатной температуре показала, что в сравнении с нативными формами, степень сохранения активности в случае липазы достигает 50% (в 2 раза больше, чем для нативной), трипсина - 41% (в 1,2 раза больше, чем для нативного), амилазы – 8% (в 1,5 раза больше, чем для нативной).

3.7. Влияние иммобилизации на конформационную стабильность гидролаз

Аналогично нативным ферментам были рассчитаны значения E_a , K_a и k_0 уравнения кислотно-основного катализа, свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии для процесса термоинактивации иммобилизованных форм. Было установлено, что процесс иммобилизации приводит к повышению конформационной стабильности ферментов, что выражается в уменьшении величины энергии Гиббса. Наибольшее снижение наблюдается в случае препаратов трипсина (на 14,0%), ПК (на 8,7%), амилазы (на 6,0%), иммобилизованных на хитозансодержащей целлюлозе, а также для микрочастиц липазы (на 5,3%). Процесс термоинактивации также сопровождается увеличением энтальпии и энтропии процесса. Наибольшее повышение данных параметров наблюдается в случае протеаз и амилазы, иммобилизованных на носителе целлюлоза-хитозан (на 12%), а также для микрочастиц липазы (на 11%).

Таким образом, в результате исследований было установлено, что иммобилизация гидролаз приводит к повышению их конформационной, функциональной, операционной стабильности и стабильности при хранении. В табл. 8 приведено сравнение кинетических и термодинамических параметров иммобилизованных и нативных форм гидролаз, из которой следует, что наилучшими носителями для иммобилизации протеаз и амилазы служит целлюлоза-хитозан, а для иммобилизации липазы целесообразно использовать микрокапсулирование.

Таблица 8 - Сравнение наиболее эффективных иммобилизованных препаратов нативной формой фермента по кинетическим и термодинамическим параметрам

Ферментный препарат	$k_{in} (\cdot 10^{-3}) \text{ с}^{-1}$ (термоинактивация)	$k_{in} (\cdot 10^{-3}) \text{ с}^{-1}$ (рН-инактивация)	$K_m, \text{ г/дм}^3$	$V_{max} (\cdot 10^3),$ (моль/дм ³ ·с)	$E_a,$ кДж/моль	$K_a, (\cdot 10^{-3}),$ дм ³ /моль	$\Delta G_i,$ кДж/моль	Θ (термоинактивация)	Время хранения при $A_{50\%}$
Нативные ферменты									
Протеолитический комплекс	1,30±0,07 0,24±0,02	1,12±0,06	0,76±0,04	0,07±0,01	26,57±1,33	32,15±1,61	121,3±6,1	1,00	57 ч.
Трипсин	0,76±0,04 0,11±0,01	0,78±0,04	2,12±0,11	0,94±0,05	34,20±1,71	22,45±1,12	116,4±5,8	1,00	60,5 ч.
Амилаза	0,14±0,01	0,59 ±0,03	1,78±0,09	57,42±2,87	17,16±1,38	12,15±1,18	101,2±7,1	1,00	18,5 ч.
Липаза	0,19±0,01	0,79±0,04	4,00±0,20	0,07±0,01	33,67±1,68	39,22±1,96	117,9±5,9	1,00	39,5 ч.
Наиболее эффективные иммобилизованные препараты									
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс	1,00±0,05 0,20±0,01	0,75±0,04	0,95±0,05	0,10±0,01	59,05±2,95	39,12±1,96	110,8±5,5	2,38	0,25 мес.
Целлюлоза-хитозан-трипсин	0,38±0,02 0,06±0,01	0,52±0,03	2,33±0,12	1,85±0,09	60,15±3,01	33,62±1,68	100,2±5,0	2,00	7,5 мес.
Целлюлоза-хитозан-амилаза	0,12±0,01	0,30±0,01	1,90±0,09	109,77±5,48	24,21±2,15	13,62±0,68	95,1±4,2	2,33	72 ч.
Микрочастицы липаза	0,05±0,01	0,39±0,02	4,76±0,24	0,08±0,01	57,60±2,38	48,56±2,43	124,1±6,2	3,80	96 ч.

3.9. Практическое применение препаратов иммобилизованных гидролаз

3.9.1. Применение протеолитических ферментов для приготовления современных перевязочных материалов

Проблема разработки раневых покрытий в настоящее время остается актуальной, несмотря на значительные успехи исследований в этой области. В работе в качестве раневых покрытий было предложено использовать иммобилизованные на хитозансодержащей целлюлозе протеазы (трипсин и ПК). Важным критерием эффективности раневых покрытий является пролонгированность их действия, для оценки которой исследовали динамику выделения фермента в фосфатном буфере рН 6,2, соответствующего раневой среде в течение 72 часов. При этом наблюдалось увеличение ФА в растворе: сразу же после помещения ФП (иммобилизованного на хитозансодержащей целлюлозе трипсина или ПК) в буферный раствор переходят молекулы фермента, которые после сушки оказались механически сорбированными на поверхности носителя (10%), в последующие 15 мин высвобождаются молекулы фермента, которые удерживались на носителе посредством ионных и водородных сил (45% для препарата трипсина и 78% для препарата ПК). Далее происходит постепенное высвобождение ковалентно связанного с целлюлозой и хитозаном фермента.

В случае иммобилизованных на целлюлозе протеаз, не стабилизированных хитозаном в первые 15 мин происходило выделение более 90% фермента, поскольку в этом случае фермент слабее удерживается на носителе и сильнее подвержен гидролитической деструкции. Из представленных данных табл. 10 следует, что константы высвобождения фермента для нестабилизированных хитозаном иммобилизованных форм протеаз значительно выше (в 1,7 раза для препарата трипсина и в 1,5 раза для препарата ПК), чем для ферментных препаратов, в составе которых присутствует хитозан (табл. 9). Следовательно, хитозан повышает пролонгированный эффект действия ферментных препаратов при использовании их в качестве раневых покрытий.

Таблица 9 – Значения констант высвобождения ФП в буферный раствор рН 6,2

Ферментный препарат	Константа высвобождения $k, (\cdot 10^{-3}), c^{-1}$
Целлюлоза-трипсин	0,117±0,005
Целлюлоза-хитозан-трипсин	0,067±0,003
Целлюлоза-протеолитический комплекс	0,052±0,003
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс	0,034±0,002

Еще одним критерием эффективности раневых покрытий является их атравматичность и обеспечение оптимальной среды для заживления ран. Для этой цели чаще всего используется глицерин, который, однако, может ингибировать ферменты. Поэтому было исследовано влияние глицерина, который добавлялся в пропиточный раствор при иммобилизации протеаз, на сохранение ферментативной активности препаратов. Полученные значения констант скорости инактивации в процессе хранения и значения времени хранения при $A_{50\%}$ для различных форм ферментов при разных концентрациях глицерина свидетельствуют о том, что глицерин в составе иммобилизованных препаратов протеаз повышает их стабильность в сравнении с нативными ферментами в 2 раза. Константы скорости инактивации иммобилизованных ферментных препаратов с глицерином и без него практически не отличаются (для препарата ПК 1,05±0,05 и 0,98±0,05, соответственно). Это свидетельствует о том, что носитель целлюлоза-хитозан стабилизирует трипсин и протеолитический комплекс и защищает от денатурирующего действия глицерина. Однако с увеличением содержания глицерина в препарате снижается его устойчивость. Было установлено, что опти-

мальная концентрация глицерина, при которой обеспечивается атравматичность ФП и потери ФА минимальны, равна 5%.

В клинической практике для ускорения заживления гнойно-некротических ран в соответствующие препараты добавляют аскорутин, в состав которого входят витамины С и Р, поэтому были получены препараты протеаз с добавлением витамина С или аскорутина в количестве 0,2% от массы фермента. Было показано, что остаточная ФА после 96 ч выдерживания образцов, содержащих витамин С, при 37°C составляет 21-23%, а аскорутин - 28-30%, что практически совпадает со значениями остаточной ФА препаратов протеаз, не содержащих витамины. Выявлено, что оптимальная концентрация витамина С и аскорутина, при которой потери ФА трипсина и ПК не превышают 5%, равна 0,2% от массы фермента (на 1 г ФП), что соответствует литературным рекомендациям по нормам добавления соединений в препараты для заживления ран. Для иммобилизованных на хитозансодержащую целлюлозу препаратов трипсина и ПК в присутствии 5% (водный раствор глицерина, об.%) глицерина с добавлением витамина С или аскорутина в количестве 0,2% оценили степень сохранения активности в зависимости от времени хранения препаратов (рис. 3).

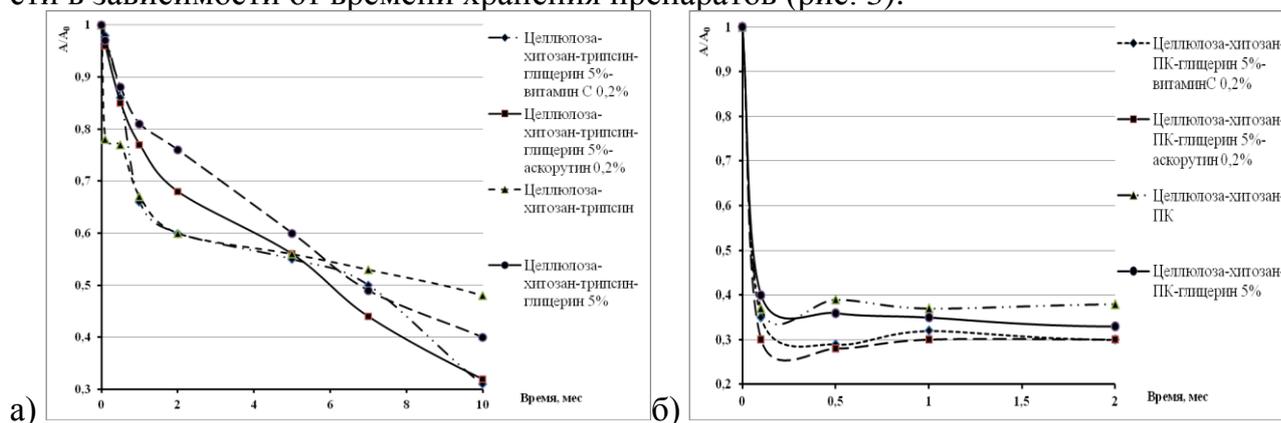


Рисунок 3 – Сохранение протеолитической активности в течение времени хранения иммобилизованных форм: а) трипсина, б) ПК в присутствии витамина С и аскорутина

Из приведенных данных видно, что добавление витамина С и аскорутина в состав иммобилизованных протеаз на носителе целлюлоза-хитозан-глицерин 5% практически не приводит к потере ФА при хранении. Значения констант скорости инактивации и время хранения при $A_{50\%}$ для препаратов, содержащих глицерин и витамины, практически не отличаются от аналогичных значений для иммобилизованных препаратов протеаз, не содержащих вышеуказанных соединений.

3.9.2. Гидролиз ячменного солода нативной и иммобилизованной амилазой

Для оценки эффективности иммобилизованного препарата грибной амилазы, иммобилизованной на хитозансодержащей целлюлозе, в качестве промышленного субстрата был выбран ячменный солод, гидролиз которого проводили в течение 8 ч. Степень гидролиза рассчитывали относительно содержания крахмала в ячменном солоде (81%). Установлено, что при концентрации ячменного солода в суспензии 1% и концентрации ферментного препарата 10% от массы субстрата, степень гидролиза составляет 18,5% для нативного фермента и 23,5% для иммобилизованного, что обусловлено практически полной инактивацией фермента. Одним из приемов, повышающих выход продуктов ферментативного гидролиза, является дробная загрузка ФП. Из представленных на рис. 4 данных следует, что при проведении 4-х загрузок ФП через каждые 2 ч гидролиза максимальная степень гидролиза крахмала в случае нативной амилазы составляет 68%, а иммобилизованной – 92%.

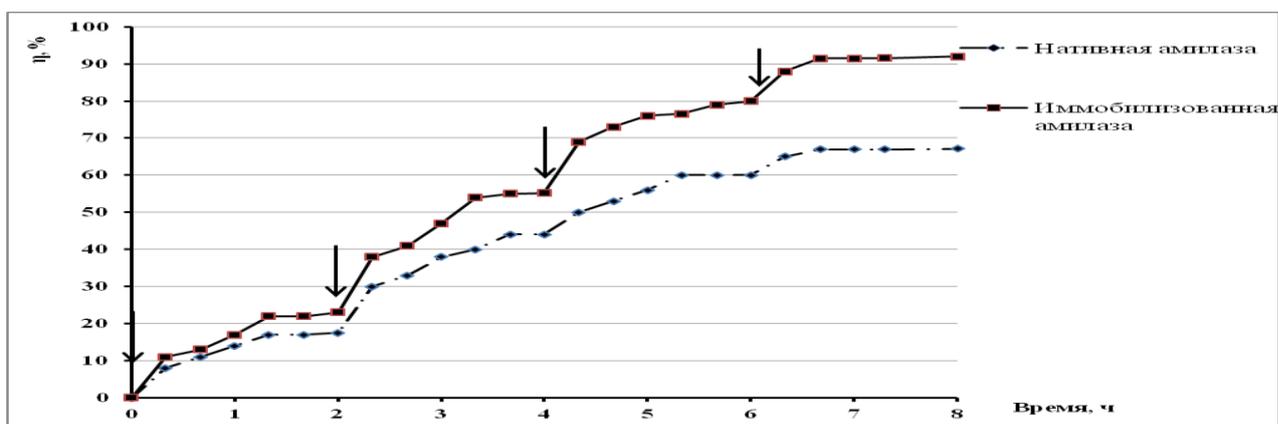


Рисунок 4 – Дробная загрузка нативной и иммобилизованной амилазы при гидролизе ячменного солода в течение 8 часов (↓ - момент внесения ФП)

Таким образом, можно рекомендовать проводить гидролиз ячменного солода иммобилизованной амилазой при pH 5,0, температуре 55°C для концентрации субстрата 1%, концентрации ферментного препарата 10% при 4-х загрузках ферментного препарата через каждые 2 ч гидролиза.

3.9.3. Гидролиз отходов мясоперерабатывающей промышленности нативной и иммобилизованной липазой

Эффективность микрочастиц липазы оценивали на примере процесса гидролиза жиросодержащего отхода мясоперерабатывающей промышленности, предварительно подвергнутого ультразвуковому диспергированию (15 мин, комнатная температура). Гидролиз проводили в течение 2 ч. Было установлено, что максимально достигаемая степень гидролиза субстрата равная 34% для нативной липазы и 39% для микрокапсулированной достигается при начальной концентрации субстрата 20% и начальной концентрации ФП - 0,5%. С целью повышения степени гидролиза, как и в случае амилазы оценили эффективность дробной загрузки ФП. Полученные результаты приведены на рис. 5, из которого следует, что при проведении 2-х загрузок ФП (вторая загрузка производится через 30 часов) максимальная степень гидролиза субстрата в случае нативной липазы составляет 50%, а иммобилизованной – 57,5%. Таким образом, представляется целесообразно проводить гидролиз жиросодержащего отхода при следующих условиях: 37°C, pH 8,0, концентрация субстрата 20%, соотношение фермента к субстрату 0,5% по массе, 2 загрузки ферментного препарата (нативного или иммобилизованного), длительность гидролиза 70 часов.

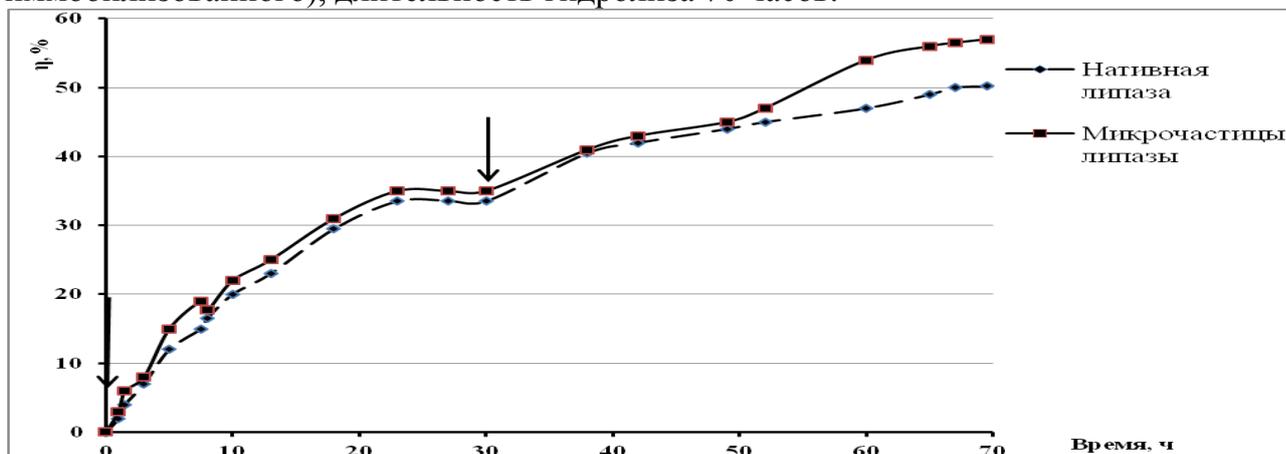


Рисунок 5 – Дробная загрузка нативной и иммобилизованной липазы при гидролизе жиросодержащего отхода в течение 70 часов (↓ - момент внесения ФП)

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанные иммобилизованные препараты гидролитических ферментов (протеаз, амилаз и липаз) обладают большей эффективностью по сравнению с нативными, что делает их перспективными для широкого практического использования.

ВЫВОДЫ

1. Охарактеризованы кинетические и термодинамические свойства нативных гидролитических ферментов (трипсина КРС, ПК из гепатопанкреаса краба, амилазы гриба *Aspergillus oryzae*, липазы КРС);

2. Подобраны наиболее эффективные условия иммобилизации гидролитических ферментов: для протеаз (трипсина КРС и ПК) - на носитель целлюлоза-хитозан; для грибной амилазы - на носитель целлюлоза-хитозан; для липазы КРС: микрокапсулирование в хитозан-альгинатные микрочастицы. Показано, что иммобилизация на природные полисахариды более эффективна, чем на синтетические: степень сохранения ферментативной активности в случае использования природных носителей составляет в среднем не менее 80%, тогда как в случае синтетических 50-80%.

3. Исследовано влияние иммобилизации на конформационную, операционную, функциональную и стабильность при хранении. Доказано, что иммобилизация протеаз и амилазы на носитель целлюлоза-хитозан и липазы в альгинатные микрочастицы приводит к увеличению стабильности относительно нативных форм гидролаз;

4. Изучена динамика высвобождения протеолитических ферментов (трипсина и ПК) в раневую среду, которая позволила установить срок пролонгированного действия препарата 72 ч, что соответствует требованиям, предъявляемым к медицинским препаратам. Подобраны концентрации смягчающего агента (глицерина) и витаминов (С и аскорутин), не вызывающие снижения протеолитической активности. На основе полученных данных разработан новый тип атравматичного перевязочного материала следующего состава: целлюлоза - хитозан- протеолитический фермент (трипсин или ПК) –5% глицерин –0,2% аскорутин (или витамин С), обладающего пролонгированным действием до 72 часов для препарата трипсина и 24 часов для препарата ПК;

5. Предложены наиболее эффективные условия проведения гидролиза ячменного солода: препарат иммобилизованной амилазы на носителе целлюлоза-хитозан, 55°C, рН 5,0, 4 загрузки ФП, 8 часов, степень гидролиза 92%;

6. Предложены наиболее эффективные условия проведения гидролиза жиросодержащих отходов при использовании микрочастиц липазы: рН 8,0, 37°C, 2 загрузки ФП, 70 часов, степень гидролиза 57,5%.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Распопова Е.А.** (Приворотская Е.А.), Белов А.А. Кинетика термоинактивации протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба, стабилизированного полисахаридными соединениями // *Фундаментальные исследования*. 2013. №11. С. 656-661.

2. **Распопова Е.А.** (Приворотская Е.А.) Кинетика выделения лекарственного средства с перевязочного материала в рану // *В мире научных открытий*. 2014. №6 (54). С.67-74.

3. **Raspopova E.A.** (Приворотская Е.А.), Belov A.A., Korotaeva A.I. Influence solutions of glycerol on the enzymatic activity of proteolytic complex of hepatopancreas crab stabilized polysaccharide compounds // *Chemical Technology. Key Developments in Applied Chemistry and Materials Science*. Apple Academic Press. 2014. pp. 73-89.

4. **Распопова Е.А.** (Приворотская Е.А.), Красноштанова А.А. Характеристика свойств и оценка эффективности биокатализатора на основе иммобилизованной грибной амилазы // *Катализ в промышленности*. 2015. №5. Т. 15. С. 54-60.

5. Манукян Г.А., **Приворотская Е.А.**, Красноштанова А.А. Исследование влияния иммобилизации на стабильность панкреатической липазы // Бутлеровские сообщения. 2016. Т. 47. Вып. 7. С. 74 – 81.

Статьи и материалы научных конференций:

6. **Распопова Е.А.** (Приворотская Е.А.), Коротаева А.И., Белов А.А. Влияние растворов глицерина на ферментативную активность протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба стабилизированного полисахаридными соединениями / XIII ежегодная международная молодежная конференция ИБХФ РАН-ВУЗы "БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА». М.: 2013. С.179-182.

7. **Распопова Е.А.** (Приворотская Е.А.), Маленко О.Э., Белов А.А. Кинетика термоинактивации протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба, стабилизированного полисахаридными соединениями / XIII ежегодная международная молодежная конференция ИБХФ РАН-ВУЗы "БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА". 2013.С.116-120;

8. **Распопова Е.А.** (Приворотская Е.А.) , Черемных Н.М. Методология получения ферментных препаратов для медицинских целей // Человек. Образование. Наука. Культура. 2013. С.21-22;

9. **Распопова Е.А.** (Приворотская Е.А.), Белов А.А. Иммобилизация протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба на полисахаридные носители // Материалы конгресса. Биотехнология: состояние и перспективы развития. 2013. С.69-71;

10. **Распопова Е.А.** (Приворотская Е.А.), Белов А.А. Потери ферментативной активности при высушивании различных форм полиферментных препаратов // Материалы конгресса. Биотехнология: состояние и перспективы развития. 2014. С.308-309;

11. **Распопова Е.А.** (Приворотская Е.А.), Красноштанова А.А. Исследование стабильности грибной амилазы, иммобилизованной на хитозансодержащей целлюлозе // Материалы конгресса. Биотехнология: состояние и перспективы развития. 2015. С.328-329;

12. **Распопова Е.А.** (Приворотская Е.А.), Красноштанова А.А., Панфилов В.И. Применение иммобилизованной грибной амилазы в гидролизе ячменного солода // Современные достижения биотехнологии. Актуальные проблемы молочного дела. 2015. С. 44-46.;

13. Манукян Г.А., **Приворотская Е.А.**, Красноштанова А.А. Влияние способа иммобилизации на термостабильность панкреатической липазы // Современные проблемы химической технологии биологически активных веществ. 2016. С. 32-33

Список сокращений: ДАЦ – диальдегидцеллюлоза; ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия; КРС – крупный рогатый скот; ПК – протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба; ФА – ферментативная активность; ФП – ферментный препарат

Автор выражает глубокую признательность доценту кафедры биотехнологии, д.т.н. Белову Алексею Алексеевичу за помощь в проведении исследований по разработке и оценке эффективности раневых покрытий на основе препаратов протеаз.