

УДК 577.152.3.04

## ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Д.Н. Трофимова, А.Л. Камышный\*, Ш. Магдасси\*, А.В. Левашов

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: Levashov@enzyme.chem.msu.ru)

Проведено сравнительное изучение стабильности нативных и модифицированных препаратов глюкозооксидазы из *Aspergillus Niger* (ГО) и формиатдегидрогеназы из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101 (ФДГ) в водной среде. Обнаружено, что термоинактивация нативных и модифицированных препаратов проходит по первому порядку. Показано, что гидрофобная модификация не изменяет структуру и стабильность ГО, в то время как ФДГ очень чувствительна к изменению гидрофильно-липофильного баланса фермента. В случае гидрофильной модификации целлобиозой ФДГ термостабильность падает по сравнению с нативным ферментом в 5 раз, гидрофобная модификация (ацилирование) приводит к увеличению термостабильности фермента в 2 раза.

Одной из наиболее актуальных задач современной белковой инженерии является повышение термостабильности ферментов. На каталитические характеристики и стабильность ферментов существенное влияние может оказывать гидрофильно-липофильный баланс поверхности белка. Для изменения этого свойства применяют методы химической модификации, а также генной инженерии, например, направленный мутагенез.

Существует ряд работ [1–14], в которых продемонстрировано, что изменение гидрофильно-липофильного баланса ферментов путем химической модификации приводит к изменению активности и стабильности этих ферментов в водной и органической средах. Однако пока не удается однозначно сказать, как именно изменится стабильность фермента при той или иной модификации.

Так, модификация белков гидрофобными реагентами может приводить как к повышению, так и понижению термостабильности белков. Например, при модификации ангидридами уксусной, пропионовой, валериановой кислоты и малеиновым ангидридом аминокислот пероксидазы из корней хрена во всех случаях наблюдалось увеличение термостабильности модифицированных препаратов по сравнению с нативным ферментом [6, 8].

Модификация субтилизина стеароилхлоридом, описанная в работе [1], также приводит к увеличению термостабильности по сравнению с нативным белком.

Однако существует работа [15], в которой было показано, что термостабильность гидрофобизованных стеароилхлоридом  $\alpha$ -химотрипсина и трипсина меньше, чем соответствующих нативных ферментов.

В случае гидрофильной модификации в работах [11, 12] описано увеличение стабильности ферментов. Модификация  $\alpha$ -химотрипсина гидрофильными альдегида-

ми [12] приводит к 100–1000-кратным эффектам стабилизации по отношению к необратимой термоинактивации при высоких (выше 70°) температурах. Стабильность фермента тем выше, чем более гидрофильный фрагмент вводится в его молекулу при модификации.

В настоящей работе для изменения природы поверхности ферментов был использован метод химической модификации. Гидрофильную модификацию проводили путем взаимодействия аминокислотных групп ферментов с целлобиозой, а гидрофобную действием пальмитоилхлорида и N-гидроксисукцинимидом стеариновой кислоты на аминокислотные группы ферментов.

В работе были использованы два хорошо изученных фермента: это глюкозооксидаза из *Aspergillus niger*, которая находит широкое применение в биосенсорах для определения глюкозы, и формиатдегидрогеназа метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101, используемая в качестве фермента для регенерации кофактора в ферментативных системах синтеза с использованием дегидрогеназ.

### Материалы

Раствор препарата рекомбинантной NAD-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (К.Ф. 1.2.1.2, ФДГ) в калий-фосфатном буфере (0,1 М; 0,02 М ЭДТА; pH 7,0) концентрации 5 мг/мл (удельная активность 15,8 ед/мг) был предоставлен профессором В.И. Тишковым, глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4.) из *Aspergillus niger* 218200 ед/г (“Sigma”, США, без дополнительной очистки), пероксидаза из корней хрена (К.Ф.1.11.1.7) (“Yarinvest Medical International”, Россия, препарат характеризовался величиной RZ 2,94, использовали без дополнительной очистки), *n*-октан (“ч.д.а.” абсолютировали обработкой

\*Институт прикладной химии им. Казалы, Иерусалимский еврейский университет, Иерусалим, 91904, Израиль.

натрием и очищали перегонкой), натриевая соль муравьиной кислоты (формиат натрия) “ос.ч.” (Реахим, Россия), пальмитоил хлорид (получен по методике [16] действием хлористого тионила на пальмитиновую кислоту), натриевая соль ди-(2-этил) гексилового эфира сульфоянтарной кислоты (Аэрозоль ОТ, АОТ), пирогаллол, D-глюкоза, никотинамидадениндинуклеотид ( $\text{NAD}^+$ ) (применяли без дополнительной очистки), N-гидроксисукцинимид пальмитоила, тринитробензолсульфо кислота (ТНБС, очищали перекристаллизацией), D-целлобиоза, цианборгидрид натрия, додецилсульфат натрия (SDS) (“Sigma”, США). В работе использовали растворители и низкомолекулярные вещества марок “ч.д.а.” и “ос.ч.” без дополнительной очистки.

### Методики

#### Определение концентрации глюкозооксидазы

Концентрацию глюкозооксидазы определяли спектрофотометрически по величине оптической плотности при 278 нм, используя коэффициент экстинкции  $\epsilon_{278} = 179000 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [17].

#### Определение концентрации ФДГ

Концентрацию формиатдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по величине оптической плотности при 278 нм, используя коэффициент экстинкции  $\epsilon_{278} = 125000 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [18].

#### Гидрофобная модификация глюкозооксидазы N-гидроксисукцинимидом пальмитиновой кислоты

К 6 мл раствора ГО 4 мг/мл в 0,16 М калий фосфатном буфере (рН 8,8) с дезоксихолатом натрия (2 мас.%) добавляли каждые 2 ч по 0,1 мл N-гидроксисукцинимид пальмитиновой кислоты в 1,4-диоксане (4 порции) [19]. Молярное отношение ГО к модифицирующему агенту составляло 1:56. Реакцию проводили при перемешивании в течение 8 ч, а затем фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Модифицированную ГО отделяли от низкомолекулярных реагентов методом диализа. Диализ проводили 4 раза по 12 ч против 0,02 М ацетат-фосфатного буфера (рН 5,5) при 4°. Полученный препарат лиофилизировали.

#### Гидрофобная модификация ФДГ хлорангидридом пальмитиновой кислоты

Гидрофобную модификацию ФДГ проводили по аминокетонам лизина хлорангидридом пальмитиновой кислоты. Из данных рентгеноструктурного анализа [20] известно, что на одну субъединицу ФДГ приходится 19 аминокетонных групп лизина и часть из них располагается в области межсубъединичного контакта. Было обнаружено [21], что каталитически важный остаток лизина находится в районе формиатсвязывающего участка активного центра ФДГ, следовательно, присутствие формиат-иона в реакционной среде является эффективной защитой от инактивации фермента при модификации.

К 0,8 мл 6 мг/мл раствора фермента в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,5) добавляли 25 мкл 3 М раствора формиата натрия (для защиты активного центра фермента). Реакцию инициировали добавлением 10–120 мкл раствора пальмитоил хлорида в ацетонитриле (1:1), через 30 мин препарат пропускали через фильтр (размер пор 0,22 мкм). Модифицированную ФДГ отделяли от низкомолекулярных реагентов методом гель-фильтрации. Работы по очистке препаратов белка проводили на хроматографической системе низкого давления (“Bio-Rad”, США) на колонке с *Sephadex G-25 fine*, предварительно уравновешенной калий-фосфатным буфером (20 мМ, рН 8,5) с 20 мМ ЭДТА. Содержание белка контролировали по поглощению при 280 нм. Для концентрирования полученного фермента использовали *Amicon*.

#### Гидрофильная модификация ФДГ D(+)-целлобиозой

К 1 мл 2,5 мкМ раствора ФДГ в калий-фосфатном буфере (рН 8,5) добавляли 30 мкл 0,25 М раствора D(+)-целлобиозы. Реакцию проводили при постоянном перемешивании при 25°. Через 24 ч для восстановления основания Шиффа добавляли небольшими порциями 10 мкл раствора боргидрида натрия (5 мг/мл). При использовании в качестве восстанавливающего агента цианборгидрида натрия происходила полная потеря ферментативной активности. Это, по-видимому, связано с тем, что ион  $\text{CN}^-$  является ингибитором ФДГ. После завершения реакции модифицированную ФДГ отделяли от низкомолекулярных реагентов методом гель-фильтрации. Работы по очистке препаратов белка проводили на хроматографической системе низкого давления (*Bio-Rad*, США) на колонке (8×400мм) с *Sephadex G-25 (fine)*, уравновешенной калий-фосфатным буфером (20 мМ; рН 8,5) с ЭДТА (20 мМ). Содержание белка контролировали по поглощению при 280 нм.

Контроль за чистотой фермента осуществляли по стандартной методике электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях, рекомендованной фирмой “Bio-Rad” (США). Для проведения экспериментов использовали систему “Midget 2050” (“LKB”, Швеция). Наличие одной узкой полосы на электрофореграмме, соответствующей молекулярной массе 45 кДа (молекулярная масса одной субъединицы нативной ФДГ составляет 44 кДа), свидетельствует о гомогенности полученного препарата и отсутствии межмолекулярных сшивок.

#### Измерение скорости реакции, катализируемой глюкозооксидазой

К 2 мл 20 мМ ацетат-фосфатного буфера (рН 5,5) или к 2 мл раствора Аэрозоля ОТ (0,1 М) добавляли 10 мкл раствора ГО в том же буфере (исходные концентрации препаратов фермента варьировали в пределах от 0,8 до 3,2 мкМ), 10 мкл 0,4 М раствора пирогаллола в ацетоне и 10 мкл раствора пероксидазы (ПХ) 1 мг/мл в ацетат-фосфатном буфере (рН 7,0) и встряхивали. Реакцию инициировали введением 5–60 мкл 0,5 М раствора

D(+)-глюкозы. За реакцией следили спектрофотометрически по накоплению продукта окисления пирогаллола на длине волны 420 нм при 25°.

#### Определение каталитической активности препаратов ФДГ

Активность препаратов ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению образующегося NADH ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [22] при 340 нм и температуре 37° [18]. К 1,84 мл 0,02 М калий фосфатного буфера (pH 8,5) добавляли 10 мкл раствора  $\text{NAD}^+$  0,3 М и 0,3 мл 3 М раствора формиата натрия. Реакцию инициировали введением 50 мкл раствора ФДГ. Эксперименты проводили на спектрофотометре *Shimadzu UV 265FW* (Япония).

#### Определение концентрации активного фермента в препаратах ФДГ

Концентрацию активного фермента в препаратах ФДГ определяли по стандартной методике [18]. К 1,84 мл 0,02 М калий фосфатного буфера (pH 8,5) добавляли 10 мкл раствора  $\text{NAD}^+$  0,3 М и 300 мкл 3 М раствора формиата натрия. Реакцию инициировали введением 50 мкл раствора ФДГ. Фиксировали спектрофотометрически накопление образующегося NADH при 340 нм и температуре 37°. Эксперименты проводили на спектрофотометре *Shimadzu UV 265 FW* (Япония).

По соотношению полученной величины скорости реакции с удельной активностью ФДГ (15,8 ед/мг) определяли концентрацию активного фермента в мг/мл.

#### Измерение скорости реакции, катализируемой формиатдегидрогеназой

К 2 мл 0,1 М раствора АОТ в октане добавляли калий-фосфатный буфер 20 мМ (pH 8,5), 10 мкл 0,3 М водного раствора  $\text{NAD}^+$ , 10 мкл раствора фермента (исходные концентрации препаратов фермента варьировали в пределах от 21,5 до 56,8 мкМ) и встряхивали до получения гомогенного оптически прозрачного раствора. Реакцию инициировали введением 5–100 мкл 0,3 М раствора формиата натрия. За реакцией следили спектрофотометрически на длине волны 340 нм при 25°.

#### Определение степени модификации ферментов

Степень модификации полученных препаратов ФДГ определяли по стандартной методике [23] титрованием аминокрупп белка тринитробензолсульфо кислотой (ТНБС). Перед титрованием анализируемый препарат ФДГ диализовали против 500–кратного объема дистиллированной воды в течение одних суток при 4°.

В случае препаратов ГО степень модификации определяли по методике [24], отличной от стандартной методики определения  $\text{NH}_2$  групп в белках, так как ГО имеет максимум поглощения на длине волны 420 нм, который мешает определению концентрации продукта реакции ТНБС с  $\text{NH}_2$ -группами.

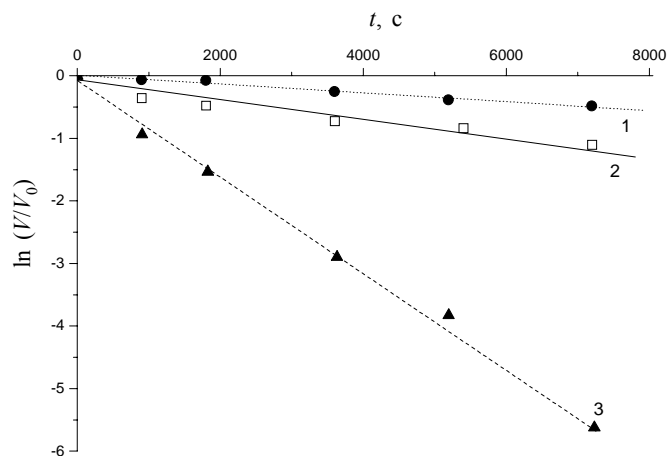


Рис. 1. Зависимость логарифма остаточной ферментативной активности ФДГ от времени: 1 – ФДГ, модифицированная хлорангидридом пальмитиновой кислоты, 2 – нативная ФДГ, 3 – ФДГ, модифицированная целлобиозой (калий-фосфатный буфер 0,02 М, pH 8,5; 63°)

#### Измерение тушения собственной флуоресценции, нативной и модифицированной ФДГ

Измерение интенсивности собственной флуоресценции нативной и модифицированных форм формиатдегидрогеназы проводили на люминесцентном спектрометре фирмы *Perkin Elmer LS50B* (Швеция). Длина волны возбуждения составляла 295 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли при длине волны 345 нм. Во флуориметрическую кювету с длиной оптического пути 1 см и общим объемом 2,0 мл, содержащую калий-фосфатный буфер (pH 8,5) и мочевины с концентрацией 0–8 М, добавляли аликвоты 10 мкл раствора фермента с концентрацией 0,2–0,5 мг/мл.

#### Определение термостабильности препаратов ферментов

Термостабильность нативной и модифицированных препаратов ФДГ измеряли при 63°. Эпендорфы с препаратами ФДГ помещали в прогретый до нужной температуры водяной термостат. Через фиксированные интервалы времени отбирали аликвоты препарата фермента и охлаждали во льду. Затем измеряли остаточную активность ФДГ при фиксированной концентрации  $\text{NAD}^+$  и формиата при 25°. Константу скорости термоинактивации определяли как тангенс угла наклона прямой графика зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени методом линейной регрессии.

Термостабильность ГО измеряли при 60°. В термостат помещали раствор фермента в ацетат-фосфатном буфере (0,02 М; pH 7,0), в буфере в присутствии SDS (0,01М) или раствор фермента, солиобилизованного в системе обращенных мицелл АОТ–вода–октан (0,1 М АОТ,  $W_0 = 22$ ). Через фиксированные интервалы времени отбирали аликвоты препарата фермента (2 мл) и охлаждали во льду. Затем добавляли 10 мкл 0,4 М раство-

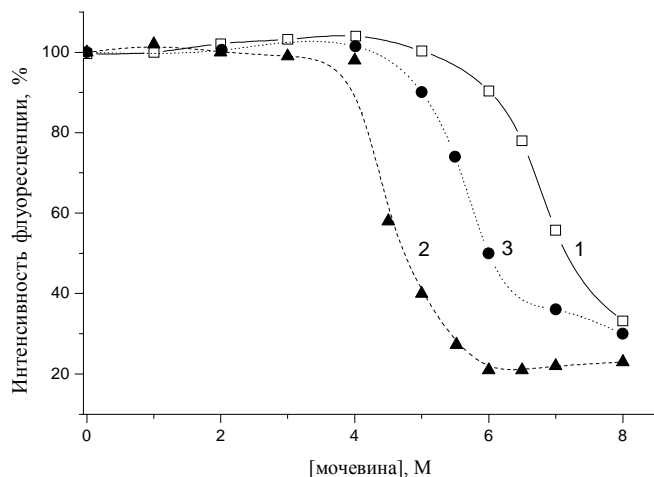


Рис. 2. Зависимость интенсивности собственной флуоресценции ФДГ от концентрации мочевины в растворе: 1 – нативная ФДГ, 2 – модифицированная целлобиозой ФДГ, 3 – модифицированная хлорангидридом пальмитиновой кислоты ФДГ

ра пирогаллола в ацетоне и 10 мкл раствора пероксидазы (ПХ) 1мг/мл в ацетат-фосфатном буфере (рН 7,0) и встряхивали. Реакцию инициировали введением 5–60 мкл 0,5 М раствора D(+)-глюкозы. За реакцией следили спектрофотометрически по накоплению продукта окисления пирогаллола на длине волны 420 нм при 25°.

**Результаты и их обсуждение**

Было проведено сравнительное изучение термостабильности нативной ФДГ и модифицированной гидрофильно (ФДГ–14СВ) и гидрофобно (ФДГ–8С<sub>16</sub>).

Процесс термоинактивации всех исследованных нами препаратов ФДГ следует кинетике первого порядка (рис. 1). Константа термоинактивации при 62° для нативного фермента составляет  $13 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ , для гидрофилизированного  $63 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ , а для гидрофобизованного  $7 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ . Отметим, что в координатах реакции первого порядка эта зависимость не имеет точек перегиба, что свидетельствует о том, что реакция термоинактивации ФДГ псевдопервого порядка. Мы видим, что гидрофобная модификация приводит к повышению термостабильности фермента примерно в 2 раза. В случае же гидрофильной модификации термостабильность фермента уменьшается примерно в 5 раз.

Потеря термостабильности может быть связана как с ослаблением межсубъединичных контактов при гидрофильной модификации и приводящим к диссоциации димерной молекулы белка на мономеры, так и с облегчением разворачивания полипептидной цепи.

Для того чтобы прояснить механизм влияния модификации на стабильность фермента, мы изучили зависимость интенсивности собственной флуоресценции нативной и модифицированных препаратов ФДГ от концентрации мочевины в растворе, т.е. в условиях обратной денатурации (рис. 2). Снижение интенсивности собственной флуоресценции белка связана с процессами разворачивания и диссоциации, а положение точки

перегиба может служить мерой прочности межсубъединичных взаимодействий. Видно, что для модифицированных как гидрофильно, так и гидрофобно препаратов ФДГ точка полуинактивации смещается в сторону меньших концентраций мочевины. То есть гидрофильная и гидрофобная модификации ФДГ приводят к понижению стабильности в условиях обратимой денатурации в мочеvine.

Существует работа [25], в которой показано, что гидрофильная модификация ФДГ глюкозой стабилизирует мономерную форму фермента и препятствует агрегации субъединиц в мягких условиях в системе обращенных мицелл. В то же время было показано [26], что и гидрофобная модификация пальмитоилхлоридом ФДГ также приводит к стабилизации мономерной формы. Причем с увеличением степени модификации фермента ослабевают межсубъединичные взаимодействия и при больших степенях модификации образование димера модифицированной ФДГ в системе обращенных мицелл не происходит.

Иными словами, независимо от природы модифицирующего агента (гидрофильный, гидрофобный) модификация приводит к падению стабильности в условиях обратимой денатурации в мочеvine за счет ослабления межсубъединичных взаимодействий. Однако в случае необратимой термоинактивации гидрофильная модификация приводит к понижению стабильности, а гидрофобная, наоборот, к повышению. Дело здесь заключается, по-видимому, в том, что несмотря на то, что гидрофобная модификация приводит к ослаблению межсубъединичного контакта, наличие остатков жирной кислоты на поверхности белковой молекулы затрудняет выход полипептидных цепей в водный раствор, т.е. затрудняет разворачивание белковой глобулы. В свете таких представлений гидрофилизация белка может способ-

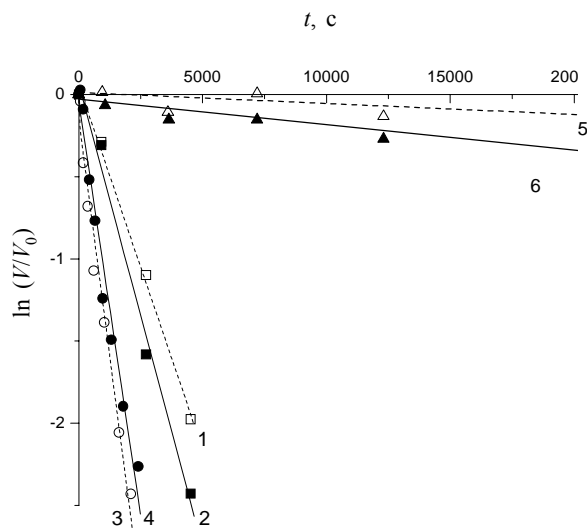


Рис. 3. Зависимость логарифма остаточной ферментативной активности ГО от времени: 1 – нативная и 2 – модифицированная N-гидроксисукцинимидом пальмитиновой кислоты ГО в воде, 3 – нативная и 4 – модифицированная ГО в присутствии 0,01 М SDS, 5 – нативная и 6 – модифицированная ГО (калий-фосфатный буфер 0,02 М, рН 7; 60°)

ствовать его “растворению” в воде, т.е. облегчает переход глобулы в развернутое состояние.

Сравнительное исследование термостабильности нативной и модифицированной ГО из *Aspergillus Niger* дало принципиально иные результаты.

На рис. 3 приведены зависимости логарифма остаточной ферментативной активности от времени инактивации для нативной и модифицированной ГО при 60° (прямые 1 и 2 соответственно). Константа термоинактивации при 60° для нативного фермента в водной среде составляет  $4,43 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ , а для гидрофобизованного  $5,63 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . Видно, что гидрофобная модификация практически не влияет на термостабильность фермента в водной среде.

В настоящее время существует проблема сохранения каталитической активности ферментов при высоких температурах, в присутствии ПАВ. Известно, что неионные ПАВ незначительно уменьшают активность ГО, однако в присутствии ионных ПАВ, таких как SDS или СТАВ, активность существенно ухудшается.

Нами была изучена термостабильность нативной и модифицированной ГО в присутствии SDS при 60° (прямые 3 и 4 на рис. 3 соответственно). Константа термоинактивации при 60° для нативного фермента в водной среде в присутствии SDS составляет  $11,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ , а для гидрофобизованного  $10 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . Гидрофобная модификация практически не влияет на термостабильность

данного фермента в водной среде в присутствии SDS. Добавка SDS приводит к потере термостабильности ГО примерно в 2 раза.

Помимо влияния ПАВ в прямых мицеллах, нами было изучено влияние обращенных мицелл анионного ПАВ, Аэрозоля ОТ (АОТ). Термостабильность нативной и модифицированной ГО в системе АОТ–вода–октан представлена на рис. 3 (прямые 5 и 6). Отметим, что уровень каталитической активности в системе обращенных мицелл нативной и гидрофобизованной ГО практически не отличается от водной среды, тогда как термостабильность исследуемых препаратов фермента существенно изменяется при переходе от воды к мицеллярной системе. Константа термоинактивации при 60° для нативного фермента в системе обращенных мицелл составляет  $1,2 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ , а для гидрофобизованного  $1,0 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ . В то время как в водной среде уменьшение ферментативной активности в 2 раза происходит за 25 мин, в системе обращенных мицелл ГО теряет половину активности за 18 ч (т.е. стабильность повышается в 40 раз).

Наблюдаемый выше стабилизационный эффект, по-видимому, обусловлен тем, что в системе обращенных мицелл ГО образует прочный комплекс с мицеллярной матрицей, что затрудняет конформационную подвижность белка, в том числе его разворачивание, вследствие чего повышается термостабильность.

Работа была частично финансирована грантом правительства Израиля.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plou F.J., Ballesteros A. // FEBS Lett. 1994. **339**. P. 200.
2. Kabanov A.V., Levashov A.V., Alakhov V.Y. // Protein Engineering. 1989. **3**. P. 39.
3. Кабанов А.В., Левашов А.В., Матинек К. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1986. **27**. P. 591.
4. Torchilin V.P., Maksimenko A.V., Smirnov N.V., Berezin I.V., Martinek K. // Biochem. Biophys. Acta. 1979. **568**. P. 1.
5. Leach S.J., Boyd H. // Biochem. Biophys. Acta. 1977. **534**. P. 522.
6. Угарова Н.Н., Бровко Л.И., Рожкова Г.Д., Бerezin И.В. // Биохимия. 1977. **42**. P. 1212.
7. Угарова Н.Н., Рожкова Г.Д., Бerezin И.В. // Биохимия. 1978. **43**. P. 1382.
8. Ugarova N.N., Rozhkova G.D., Berezin I.V. // Biochem Biophys. Acta. 1979. **570**. P. 31.
9. Levashov A.V., Rariy R.V., Martinek K., Klyachko N.L. // FEBS Lett. 1993. **336**. P. 385.
10. Парий Р.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В. // Биоорг. хим. 1994. **20**. P. 249.
11. Baek W-O, Vijayalakshmi M.A. // Biochem. Biophys. Acta. 1997. **1336**. P. 394.
12. Mozhaev V.V., Siksnis V.A., Melik-Nubarov N.S., Galkantaite N.Z., Denis G.J., Butkus E.P., Zaslavsky B.Y., Mestechkina N.M., Martinek K. // Eur. J. Biochem. 1988. **173**. P. 147.
13. Olden K., Parent J.B., White S.L. Biochimica et Biophysica. 1982. **650**. P. 209.
14. Schwarz R.T., Datema R. // Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry. 1982. **40**. P. 287.
15. Можяев В.В. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1989.
16. Hodman C.D. // Handbook of chemistry and physics. Claveland, 1951. P. 1414.
17. Wilson R., Turner A. // Biosens. Bioelectron. 1992. **7**. P. 165.
18. Тишков В.И. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1993.
19. Baszkin A., Boissonnade M.M., Rosilio V., Kamysny A., Magdassi S. // J. colloid and interface science. 1997. **190**. P. 313.
20. Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. // J. Mol. Biol. 1994. **236**. P. 759.
21. Попов В.О., Тишков В.И., Дайниченко В.В., Егоров А.М. // Биохимия. 1983. **48**. 747.
22. Garza-Ramos G., Tuena de Gomez-Puyou M., Gracy R.W. // Eur. J. Biochem, 1992. **208**. P. 389.
23. Fields R. // J. Biochem. 1971. **124**. P. 581.
24. Alder-Nissen J. // Agric. Food Chem. 1979. **27**. P. 1256.
25. Трофимова Д.Н., Левашов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Хим. 2000. **41**. С. 390.
26. Трофимова Д.Н., Левашов А.В. // Биоорг. хим. 2002 (в печати).

Поступила в редакцию 25.10.02