

Институт молекулярной медицины
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский
университет)
Московская школа на Юго-Западе № 1543
Кафедра биологии

**Изучение ферментативной активности коммерческих препаратов
бромелаина для применения в зубных пастах**

Исполнитель:

М. Соколов

Научный руководитель:

д.б.н. А. А. Замятнин

Москва 2018

Оглавление

Введение	3
Обзор литературы	6
1.1 Классификация и характеристика зубных паст	6
1.2 Перспективные добавки в составе зубных паст	8
1.3 Бромелаин, его свойства и применение	8
1. Материалы и методы	11
2. Результаты и обсуждение	15
Выводы	19
Благодарности	20
Список литературы	21

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время зубные пасты являются наиболее распространенными средствами ухода за полостью рта. Среди них можно выделить две основные группы: гигиенические и лечебно–профилактические (противокариозные) зубные пасты [1].

Гигиенические зубные пасты предназначены, главным образом, для удаления зубных отложений и частично — для дезодорации полости рта. При этом они состоят из абразивных, связующих, увлажняющих, пенообразующих, вкусоароматических веществ, красителей и консервантов, но не содержат специальных добавок. Лечебно-профилактические зубные пасты, кроме известных стандартных компонентов, содержат также активные добавки, воздействующие на определенный патологический процесс в полости рта. Они предназначены как для повседневного ухода за полостью рта, так и для целенаправленной профилактики возникновения кариеса зубов, заболеваний пародонта, некариозных поражений, заболеваний слизистой оболочки полости рта [1].

Противокариозные зубные пасты укрепляют минеральные ткани зуба и предупреждают образование зубного налета. Это достигается путем введения в состав зубных паст соединений фтора, фосфора и кальция [1].

Однако фтор-содержащие зубные пасты имеют ряд недостатков. В частности, применение таких паст может приводить к излишнему накоплению фтора в организме. Так, в среднем, дневная норма потребления фтора человека составляет примерно 2-3 мг, получаемая, в основном, с пищей и водой. Избыточное потребление этого элемента может приводить к неблагоприятным последствиям: нарушению обмена веществ, что ведет к разрушению костей, нарушению работы эндокринной системы, повышению риска онкологических заболеваний, снижению иммунитета, возможности химической реакции, приводящей к появлению негативно влияющих на организм веществ [2].

В связи с этим, возникла потребность поиска альтернативных активных компонентов, также обладающих противокариозным действием. В настоящее время перспективным направлением является введение в состав зубных паст ферментов, в частности бромелаина.

Бромелаин - это протеолитический фермент растений семейства бромелиевые, в частности ананаса, сходный по функциям с папаином и фицином. Препараты бромелаина представляют собой гетерогенную смесь несколько цистеиновых протеиназ. Протеолитические ферменты растительного происхождения, такие как папаин и бромелаин, широко применяются при производстве биологически активных добавок к пище для более успешного переваривания, в качестве компонента зубных паст, добавляются в косметические средства для коррекции кожных покровов. В случае добавления ферментов в пасты способность бромелаина расщеплять белковые молекулы позволяет рассматривать этот белок с позиции профилактики воспалительных заболеваний пародонта и предотвращения возникновения кариеса.

В связи с этим **целью** данной работы является изучение активности препаратов бромелаина разных производителей для использования в зубных пастах.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) определить количественное содержание белка в коммерческих препаратах бромелаина производства «Merck», «Bioscience» и «Venkatish» с использованием метода ВСА (бицинхониновая кислота-от bicinchoninic acid);
- 2) оценить чистоту исследуемых препаратов бромелаина методом ДСН-электрофореза в восстанавливающих условиях по методу Лэммли;
- 3) определить кинетические характеристики препаратов бромелаина производства «Merck», «Bioscience» и «Venkatish» по его способности гидролизовать синтетический модельный пептидный субстрат

Ас-PLVQ-АМС (пролин-лейцин-валин-глутамин конъюгированный с 7-Амино-4-метилкумарином).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Классификация зубных паст

В настоящее время зубные пасты являются главным средством по уходу за полостью рта. Они применяются для ополаскивания, дезодорации и защиты от разных болезней полости рта.

Зубные пасты делятся на две группы: гигиенические и лечебно-профилактические (ЛП).

Гигиенические пасты используются только для удаления пищевых остатков из зубной полости, то есть для дезодорации рта, и оказывают освежающий эффект на ротовую полость. Также их отличие от лечебно-профилактических паст в том, что в их состав не входят добавки. В основном гигиенические пасты используются для приучения детей к чистке зубов, потому что такие пасты имеют приятный вкус. Полезных свойств у этих паст практически нет.

ЛП пасты используются, как для дезодорации полости рта, так и для предотвращения разных бактериальных заболеваний, таких как кариес и другие. В состав лечебно-профилактических паст входят разные добавки.

Среди ЛП паст выделяют несколько групп:

1. *Пасты, содержащие растительные добавки;*

Улучшают обменные процессы, регенерацию тканей, способствуют уменьшению кровоточивости десен, обладают прекрасными дезодорирующими свойствами [3]. Например, паста Paradontax – препарат, изготовленный на основе природных веществ, содержит мяту перечную, мирт, шалфей, ромашку, ратанию, бикарбонат натрия, что позволяет широко использовать данную зубную пасту для профилактики и лечения воспалительных заболеваний пародонта [4].

2. *Зубные пасты, содержащие ферменты;*

Относятся к средствам гигиены с высоким очищающим действием, они растворяют мягкий зубной налет, остатки пищи, никотиновый налет, улучшая тем самым гигиеническое состояние полости рта. Именно зубные пасты, содержащие ферменты, рекомендуется применять для гигиены полости рта при лечении заболеваний пародонта и слизистой оболочки полости рта в фазу обострения [1].

3. Пасты с фтором

Одной из самых важных добавок в противокариозные пасты является фторсодержащие вещества.

Фтор - самый активный элемент периодической таблицы Менделеева. Исследования эффективности добавок фторидов в зубные пасты начаты в 1945 г. в США. На протяжении более 50 лет в зубные пасты, предназначенные для профилактики кариеса, вводились различные фториды. Первые исследования, проведенные американцем Бибби в 1945 г. с использованием фторида натрия были неудачными, поскольку зубные пасты, производимые в то время, не обеспечивали активное состояние ион - фтора. Понадобилось около 20 лет упорных исследований по совершенствованию рецептур зубных паст и поисков эффективных фторидов. Усовершенствование зубных паст осуществлялось тремя путями: использование абразивных веществ, не содержащих кальция и фосфат (чтобы не «связывать» фтор); увеличение концентрации монофторфос-фата до 0,76% (Na_2FPO_3); сочетание активных фторидов в виде монофторфосфата и фторида натрия [5].

Фтор попадает в организм человека с водой и пищей. Требуемая доза фтора в день от 0,05 до 0,1 мг на один килограмм. Чрезмерное употребление фтора может привести к различным последствиям. Вот примеры негативного влияния фтора на зубы и организм:

1. Заметное разрушение костного материала.
2. Нарушение работы щитовидной и паращитовидной железы

3. Нарушение функциональных характеристик нервной системы
4. Нарушение процессов метаболизма в организме
5. Появление пятен на эмали зубов [5].

Перспективные добавки в составе зубных паст

Из-за того, что фтор может пагубно повлиять на организм человек. Ученые начали искать новые добавки, способные положительно влиять на зубы. В настоящее время большое внимание уделяется поиску новых биологически активных веществ (БАВ). Поиск и сравнительное изучение свойств синтетических и природных веществ, а также их смесей для повышения лечебно-профилактических качеств зубной пасты является актуальной задачей. Сохранение первоначального качества зубных паст на протяжении всего срока годности, заявленного производителем, а также повышение безопасности для здоровья зубных паст является важной проблемой и имеет практическое значение. Разработка и изготовление косметической продукции с определенными лечебно-профилактическими свойствами основана на подборе необходимого состава не только БАВ, но и компонентного состава рецептур. Такой подход к решению проблемы дает возможность получения инновационных, косметических продуктов с новыми свойствами.

В связи с этим углубленное изучение химического состава компонентных смесей, а также особенностей структуры и свойств, вводимых в изделия БАВ, совершенствование технологии производства и методологии разработки рецептур для создания конкурентоспособных изделий, в частности зубных паст, является актуальным и своевременным [6].

Бромелаин, его свойства и применение

Одним из БАВ может служить протеолитический фермент - бромелаин, относящийся к классу цистеиновых протеиназ. Такие протеиназы

расщепляют белковые молекулы на составляющие их аминокислоты, посредством гидролиза пептидной связи. В состав этих протеиназ входит цистеин, а активность зависит от тиольной группы (SH-группы).

Впервые бромелаин был получен Маркано в 1891 г.. Он выделил его из анансового сока.

Известно, что этот фермент содержится в стебле, кожуре и сердцевине ананаса. В последнем его концентрация выше всего, поэтому из сердцевины добывать его легче и эффективнее.

Для получения высокочистого бромелаина необходимо несколько процессов, такие как экстракцию, очистку, сушку и упаковку [7].

Экстракция бромелаина из плода ананаса начинается с измельчения безводной сердцевины в соковыжималке. В итоге получается желтоватый порошок [7].

Очистка может проводиться с помощью трех методов: центрифугирование, ультрафильтрация, лиофилизация. Центрифугирование приводит к высвобождению ферментов. Чтобы отделить бромелаин от остальных ферментов проводится ультрафильтрация-это процесс мембранного разделения высокомолекулярных веществ. Ультрафильтрационные мембраны имеют отсечки от 3 до 100 кДа. В процессе ультрафильтрации происходит разделение по молекулярным массам ферментов, что дает возможность отобрать ферменты с нужной молекулярной массой-28кДа[7]. Далее происходит лиофилизация. Раствор, полученный после ультрафильтрации, высушивается. Вначале он замораживается, а затем вода убирается путем сублимации льда [7]. В итоге получается порошок с нужным ферментом.

Бромелаин состоит из 220 – 230 аминокислот и имеет молярную массу ~ 28 кДа [8] и является смесью белков.

Фермент обладает различными свойствами. Одно из них помощь в похудении. Ряд первых исследований действительно говорили о том, что этот

фермент способствует похудению. Тестированию подвергались порции вещества, и они вправду демонстрировали эффект уменьшения массы тела у подопытных животных. Однако спустя пару лет технология получения вещества была улучшена, и его стали выделять в более чистом виде, нежели вначале. Примерно с этого времени период успешных экспериментов завершился, а исследования стали давать неоднозначные и противоречивые результаты. Тем не менее, первый успех уже привел к тому, что бромелаин стал заочно считаться средством от ожирения. А когда специалисты стали подробнее изучать его действие на метаболизм, оказалось, что он не только не помогает избавляться от лишнего веса, но и при определенных условиях даже может нанести вред здоровью [9].

В последнее время бромелаину приписывают ряд терапевтических преимуществ, таких как обратимое ингибирование агрегации тромбоцитов, облегчение борьбы с бронхитом, улучшение восстановления после хирургических повреждений и усиление абсорбции лекарств, в частности для антибиотиков. Одно из самых важных применений бромелаина в фармацевтике - это ферментативная обработка некротических тканей, полученных в результате язв и ожогов. Также бромелаин используется для лечения людей больных раком. Также он участвует в разрушении раковых масс и уменьшении метастазов у пациентов с раком яичника и молочной железы. Бромелаин может оказывать противоопухолевое действие путем остановки производства цитокинов [8].

Бромелаин активен в диапазон pH 5,5-8,0 и теряет свою протеолитическую активность при нагревании в течении 10 минут при температуре 100 С°[8].

Бромелаин, входящий в состав зубных паст, помогает справиться с кариесом и болезнями пародонта и также имеет очищающие свойства [9]. Бромелаин удаляет остатки пищи с зубов и предотвращает их повторное появление. Тем самым это показывает, что зубные пасты с добавлением

биологически активных компонентов так же эффективны, как и пасты, содержащие фтор и другие элементы [9].

2. Материалы и методы

Материалы

В работе были использованы коммерческие препараты бромелаина компаний-производителей «Merck», «Bioscience» и «Venkatish»; синтетический пептидный субстрат Ac-PLVQ-MCA, реагенты для приготовления буферов компании «Sigma».

Методы

Количественное определение содержания белка с использованием набора ВСА

Набор ВСА (Sigma) содержит раствор бицинхониновой кислоты (сокр. ВСА) в буфере с pH 11,25, имеющем в своем составе карбонаты, бикарбонаты и тартраты натрия и 4%-ный раствор 5-водного сульфата меди (II). Метод ВСА основан на взаимодействии ионов Cu^{2+} с белками в щелочных условиях, что приводит к переходу катионов Cu^{2+} в Cu^+ , которые детектируются с высокой чувствительностью бицинхониновой кислотой. При этом зеленый цвет реагента меняется на пурпурный, а интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации белка в растворе. В основе метода лежат две реакции. Первая реакция протекает при низких температурах и является результатом взаимодействия меди и ВСА с аминокислотными остатками цистеина, цистина, триптофана и тирозина. При повышении температуры пептидная связь ответственна за развитие окраски. ВСА образует комплекс с Cu^+ , который имеет максимум поглощения при 562 нм. Преимущество этого реагента в том, что он не взаимодействует со многими компонентами буферных смесей, особенно с детергентами. Этот метод можно использовать для измерения белка в широком диапазоне:

линейность калибровочного графика наблюдается в диапазоне концентраций от 0,2 до 1 мг/ мл [10].

Навески бромелаина массой 1-8 мг растворяли в 1 мл бидистиллированной воды, ресуспендировали до полного растворения и центрифугировали при 10000xg в течение 5 мин при 4°C. Надосадочную жидкость отбирали и использовали для измерения концентрации методом ВСА. Для этого к 30 мкл белковой пробы/воды добавляли 600 мкл ВСА и 12 мкл CuSO_4 , перемешивали на вортексе и реакционную смесь выдерживали в течение 30 мин при 37°C. Далее измеряли поглощение пробы при 562 нм и на основании калибровочной кривой (построенной с белком бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта) определяли концентрацию белка в пробе (мг/мл).

ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле по методу Лэмбли

Электрофорез белков в полиакриламидном геле – это метод разделения белков. В настоящее время электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (SDS-PAGE) является общепринятым методом определения гомогенности белковых препаратов. Метод основан на свойстве заряженных частиц (молекул) перемещаться под действием электрического поля. Обычно скорость миграции зависит от трех параметров анализируемых белков: величины молекул, формы молекул и суммарного заряда. Поэтому предварительно белки денатурируют с тем, чтобы скорость миграции зависела только от молекулярной массы. Для этого анализируемую смесь обрабатывают додецилсульфатом натрия ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$), который представляет собой детергент (моющее средство) с сильно выраженными амфифильными свойствами. Под действием ДСН белки диссоциируют на субъединицы и денатурируют. Развернутые полипептидные цепи связывают ДСН и приобретают отрицательный заряд.

Для полной денатурации в среду добавляют тиолы, которые расщепляют дисульфидные мостики [11].

В работе использовался ДИСК - электрофорез, то есть используют гель, состоящий из двух частей. В работе применяли двойной электрофорез с использованием геля, состоящего из двух частей: концентрирующего и разделяющего. Концентрирующий гель имеет рН 6,8 и концентрацию полиакриламида от 2 до 8%. Разделяющий гель имеет рН 8,5-9 и концентрацию полиакриламида от 5 до 20%. Выбор плотности геля зависит от молекулярных масс исследуемых белков. Все буферы не содержат неорганических солей, основным переносчиком тока в них является глицин. При рН 6,8 суммарный заряд молекулы глицина близок к нулю. Вследствие этого для переноса определенного заряда (который определяется силой тока в электрофоретической ячейке), отрицательно заряженные комплексы полипептидов с ДСН должны двигаться с большой скоростью. При рН 8,8 глицин приобретает отрицательный заряд, вследствие чего на границе концентрирующего и разделяющего гелей белки резко тормозятся (в переносе одинакового заряда через единицу площади теперь участвует гораздо больше заряженных молекул, следовательно, они двигаются с меньшей скоростью). Результатом этого является концентрирование белков на границе гелей, что очень сильно повышает разрешающую способность метода. В разделяющем геле белки мигрируют в зависимости от длины полипептидной цепи, то есть обратно пропорционально молекулярной массе [11].

Подготовка концентрирующего и разделяющего гелей

Таблица 1

Реагенты для 14% геля	Разделяющий гель, V, мл	Концентрирующий гель, V, мл
-----------------------	-------------------------------	-----------------------------------

Вода	1, 4	1, 2
1,5М трис-НСl буфер рН 8,8/ 0,5М трис-НСl буфер рН 8,8	1, 25	0, 5
30% р-р акриламида	2, 3	0, 3
10% ДСН	0, 05	0, 02
Персульфат аммония	0, 03	0, 01
ТЕМЕД	4	-

Окрашивание и отмывка геля

Окрашивание геля проводят с помощью Кумасси R250

Состав:

200 мг Кумасси G-250

50 мл ледяной уксусной кислоты

250 мл метанола

200 мл воды

Отмывка геля происходит с помощью раствора для обесцвечивания

Состав:

100 мл метанола

100 мл уксусной кислоты

800 мл воды

Определение молекулярных масс и чистоты белков

Молекулярные массы белков определяют по сравнению их подвижностей с подвижностью нескольких белков-маркеров известной молекулярной массы. В работе использовались молекулярные массы маркеров 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17, 10 кДа.

Пробы для нанесения содержали 3 мкг белка в 30 мкл буфера для проб, имеющий состав

Измерение ферментативной активности препаратов бромелаина.

Активность препаратов бромелаина была исследована в присутствии пептидного субстрата Ас-PLVQ-АМС путем мониторинга флуоресценции высвобожденного АМС (МЕТКА 7-АМИНО-4 метил-КУМАРИН) в зависимости от времени. Анализ проводили при 25°C в реакционной смеси, содержащей 20 нМ фермента и различные концентрации Ас-PLVQ-АМС (6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100 мкМ) в 100 мМ натрий-ацетатном буфере, рН 5,6, содержащем 0,5% ДМСО.

На основании полученных значений концентрации белка в препаратах бромелаина и молекулярной массы бромелаина (около 28000 Да) рассчитывали объем пробы с содержанием 20 нМ белка для проведения реакции с субстратом. Для этого исходный раствор белка (0,54-0,70 мг/мл, табл. 2) необходимо многократно развести в реакционном буфере для получения 20 нМ.

Флуоресценцию контролировали на длине волны возбуждения 360 нм и длине волны излучения 460 нм с использованием флуориметра GloMax-Multi Detection System (Promega). Скорость реакции определялась по начальному наклону кривых накопления флуоресцентного сигнала. Произвольные флуоресцентные единицы были переведены в количество гидролизованного субстрата с использованием стандартной кривой, полученной из измерений флуоресценции известных концентраций АМС. Все ферментативные реакции проводили в трех повторностях.

Полученные данные обрабатывали с помощью ПО SigmaPlot 12.5.

3. Результаты

3.1. Определение содержания белка с использованием набора ВСА

Результаты представлены в Табл. 2

Таблица 2

Препарат бромелаина	Конц-ция по ВСА, мг/мл*	Объем белковой пробы** с содержанием 20нМ белка, мкл	Концентрация белка в навеске, %
Merck	0,54	1,9	46
	0,57	2	
	0,58	2,1	
Bioscience	0,67	1	40
	0,70	1,7	
	0,65	1	
Venkatish	0,63	2	8
	0,56	2	
	0,63	2	

*измерения проводили в 3-х повторностях

** - в пересчете на объем реакционной смеси реакции с субстратом, равным 100 мкл с учетом определенных разведений для каждой пробы.

3.2 Результаты, полученные при электрофорезе

По результатам электрофореза можно сказать, что самым чистым препаратом оказался бромелаин компании «Merck», а самым загрязненным разными добавками бромелаин компании «Venkatish» (см. Рис.1). Также на основе электрофореза можно сделать вывод, что молярная масса всех трех препаратов равна примерно 28 кДа.

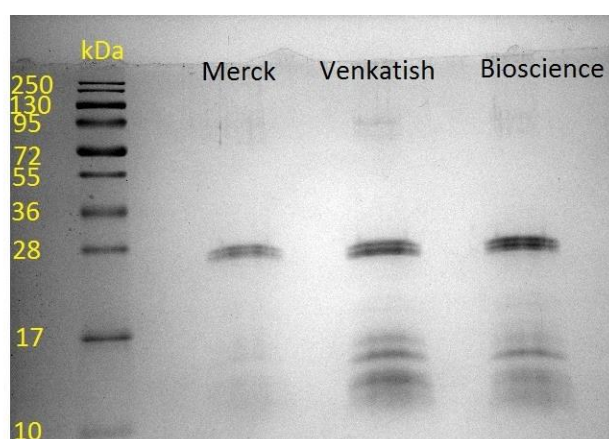


Рис.1 Электрофореграмма препаратов бромелаина (нанесение – 3 мкг белка на дорожку).

3.3 Активность препаратов

Проведено определение кинетических характеристик реакции различных препаратов бромелаина с флуорогенным субстратом. Оценивались следующие параметры:

V_{max} - та скорость, при которой весь фермент связан с субстратом

K_m -та концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной скорости

K_{cat} -величина, показывающая эффективность превращения субстрата в активном центре фермента.

K_{cat}/K_m

$V=(V_{max}*[S])/(K_m+[S])$ – уравнение Михаэлиса-Ментен

Активность белка определяли по его способности гидролизовать синтетический модельный пептидный субстрат PLVQ, конъюгированный с 7-Амино- 4-метилкумарином (АМК), с определением продуктов гидролиза по интенсивности флуоресценции свободного АМК. Полученные данные приведены на графике (см. Рис.2).

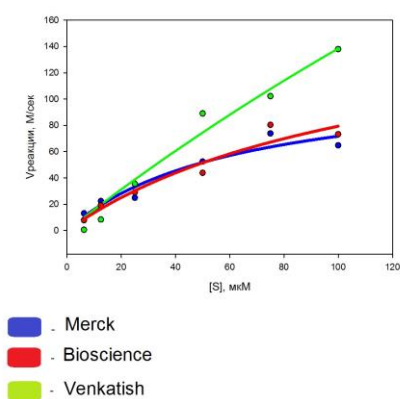


Рис.2 Кривые зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.

Таблица 3

	K_{cat} , 1/sec ($V_{max}/[E]_0$), каталитическая константа	K_{cat}/K_m , мкМ/сек	K_m , мкМ, константа Михаэлиса	V_{max} , М/сек, максимальная скорость реакции
Merck	5845000	92925, 28	$62,9 \pm 35$	$116,9 \pm 32,5$
Bioscience	6125000	89546, 79	$60,3 \pm 32$	$97,3 \pm 26,2$
Venkatish	16595000	101250, 8	$118, 3 \pm 87$	$173,1 \pm 80,1$

Выводы

1. Было показано, что препарат бромелаина фирмы «Merck» обладает большей степенью чистоты по сравнению с другими

2. Белковое содержание в препарате бромелаина компании Merck составило ~ 46%, в препарате бромелаина компании Bioscience составило ~ 40%, в препарате бромелаина компании Venkatesh ~ 8%

3. В соответствии с исследуемыми кинетическими характеристиками препаратов бромелаина было показано, что наибольшей активностью в отношении субстрата PLVQ обладает препарат компании «Merck»

Благодарности

Я благодарю Сергея Менделевича Глаголева за организацию практики.

Я благодарю Андрея Александровича Замятина за предоставленную возможность работать в лаборатории института молекулярной медицины.

Я благодарю Ксению Вячеславовну Баринову за введение в основы биохимии и помощь в обработке результатов в ПО SigmaPlot.

Я благодарю Людмилу Владимировну Савватееву за научное консультирование.

Список литературы

1. Научно-исследовательская работа: Григорьева Д., Зубная паста: свойства и действие на ротовую полость человека. 2015. 13 с.
2. Narsimha A., Elevated fluoride concentration levels in rural villages of Siddipet, Telangana State, South India. Data in brief Journal, 2017, V. 16, № 11, p. 693-699
3. Кравчук П. С., Влияние лечебно-профилактических зумных паст с аминофторидом и бромелаином на минеральный обмен в эмали зубов и эффективность индивидуальной профилактики кариеса, Journal disserCat, 2007, с.122
4. Rajesh Hosadurga, Vinita Ashutosh Bolor, Sudharshan N. Rao, N. MeghRani. Effectiveness of two different herbal toothpaste formulations in the reduction of plaque and gingival inflammation in patients with established gingivitis. Journal of traditional complementary medicine, 2017, V. 8, №1, p. 113 - 119
5. Лобко С.С., Шульга О.А., Фторсодержащие зубные пасты и здоровье полости рта. Медицинские новости, 2015, №3, с.246
6. Воронцова, Н.Н. Оптимизация состава комплекса БАВ [Текст] // Хранение и переработка сельхозсырья, 2008, №12, с.47-49.
7. Ramli A., Aznan T., Ilias R. Bromelain: from production to commercialisation. Science of Food and Agriculture, 2017, V.97, № 7, p. 1386-1395
8. Amid Nurul A., Ismail Faridah A., Hamzah Y., Salleh M. Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain from Ananas comosus. Process Biochemistry Journal, 2011, V.46, № 12, p. 2232-2239
9. Кунин А.А., Оценка эффективности зубной пасты с бромелаином. Здоровые факты, 2006, с. 38 - 44

10. Степанченко Н.С., Новикова Г.В., Мошков И. Е. Количественное определение белка. Физиология растений, 2011, Т.58, № 4, с.624-630
11. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.