CZU: 542.943`78:539.199
https://doi.org/10.59295/PRTEP2023_10

10. PROPRIETĂȚI STRUCTURALE ȘI MECANISME DE INTERACȚIUNE ALE UNOR MACROMOLECULE CU ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ CERCETATE PRIN METODA DE ÎMPRĂȘTIERE LA UNGHIURI MICI

Lilia CAZACU (ANGHEL)
Institutul de Chimie, Universitatea de Stat din Moldova

Rezumat. Studierea proprietăților structurale și a interacțiunilor asociative ale componentelor bioactive precum moleculele proteice prezintă un interes deosebit pentru extinderea spectrului de aplicații industriale sau optimizarea celor deja existente. Astfel, scopul acestei cercetări este de a studia structura unor proteine cu activitate antioxidantă precum lactoferina, glucoxidaza, β-lactoglobulina, utilizând metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X/ neutroni.

Cuvinte cheie: lactoferină, glucoxidază, β-lactoglobulină, antioxidanți, împrăștiere la unghiuri mici, raze-X, neutroni.

STRUCTURAL PROPERTIES AND INTERACTION MECHANISMS OF SOME MACROMOLECULES WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY STUDIED BY THE SMALL ANGLE SCATTERING METHOD

Summary. *Studying the structural properties and associative interactions of bioactive components such as protein molecules is of particular interest for expanding the spectrum of industrial applications or optimizing existing ones. Thus, the purpose of this research is to study the structure of some proteins with antioxidant activity such as lactoferrin, glucooxidase, β-lactoglobulin, using the X-ray/neutron small angle scattering method.*

Keywords*: lactoferrin, glucooxidase, β-lactoglobulin, antioxidants, small angle scattering, X-rays, neutrons.*

1. INTRODUCERE

Cercetarea antioxidanților alimentari și asocierii lor cu multiple beneficii asupra sănătății, prezintă un domeniu de interes ce a luat amploare în ultimii ani, multe studii concentrându-se asupra vitaminelor, polifenolilor, proteinelor şi polizaharidelor dietare și interacțiunii acestora pentru identificarea noilor utilizări sau îmbunătățirea aplicațiilor deja existente. Ca urmare au apărut noi concepte și noi tipuri de produse care să ajusteze carențele alimentare și să vină în sprijinul menținerii stării de sănătate a organismului. Au apărut

astfel alimentele funcționale și suplimentele alimentare care prin compușii biologic activi contribuie la menținerea stării optime de sănătate. Utilizarea componentelor bioactive (precum proteine, enzime, vitamine, polifenoli, fosfolipide) ca și constituenți ai alimentelor funcționale sau ai nutraceuticelor – nutrienți farmaceutici standardizați [1], necesitatea elaborării cărora a apărut odată cu reducerea consumul de medicamente și promovarea unui mod sănătos de viață [2,3]. Este necesar de menționat definiția convențional acceptată de legislația Uniunii Europene (EC 1924/2006) pentru alimentele funcționale, care prezintă grupul de produse alimentare cu funcție specifică „fiziologică" care fiind consumate ca parte a dietei obișnuite, acestea oferă efecte asupra sănătății care depășesc efectele nutriționale tradiționale [4]. În acest sens, cercetarea proprietăților structurale și a interacțiunilor asociative ale componentelor bioactive precum moleculele proteice prezintă un interes deosebit pentru a înțelege mai bine mecanismul de acțiune al acestora.

Scopul acestui studiu constă în cercetarea structurii unor proteine cu activitate antioxidantă precum lactoferina, glucoxidaza, β-lactoglobulina, utilizând metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X/ neutroni pentru o înțelegere mai bună a mecanismelor de interacțiune ale acestora.

2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Macromoleculele proteice și polizaharidele sunt complexe structural, astfel că înțelegerea mecanismelor de interacțiune presupune înțelegerea principiilor de formare a moleculelor proteice precum și organizarea structurală a acestora. Astfel, pentru studierea proteinei de interes este important de stabilit o abordare separată specifică în care să se țină cont de construcția chimică, arhitectura precum și funcția biologică pe care aceasta o exercită.

Metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X (*Small Angle X-ray/ Neutron Scattering*, SAXS/ SANS) este o tehnică fundamentală de analiză a structurii materiei condensate, ce oferă informații despre dimensiunea, forma și structura internă a materiei cercetate. Metoda de împrăștiere la unghiuri mici este utilizată cu succes în domenii de cercetare precum fizica materiei condensate, biologia moleculară, biofizică, ș.a. Această metodă are la bază fenomenul de interacțiune a razelor-X de lungimi de undă mici (0,1 – 0,2 nm) cu materia. Comparativ cu difracția de raze-X, SAXS nu permite identificarea structurii atomice a materialelor.

În timpul unei măsurători SAXS fasciculul monocromatic incident este direcționat spre eșantionul ce conține soluția cu particule coloidale sau macromolecule. În rezultatul interacțiunii fasciculului de raze-X cu eșantionul analizat are loc împrăștierea elastică a razelor-X la unghiuri mici față de fasciculul de raze incidente. În metoda împrăștierii la unghiuri mici se măsoară intensitatea fasciculului împrăștiat de raze-X și este determinată ca funcție a unghiului de împrăștiere 2θ, care este proporțional cu vectorului de împrăștiere q, definit ca diferența dintre vectorul incident (k_i) și vectorul de împrăștiere (k_s) $q = k_s - k_i$, prezentat în Figura 1.

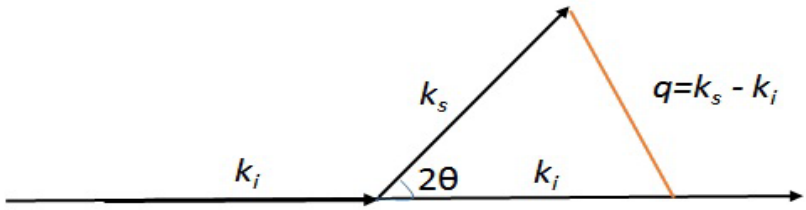


Fig. 1. *Definirea vectorului de împrăștiere q ca diferența dintre vectorul de incidență k_i și vectorul de împrăștiere k_s*

Acest fenomen are la bază împrăștierea elastică a radiației electromagnetice de către particule de dimensiuni mult mai mici sau de dimensiuni de același ordinul cu fotonul care interacționează cu particula. Vectorului de împrăștiere este exprimat prin formula:

$$q = 4\pi \sin\theta/\lambda \quad (1)$$

2θ este unghiul de împrăștiere;

λ este lungimea de undă a fluxului incident de raze-X.

Intensitatea de împrăștiere este produsul dintre factorul de formă *P(q)* și factorul de structură *S(q)*:

$$I(q) = \frac{N}{V} P(q)S(q) \quad (2)$$

Factorul de formă oferă informații despre forma și dimensiunea particulelor sau macromoleculelor cercetate, iar factorul de structură despre interacțiunea dintre particule.

Metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu neutroni a fost utilizată pentru cercetarea conformației unor proteine cu acțiune antioxidantă în soluție (lactoferina umană, glucozoxidaza, β-lactoglobulina). Curbele experimentale obținute au fost analizate utilizând programele incluse în pachetul ATSAS.

Prima etapă în interpretarea datelor de împrăștiere la unghiuri mici constă în aplicarea unor funcții standard. Astfel, din curba de împrăștiere a fost calculată raza de girație, (R_G) în intervalul q de 0,034 – 0,096 $Å^{-1}$ utilizând aproximația Guinier:

$$I(q) = I(0)\, exp\left(\frac{-q^2 R_G^2}{3}\right) \quad (3)$$

Pentru a determina valoarea a razei de girație, din curba de împrăștiere a fost calculată funcția de distribuție folosind pachetul de programe cu destinație specială. Funcția de distribuție descrie distribuția distanțelor dintre perechile de particule într-un volum cunoscut. Funcția de distribuție a particulelor se calculează utilizând transformata Fourier indirectă:

$$p(r) = \frac{r}{2\pi^2} \int_0^\infty qI(q)\, sin(qr)dq \quad (4)$$

Parametrul *r* este distanța dintre două particule. Raza de girație este calculată din funcția de distribuție *p(r)* utilizând ecuația matematică:

$$R_G^2 = \int_0^{Dmax} r^2 p(r) dr \Big/ \int_0^{Dmax} p(r) dr \quad (5)$$

Parametrul *Dmax* este distanța maximă în interiorul particulei.

Studierea lactoferinei umane

Lactoferina este o glicoproteină cu masa moleculară de 80 kDa din familia de transferine, care posedă activitate antimicrobiană și antivirală, antioxidantă, anticancer precum și activitate prebiotică - promovând flora saprofită intestinală normală. Această proteină este membru al familiei de transferine, adică a proteinelor capabile să lege şi să transfere ionii de Fe(III). Reacția de legare a ionilor de Fe(III) este reversibilă şi dependentă de pH-ul mediului, lobul N al proteinei eliberează fierul la pH 5,0 iar lobul C reține fierul până la pH 3,5 [5,6]. Studiile experimentale au arătat că molecula de lactoferină își schimbă conformația în timpul reacţiei (Figura 2). Astfel, hololactoferina va adopta conformația închisă, pe când apolactoferina va avea conformația deschisă [7].

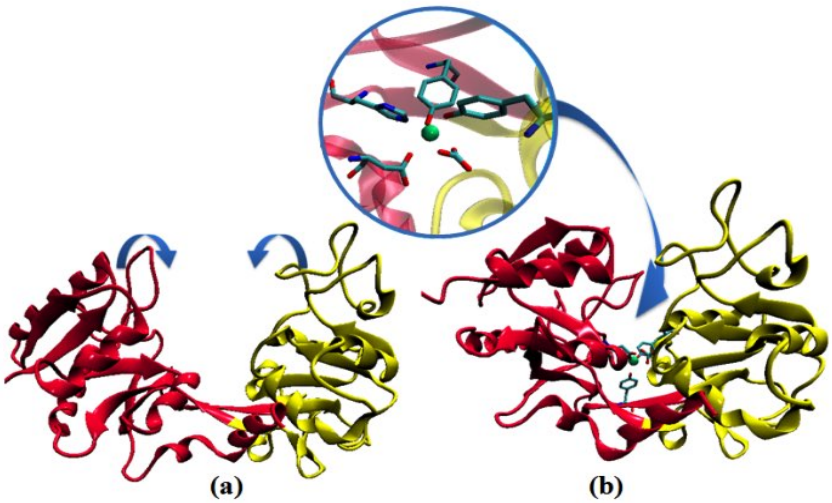


Fig. 2. *Reprezentarea grafică a lobului N al lactoferinei umane (a) în conformația deschisă și (b) în conformația închisă*

Datorită acestei particularități structurale lactoferina poate interacționa cu molecule de sarcină opusă și molecule anionice. Aceste tipuri de interacțiuni pot oferi posibilitatea de a dezvolta noi combinații de compuși biocompatibili cu activitate biologică sporită. Astfel pentru stabilirea posibililor interacțiuni dintre antioxidanți și lactoferină și pentru conceperea noilor alimente funcționale și nutraceutice este necesară cunoașterea deplină a mecanismelor moleculare ale stabilității conformaționale și interactiunile asociative ale moleculelor de antioxidanți și lactoferină.

Lactoferina umană în soluție apoasă a fost cercetată prin metoda de împrăștiere la unghiuri mic cu raze-X. Experimentul de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X a fost realizat la

spectrometrul SAXS, la fasciculul de radiație X33 al inelului de accelerare Doris, la sincrotronul DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron) din Hamburg, Germania, un institut național în care acceleratorul de particule este utilizat pentru cercetarea structurii materiei.

Prelucrarea matematică a rezultatelor experimentale înregistrate din experimentele SAXS au permis estimarea valorii razei de girație, fiind de 42,0±0,4 Å utilizând atât aproximația Guinier cât și funcția de distribuție. De asemenea, din funcția de distribuție a fost calculată distanța maximă, D_{max}=142,4±10 Å.

Pentru a obține informații despre factorul de formă al macromoleculei de lactoferină, în continuare a fost aplicată funcția Kratky, în care se construiește graficul produsului $I(q)q^2$ în funcție de q (Figura 3). Funcția Kratky este utilizată pentru evaluarea stării particulelor / macromoleculelor în soluții. Graficul Kratky obținut din curba de împrăștiere a indicat că lactoferina în soluția apoasă analizată nu este în stare monomerică. De aceea, în continuare datele au fost modelate utilizând programul SASREF din pachetul de programe ATSAS.

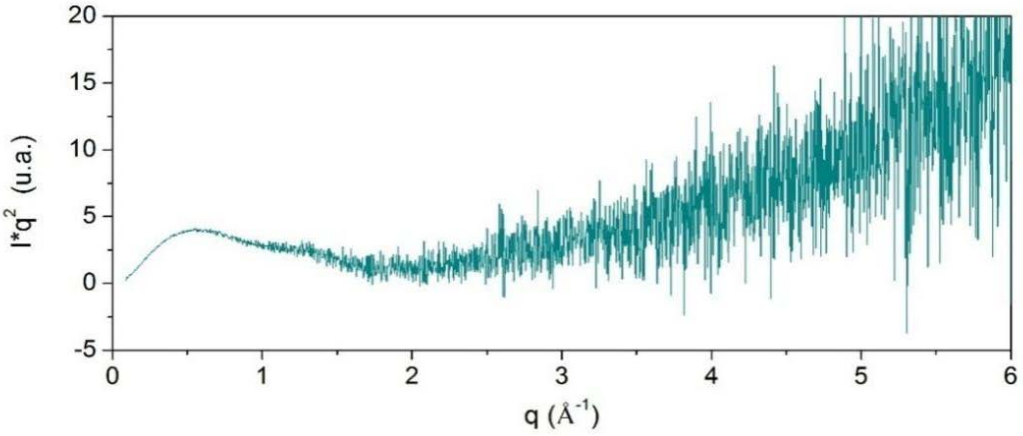
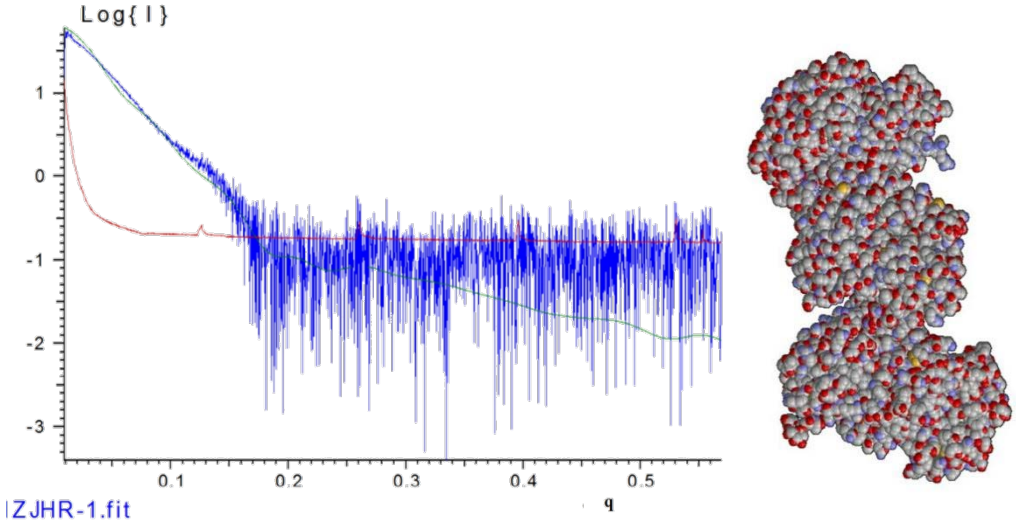


Fig. 3. *Graficul Kratky rezultat din curba de împrăștiere SAXS a complexului Fe(III)-lactoferină*

Programele SASREF și DAMAVER din pachetul de programe ATSAS au fost utilizate pentru procedurile de fittare a datelor experimentale și reconstrucția modelului 3D de rezoluție joasă a lactoferinei cercetate. Figura 4 prezintă procedura de fittare și modelul 3D obținut. Procedurile de fittare repetate ale datelor experimentale au condus la obținerea unui model al homodimerului de lactoferină. La suprapunerea modelului homodimerului de rezoluție înaltă al lactoferinei cu modelul de rezoluție joasă obținut din procedurile de fittare a datelor experimentale, se observă că cele două corespund.

Proteinele în soluție se comportă diferit, iar conformația pe care o adoptă în soluție poate să difere de cea din forma cristalină. Pentru o reproducere mai bună a rezultatelor obținute, trebuie respectate mai multe condiții. În cazul acestui studiu este necesar de creat un mediu

pentru proteina cercetată astfel ca aceasta să existe în stare monomerică în soluția apoasă. Deși dovezile experimentale obținute din măsurătorile SAXS indică asupra faptului că lactoferina umană cercetată se auto-asociază în soluții apoase, rezultând în structuri homodimerice, rezultatele obținute au permis validarea modelului de rezoluție înaltă oferit de Banca de Date pentru Proteine.



(a) ***(b)***

Fig. 4. *Modelarea homodimerului de rezoluție înaltă al lactoferinei: (a) procedura de fitare a curbei SAXS; (b) modelul 3D al homodimerului obținut*

Studierea β-lactoglobulinei

β-Lactoglobulina monomerică este o proteină globulară mică din lapte cu o masă moleculară de 18,4 kDa, din familia de proteine lipocaline. Reprezentarea grafică a β-lactoglobulinei este inclusă în Figura 5. O caracteristică importantă a acestei proteine este că se leagă cu ușurință diverse molecule hidrofobe, cum ar fi acizi grași și vitamine, carbohidrați, proteine și chiar elemente anorganice [9-11].

Adițional lactoglobulina este bine-cunoscută pentru activitatea antioxidantă pe care o posedă [12], astfel fiind atractivă pentru varii aplicații din domeniile industriei produselor cosmetice, farmaceutice și alimentație. În cadrul acestui studiu s-a propus cercetarea β-lactoglobulinei în funcție de varii factori extrinseci, precum variația concentrației proteice în soluție, prezența sării de NaCl, pH-ul și temperatura, utilizând metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X/ neutroni.

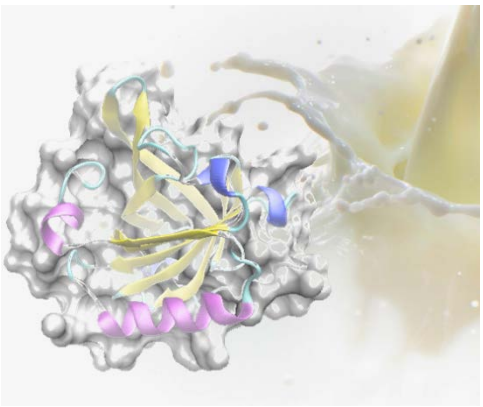


Fig. 5. *Reprezentarea grafică a β-lactoglobulinei (fișier PDB 5io5)*

Rezultatele obținute denotă faptul că β-lactoglobulina este prezentă în forma homodimerică în soluție de pH 5,7 în domeniul de concentrație proteică de 10-40 mg/mL.

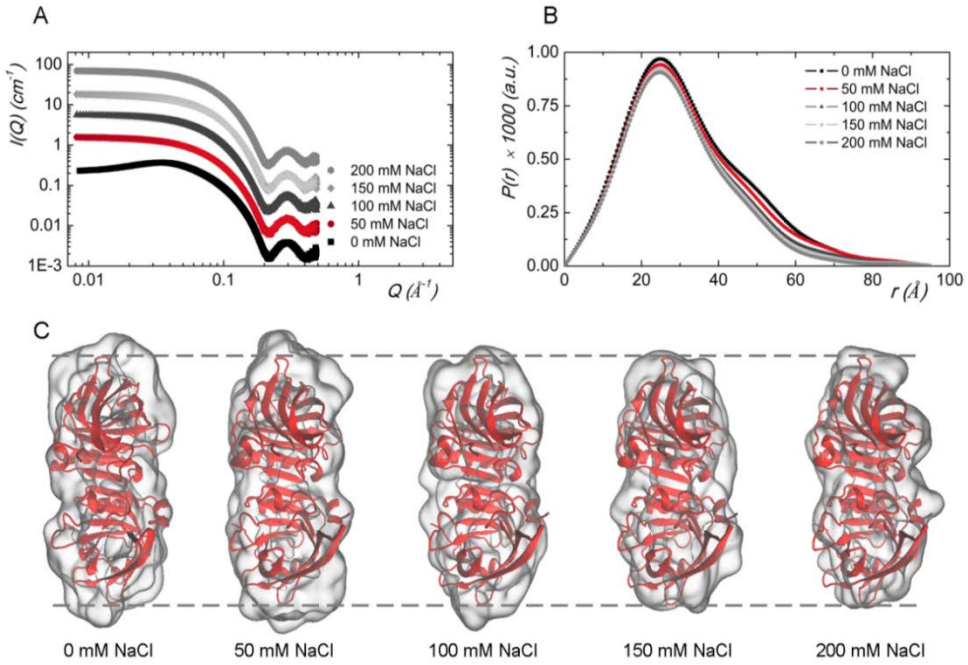


Fig. 6. *Rezultatele măsurătorilor de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X (SAXS) pentru sisteme model de β-lactoglobulină și varii concentrații de NaCl. (a) Curbele SAXS obținute pentru sisteme cu 20 mg/mL β-lactoglobulină la pH 5,9; pentru claritate, curbele au fost deplasate de-a lungul axei I(Q). (b) Funcția de distribuție P(r), calculată din curbele experimentale SAXS și modelele de rezoluție joasă, respective, prezentate în (c) suprapuse pe modelul de înaltă rezoluție al dimerului de β-lactoglobulină (fierul PDB 4lzu).*

Studiul de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X/ neutroni prezentat aici demonstrează că β-lactoglobulina formează structuri dimerice în soluție, în diferite condiții ale mediului. În intervalul de valori ale concentrației proteice de 10-40 mg/mL, β-lactoglobulina își menține forma dimerică cu o valoare a razei de girație de 23,99±0,01 Å și Dmax de 87 Å determinate prin metoda SAXS; și un Rg de 22,91±0,836 Å și Dmax de 79 Å, determinate prin metoda SANS. Mai mult, prin metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X (Figura 6) s-a constatat că la adăugarea unei concentrații de 50 mM NaCl în sistemele cercetate, β-lactoglobulina capătă valori structurele mai mari, cu Rg și Dmax crescând de la 24,65±0,02 Å și 85 Å la 25,03±0,03 Å și 95 Å. Creșterea suplimentară a concentrației de NaCl în sistemele cercetate a dus la scăderea valorilor Rg la 22,95±0,02 Å [9].

Studierea glucozoxidazei

Glucozoxidaza este o flavoenzimă dimerică cu masa moleculară de 160 kDa, din superfamilia glucozo-metanol-colină oxidoreductaze. Această enzimă conține în structura sa doi moli de flavinadenindinucleotid (FAD) ca și grupare prostetică per mol de enzimă, folosind flavinele și oxigenul molecular ca acceptor de hidrogen și un mol de proteină [13]. Reprezentarea grafică a acestei enzime este prezentată în
Figura 7.

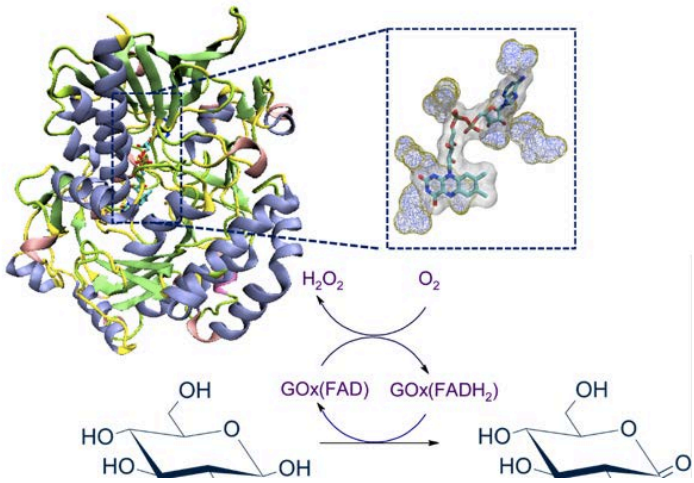


Fig. 7. *Reprezentarea grafică a glucozoxidazei și reprezentarea schematică a mecanismului reacției de oxidare a β-D-glucozei catalizată de glucozoxidaza (preluată din [15])*

Datorită aspectelor sale structurale și activității antioxidante pe care o posedă [14], glucozoxidaza are diverse întrebuințări industriale, în special industria farmaceutică, cosmetică dar și cea alimentară în care această enzimă este cunoscută pentru efectele benefice în maturizarea făinii și în îmbunătățirea produselor de panificație. Este de menționat că glucozoxidaza posedă specificitate înaltă și oxidează cu viteză mare forma de β-D a glucozei (de 160 ori mai rapid decât forma α), cu formarea de D-glucono-1,5-lactonă

și apă oxigenată. Datorită acestei specificități glucozoxidaza este întrebuințată în biosenzorii de monitorizare a indicelui glicemic la pacienții cu diabet zaharat [15].

Deși, literatura de specialitate include mai multe informații privind structura și mecanismele de interacțiune a glucozoxidazei [16,17], în continuare există un interes considerabil în cercetarea proprietăților acestei proteine pentru extinderea bioaplicațiilor. Astfel, prezentul studiu își propune să cerceteze prin metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu neutroni, stabilitatea conformațională a glucozoxidazei de *Aspergillus niger* în mediul optim în care, aceasta își va păstra proprietățile funcționale.

Glucozoxidaza în soluție pe bază de apă deuterată a fost cercetată prin metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu neutroni la facilitatea internațională, reactorul FRM-2, Centrului Heinz-Maier-Leibnitz: Neutroni pentru Cercetare, Industrie și Medicină, FRM II Reactor, Garching, Munich, Germania [16]. Rezultatele acestui studiu
(Figura 8) au permis confirmarea stabilității structurale a glucozoxidazei la valoarea pH-ului 5.9 în soluție și au permis identificarea parametrilor de structură precum raza de girație (*Rg*) și dimensiunea maximă (*Dmax*).

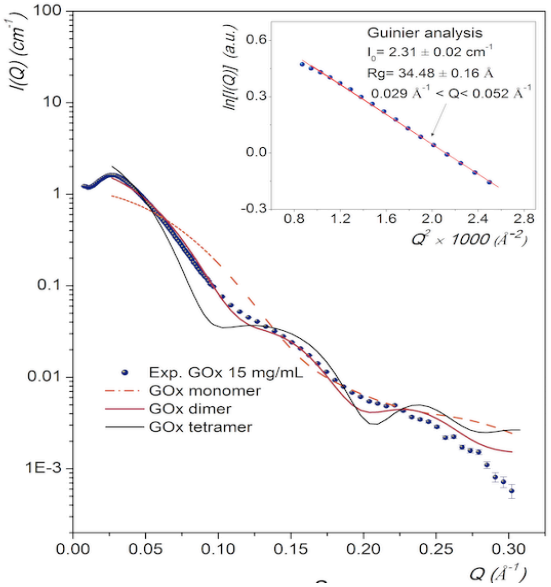


Fig. 8. *Rezultatele SANS obținute pentru probele de glucozoxidaza în soluție pe bază de apă deuterată (preluată din [16])*

Starea oligomerică funcțională a glucozoxidazei este un dimer, deși sunt disponibile dovezi din structurile cristalografice cu raze-X de înaltă rezoluție ale formelor monomerice și tetramerice (intrarea PDB 3qvr, 1gpe și 4moe). Utilizând metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu neutroni s-a demonstrat că la pH 5,9 în soluție pe bază de apă deuterată și o concentrație de 15 mg/mL, glucozoxidaza există în stare dimerică. De asemenea, modelele tridimensionale cu rezoluție scăzută ale glucozoxidazei de Aspergillus niger au fost

modelate pe baza rezultatelor SANS. Rezultatele indică faptul că structura de împrăștiere a neutronilor GOx adoptă o structură puțin mai relaxată în comparație cu modelul compact cu raze-X de înaltă rezoluție, cu o dimensiune maximă a particulelor, Dmax de 110 Å și Rg de 34,50±0,02 Å.

CONCLUZII

Stabilitatea conformațională a macromoleculelor biologice este una dintre problemele majore pentru biotehnologie, industria farmaceutică și alimentară. Definirea unei tehnici potrivite pentru studierea conformației proteinelor este esențială pentru optimizarea proprietăților proteinelor. Deși cercetări considerabile au fost dedicate structurii, stabilității conformației și mecanismelor interacțiunilor glucozooxidazei (GOx), există încă un interes continuu în studierea proprietăților acestei proteine pentru a-și extinde bio-aplicațiile. Prezentul studiu demonstrează eficiența metodei de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X/ neutroni pentru cercetarea structurii și a mecanismelor de auto-asociere a proteinelor în soluție.

NOTA DE APRECIERE

Această lucrare a fost realizată în cadrul proiectului de cercetare **Nr. 20.80009.5007.27** „Mecanisme fizico-chimice ale proceselor redox cu transfer de electroni implicate în sistemele vitale, tehnologice și de mediu”.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. SARRIS, J.; MURPHY, J.; MISCHOULON, D.; PAPAKOSTAS, G.I.; FAVA, M.; BERK, M.; Ng, Ch.H. Adjunctive nutraceuticals for depression: a systematic review and meta-analyses. *American Journal of Psychiatry*, 2016, 173(6). 575–587. DOI: 10.1176/appi.ajp.2016.15091228.
2. CENCIC, A.; CHINGWARU, W. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, 2010, 2(6), 611-625. DOI: 10.3390/nu2060611.
3. YASUAKI, W.; LÖNNERDAL, B. Bioactive peptides derived from human milk proteins - mechanisms of action, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014, 25(5), 503-514, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2013.10.012.
4. Directorate-General for Research and Innovation (European Commission*). Functional foods, 2010, EU Bookshop*, https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/238407ee-0301-4309-9fac-e180e33a3f89/language-en.
5. ANGHEL, L. Lactoferrin: analysis of the structure profile. *Chemistry Journal of Moldova*, 2014, 9(14), 99-106. DOI: 10.19261/cjm.2014.09(2).14.

6. ANGHEL, L. An investigation of the protonation states of human lactoferrin iron-binding protein. *Chemistry Journal of Moldova*, 2014, 10(1), 71-75. DOI: 10.19261/cjm.2014.09(2).14.

7. ANGHEL, L.; RADULESCU, A.; ERHAN, R.V. Structural aspects of human lactoferrin in the iron binding process studied by molecular dynamics and small-angle neutron scattering. *European Journal of Physics E – Soft Matter & Biological Physics*, 2018, 41(109), 7 p. DOI: 10.1140/epje/i2018-11720-x.

8. SAMYGINA, V.R.; SOKOLOV, A.V.; BOURENKOV, M.V.; PETOUKHOV, M.V.; PULINA, M.O.; VASILYEV, V.B.; BARTUNIK, H.; SVERGUN, D.I., Ceruloplasmin: Macromolecular assemblies with iron-containing acute phase proteins. *PLoS One*, 2013, 8(7), p. e67145.

9. ANGHEL, L.; ROGACHEV, A.; KUKLIN, A; ERHAN, R.V. β-Lactoglobulin associative interactions: a small-angle scattering study. *European Biophysical Journal*, 2019, 48: 285. https://doi.org/10.1007/s00249-019-01360-9.

10. ANGHEL, L.; KUKLIN, A.; IVANKOV, O.; BODNARCHUK, V.; ERHAN, R.V. Small-angle scattering structural study of ph-effect in beta-lactoglobulin – alginates complexes. In: International Conference "Condensed Matter Research at the IBR-2, 2022" Book of Abstract, p. 56. https://indico.jinr.ru/event/2708/attachments/11703/20465/Book%20of%20Abstracts_CMR_2022.pdf.

11. ANGHEL, L.; RĂDULESCU, A; ERHAN, R.-V. Heteroprotein complex formation based on lactoferrin and β-lactoglobulin: a small-angle neutron scattering study. MLZ Conference Neutrons for Biomaterials 2023 Report of Contribution (Abstract ID 21, p. 22).

12. LIU, H.C.; CHEN, W.L.; MAO, S.J. Antioxidant nature of bovine milk beta-lactoglobulin. *Journal of Dairy Sciences*, 2007, 90(2), 547-55. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71538-2.

13. KOMMOJU, P.R.; CHEN, Z.W.; BRUCKNER, R.C.; MATHEWS, F.S.; JORNS, M.S. Probing Oxygen activation sites in two flavoprotein oxidases using chloride as an oxygen surrogate. *Biochemistry*, 2011, 50(24), 5521. DOI: 10.1021/bi200388g.

14. ISAKSEN, A.; ADLER-NISSEN, J. Antioxidative Effect of Glucose Oxidase and Catalase in Mayonnaises of Different Oxidative Susceptibility. I. Product Trials, LWT - *Food Science and Technology*, 30(8), 1997, 841-846. DOI: 10.1006/fstl.1997.0283.

15. ANGHEL, L.; ERHAN, R.-V. Versatility and specificity of oxidoreductases in the electron transfer reactions. p. 327- 343. În: "Fundamental and Biomedical Aspects of Redox Processes". DUCA, GH.; VASEASHTA, A., Editura IGI Global, USA, 202 ,

https://www.igi-global.com/pdf.aspx?tid=324200&ptid=306584&ctid=15&t=TableofContents&isxn=9781668471982

16. ERHAN, R.V.; BODNARCHUK, V.I.; RADULESCU, A.; ANGHEL, L. Small angle neutron scattering reveals dimeric glucose oxidase from *Aspergillus niger* at pH 5.9. *Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 2020, 14, S5–S10. DOI: 10.1134/S1027451020070125
17. ANGHEL, L.; RADA, S.; ERHAN, R.-V. Structural factors and electron transfer mechanisms in flavoenzymes. *Analytical Letters*, 2023, 2412-2425. DOI: 10.1080/00032719.2023.2174131