

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись

«____»

инициалы, фамилия

_____ 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология
06.03.01.07 – Биофизика

Модификация методики иммобилизации биоферментной системы
светящихся бактерий: поиск механизмов увеличения
чувствительности и точности

Руководитель _____
подпись, дата

старший преподаватель
каф. биофизики. к.б.н.

И. Г. Торгашина

Выпускник _____
подпись, дата

К. В. Климова

Консультант _____
подпись, дата

Е.Н. Есимбекова

Красноярск 2019

Содержание

Список сокращений.....	4
Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	6
1.1 Применение светящихся бактерий в биотестировании	6
1.2 Применение ферментов светящихся бактерий в биотестировании .	7
1.3 Методы иммобилизации ферментов светящихся бактерий	9
1.3.1 Химический метод иммобилизации ферментов.....	11
1.3.2 Физические методы иммобилизации ферментов.....	14
Глава 2. Методы и материалы	19
2.1 Материалы	19
2.2 Методы.....	19
2.2.1 Процедура иммобилизации ферментов светящихся бактерий ...	19
2.2.2 Измерение активности иммобилизованных ферментов светящихся бактерий.....	19
2.2.3 Измерение активности иммобилизованных ферментов светящихся бактерий в сборных кюветах.....	20
Глава 3. Результаты и обсуждения.....	21
3.1 Подбор условий иммобилизации биферментной системы NADH:FMN – оксидоредуктаза – люцифераза в крахмальный гель для уменьшения разброса значений максимальной интенсивности свечения.	21
3.2 Подбор условий иммобилизации биферментной системы NADH:FMN – оксидоредуктаза – люцифераза в крахмальный гель для увеличения чувствительности реагентов.	27
Выводы	31
Список использованных источников.....	32

Реферат

Бакалаврская работа по теме «Модификация методики иммобилизации биферментной системы светящихся бактерий: поиск механизмов увеличения чувствительности и точности» содержит 34 страницы текстового документа, 22 использованных источника, 16 рисунков, 2 химических уравнения.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ФОТОБАКТЕРИЙ, СВЕТЯЩИЕСЯ БАКТЕРИИ, БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, БИОТЕСТИРОВАНИЕ.

Цель данной работы состояла в поиске механизмов увеличения чувствительности и точности результатов анализа при иммобилизации ферментов светящихся бактерий.

В работе применялись ферменты: люцифераза; NADH:FMN – оксидоредуктаза. Было показано, что вариация таких условий иммобилизации биферментной системы как: увеличение времени перемешивания вдвое, смена системы пипетирования, фиксированное положение реагента в кювете не влияют на разброс значений интенсивности свечения. Значение коэффициента вариации составляет более 20% для всех рассмотренных случаев. Выявлено, что увеличение чувствительности иммобилизованной биферментной системы возможно путем уменьшения количества люциферазы в реагенте. Концентрация полумаксимального ингибиования активности в присутствии сульфата меди составила 1,25 мг/л при количестве люциферазы 0,2 мкг.

[Изъято 27 страниц в связи с защитой авторского права]

Список сокращений

FMN, FMN·H₂ – окисленная и восстановленная формы флавинмононуклеотида,
NAD, NADH – окисленная и восстановленная формы никотинамидаденидинуклеотида,
RCHO, RCOOH – длинноцепочечный алифатический альдегид и соответствующая жирная кислота,
КРАБ – комплект реактивов аналитической биолюминесценции,
L – люцифераза,
R – NADH:FMN – оксидоредуктаза,
C₁₄ – тетрадеканаль,
CV – коэффициент вариации.

Список использованных источников

1. Перушкина, Е. В. Биологическое обезвреживание промышленных отходов с использованием иммобилизованных бактерий. / Е. В. Перушкина, А.Р. Хабибуллина, А.С. Сироткин. // Казанский национальный исследовательский технологический университет. Казань. – 2015. – Вестник. – Т. 18. – № 6. – с. 234 – 237. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=23437641> (дата обращения: 01.03.2019).
2. Ефременко, Е. Н. Биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* для биомониторинга экотоксикантов. / Е. Н. Ефременко, О. В. Сенько, Л. Э. Алескерова, К. А. Аленина, М. М. Мажуль, А. Д. Исмаилов. // Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва. – 2014. – Прикладная биохимия и микробиология. – Т. 50. – № 5. – с. 490 – 496. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=21811688> (дата обращения: 01.03.2019).
3. Исмаилов, А. Д. Фотобиосенсоры на основе светящихся бактерий. / А. Д. Исмаилов, Л. Э. Алескерова. // Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва. – 2015. – Биохимия. – Т. 80. – № 6. – с. 867 – 881. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=23764299> (дата обращения: 01.03.2019).
4. Tarasova, A. S. Antioxidant activity of humic substances via bioluminescent monitoring in vitro / A. S. Tarasova, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // - Environmental Monitoring and Assessment. – 2015. – V: 187. – p. 89. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10661-015-4304-1> (дата обращения: 01.03.2019).
5. Jouanneau, S. Main technological advancements in bacterial bioluminescent biosensors over the last two decades. / University of Nantes, France. – 2015. – Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology – V. 3. – p. 101 – 116. – URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2015_333 (дата обращения: 08.03.2019).
6. Латышова, З. А. Использование биотеста для определения пестицидов в продуктах растительного и животного происхождения. / Ш. Т. Сарбаканова, А. А. Кушалиева, А. А. Керимбаева. // Казахский научно –исследовательский ветеринарный институт, Алматы. – 2017. – Т. 21. – с. 575 – 577. – URL: <http://kaz-nivi.kz/images/docs/rek2017/05rek2017.pdf> (дата обращения: 08.03.2019).
7. Терехова, В. А. Биотест – системы для задач экологического контроля. / В. А. Терехова, Л. П. Воронина, Д. В. Гершкович, В. И. Ипатова, Е. Ф. Исакова, С. В. Котелевцев, Т. О. Попутникова, А. А. Рахлеева, Т. А. Самойлова, О. Ф. Филенко. // МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва. – 2014. – с. 1 – 48. – URL: http://www.rsmu.ru/fileadmin/rsmu/img/mbf/cb/biotest_sistemy.pdf (дата обращения: 08.03.2019).
8. Durand, M. J. Detection of Metal and Organometallic Compounds with Bioluminescent Bacterial Bioassays / M. J. Durand, A. Hua, S. Jouanneau // Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology. – V: 3

р. 77-99. – URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F10_2015_332 (дата обращения: 08.03.2019).

9. Fernandez-Piñas, F. Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms / F. Fernandez-Piñas, I. Rodea-Palomares, A. Leganés // - Adv Biochem Eng Biotechnol. - 2014. –V: 145. – p. 65-135. – URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-43619-6_3 (дата обращения: 10.03.2019).

10. Lee, J. S. Evaluation of residual toxicity of hypochlorite-treated water using bioluminescent microbes and microalgae: Implications for ballast water management / J. S. Lee, S. Hong, J. Lee. // - Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2019.- V: 167. – p. 130-137 (дата обращения: 10.03.2019).

11. Younkin, K. Student-Centered Microbioassay Laboratory Activity Utilizing Bioluminescent Bacteria / K. Younkin, C. Romano // - J Microbiol Biol Educ. – 2018. –V: 19(2). – p. 19 – 82 – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6067043/> (дата обращения: 12.03.2019).

12. Shimomura, O. Bioluminescence: Chemical Principles And Methods. / World Scientific Publishing, Singapore. – 2014. – p. 500. – URL: <http://bookre.org/reader?file=609559> (дата обращения: 14.03.2019).

13. Esimbekova, E. N. Application of enzyme bioluminescence in ecology. / E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, O. Shimomura. // Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk. – 2015. Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology. – V. 1. – p. 67 – 109. – URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-43385-0_3 (дата обращения: 15.03.2019).

14. Bosch - Orea, C. Chapter Ten-Biosensors and Bioassays for Environmental Monitoring / C. Bosch – Orea, M. Farre, D. Barcelo // - Comprehensive Analytical Chemistry. – 2017. – V: 77. – p. 337 – 383. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166526X17300399> (дата обращения: 15.03.2019).

15. Bezrukikh, A. Gelatin and starch as stabilizers of the coupled enzyme system of luminous bacteria NADH:FMN - oxidoreductase-luciferase / A. Bezrukikh, E. Esimbekova, E. Nemtseva, V. Kratasyuk, O. Shimomura // Siberian Federal University, Krasnoyarsk. – 2014. Analytical and Bioanalytical Chemistry. –V: 94. – URL:https://www.researchgate.net/publication/263739258_Gelatin_and_starch_as_stabilizers_of_the_coupled_enzyme_system_of_luminous_bacteria_NADHFMN-oxidoreductase-luciferase (дата обращения: 15.03.2019).

16. Юрин, В. М. Иммобилизованные клетки и ферменты. / В. М. Юрин, Т. И. Дитченко. // Белорусский государственный технологический университет, Белоруссия. – 2014. – с. 1 – 138. – URL: http://elib.bsu.by/bitstream/123456789/106785/1/umk_imm_cell.pdf (дата обращения: 18.03.2019).

17. Гашкова, Т. С. Цели и методы иммобилизации ферментов. / Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург. –

2017. Электронный архив УГЛТУ. – URL:
<http://elar.usfeu.ru/handle/123456789/6890> (дата обращения: 18.03.2019).

18. Sirisha, V. L. Chapter Nine - Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes // V.L. Sirisha, A. Jain, A. Jain. - Advances in Food and Nutrition Research. –V: 79. - 2016, P: 179-211. – URL:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043452616300377> (дата обращения: 22.03.2019).

19. Robinson, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications // - Essays Biochem. - 2015 Nov 15; 59: 1–41. – URL:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692135/> (дата обращения: 04.04.2019).

20. Hettiarachchy, N. S. 21-The use of immobilized enzymes to improve functionality // - Proteins in Food Processing. – 2018. - P 569-597. – URL:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008100722800022X> (дата обращения: 22.03.2019).

21. Nguyen, H. H. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications // - Materials (Basel). – 2019, Jan; 12(1): 121. – URL:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6337536/> (дата обращения: 04.04.2019).

22. Heinzler, R. A Compartmented Flow Microreactor System for Automated Optimization of Bioprocesses Applying Immobilized Enzymes // - Front Bioeng Biotechnol. – 2018; 6: 189. – URL:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6288360/> (дата обращения: 04.04.2019).

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Виктория

подпись

Кратасова В.А.

ициалы, фамилия

«19»

июня 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология
06.03.01.07 – Биофизика

Модификация методики иммобилизации биоферментной системы
светящихся бактерий: поиск механизмов увеличения
чувствительности и точности

Руководитель

Ирина

подпись, дата

старший преподаватель
каф. биофизики. к.б.н.

И. Г. Торгашина

Выпускник

Борис 19.06.19

подпись, дата

К. В. Климова

Консультант

Есембек

подпись, дата

Е. Н. Есимбекова

Красноярск 2019