

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ В.А.Кратасюк

« _____ » _____ 2020г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 Физика

03.03.02.07 Биохимическая физика

**Оценка влияния субстратов на стабильность ферментов светящихся
бактерий при их совместной иммобилизации**

Руководитель _____ КБН, доцент кафедры биофизики И.Г.Торгашина
подпись, дата

Выпускник _____ А.А.Шахова
подпись, дата

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Оценка влияния субстратов на стабильность ферментов светящихся бактерий при их совместной иммобилизации.» содержит: 28 страниц текстового документа, 8 иллюстраций, 21 литературный источник.

Цель исследования: оценка влияния субстратов на активность и стабильность ферментов светящихся бактерий при их совместной иммобилизации. Актуальность исследования обусловлена тем, что основная цель, лежащая в основе исследований окружающей среды и экологических процессов, заключается в том, чтобы оценить воздействие различных загрязнителей на живые организмы, включая человека. До недавнего времени данные, полученные общими химическими и физико-химическими методами, использовались при оценке риска для окружающей среды. Однако такие данные можно охарактеризовать, как обычные и ограниченные определениями выбранных токсичных веществ, выраженными в виде обобщенных химических показателей загрязнения окружающей среды. На сегодняшний день реагент на основе совместно иммобилизованной с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза характеризуется высоким разбросом значений активности при многократных измерениях, что может объясняться влиянием различных условий иммобилизации.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. Обзор литературы.....	6
1.1 Биологические методы тестирования окружающей среды	5
1.2 Достоинства и недостатки биотестирования	8
1.3 Перспективы использования биолюминесцентных методов в биотестировании	10
1.4 Ферментативные реагенты для биолюминесцентного анализа	12
1.4.1 Способы стабилизации ферментов	12
1.4.2. Выбор условий иммобилизации биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза	14
2. Материалы и методы	17
2.1 Материалы	17
2.2 Методы	17
3. Результаты и обсуждение	19
3.1 Определение параметров свечения и чувствительности иммобилизованной биферментной системы (R+L) при использовании в качестве субстрата алифатического альдегида с разной длиной углеродной цепи.	19
3.2. Оценка влияния субстратов тетрадеканаль и NADH на активность и стабильность биферментной системы (R+L)	22
ВЫВОДЫ	27
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	28

ВВЕДЕНИЕ

Для решения научных и прикладных задач экологического мониторинга широко используются различные биотесты, основанные на ингибировании ферментов токсическими веществами [1]. Перспективным является конструирование и применение интегральных биолюминесцентных методов анализа токсичности на основе биферментной системы светящихся бактерий: NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза (R) - люцифераза (L). Имобилизация биферментной системы в полимерные гели позволяет стабилизировать активность ферментов (R+L) при хранении и использовании [2].

Ранее разработанные принципы и подходы конструирования высокоактивного и чувствительного интегрального ферментативного реагента, который был основан на иммобилизации в крахмальный гель ферментов и субстратов биферментной системы (L+R) светящихся бактерий, привел к оптимизации состава реагента и модификации процедуры иммобилизации в полимерные гели, однако не позволили увеличить точность результатов анализа при многократных измерениях. Возможным фактором, определяющим вариабельность реагентов, может быть влияние субстратов на стабильность ферментов при их совместной иммобилизации.

Цель исследования: оценка влияния субстратов на активность и стабильность ферментов светящихся бактерий при их совместной иммобилизации.

Задачи исследования:

1. Определение параметров свечения и чувствительности иммобилизованной биферментной системы (R+L) при использовании в качестве субстрата алифатического альдегида с разной длиной углеводородной цепи.

2. Сравнение характеристик биферментной системы (R+L) иммобилизованной в крахмальный гель без субстратов и совместно с субстратами тетрадеканалем, NADH.

1. Обзор литературы

1.1 Биологические методы тестирования окружающей среды

Основная цель, лежащая в основе исследований окружающей среды и экологических процессов, заключается в том, чтобы оценить воздействие различных загрязнителей на живые организмы, включая человека. До недавнего времени данные, полученные общими химическими и физико-химическими методами, использовались при оценке риска для окружающей среды. Однако такие данные можно охарактеризовать как обычные и ограниченные определениями выбранных токсичных веществ, выраженными в виде обобщенных химических показателей загрязнения окружающей среды.

В последние годы интенсивно развиваются биоаналитические методы, в которых в качестве индикаторов используются живые организмы. Биотесты обнаруживают присутствие токсичных веществ в окружающей среде и определяют их токсичность в анализируемых пробах путем количественной оценки вреда, который они наносят живым организмам.

Экотоксикологические тесты также используются в качестве одного из инструментов комплексной оценки состояния окружающей среды. В этом случае данные об окружающей среде и информация о воздействии загрязняющих веществ на живые организмы получены из проб окружающей среды, которые были проанализированы с помощью химических методов и биотестов.

Биолюминесцентный анализ является одним из наиболее перспективных методов биомониторинга окружающей среды, поскольку реакция биолюминесценции очень чувствительна к малым количествам загрязняющих веществ. Данный анализ, основанный на светящихся организмах, в том числе и бактериях, дает оценку насколько загрязнена среда

и, в том числе, превосходит другие биотесты по точности, чувствительности и скорости. Ферменты бактериальной люминесцентной системы естественно находят своё применение при разработке высокочувствительных методов для разнообразных целей в практике.

В данный момент разработано более 200 методов биотестирования для выявления эффектов различных воздействий на состояние окружающей среды. Более доступны учитываются результаты опытов, в которых основным критерием является гибель или выживаемость тестируемого объекта в процентах к контролю, принимаемому за сто процентов. Так называемые острые биотесты быстро отвечают на интересующий каждого потребителя основной вопрос: представляет ли тестируемый образец опасность для сохранения жизнедеятельности? Хронические тесты, которые оценивают опасность токсикантов для сохранения и воспроизводства популяций различных организмов, отвечают на тот же вопрос, но с точки зрения долговременной перспективы для отраслей и структур. Установлено, что тритий увеличивает рост бактерий при малых концентрациях и подавляет его при наибольших. При этом он обычно стимулирует их люминесценцию: увеличивается интенсивность люминесценции, квантовый выход и время светоизлучения [4]. Традиционным объектом биотестирования принято считать дафний. Это связано с тем, что они прошли аттестацию Государственной научно-технической комиссии по отбору биотестов и включены в качестве обязательных объектов в схему установления ПДК загрязняющих веществ в водах России. Главным достоинством указанных организмов проявляются в том, что они имеют небольшой жизненный цикл, достаточно быстро возвращаются в лабораторных условиях, их биологические особенности дают возможность проводить микроскопические наблюдения, регистрировать даже минимальные изменения в органах и тканях. В водной токсикологии ученые считают дафнию таким же общепринятым и достаточно доступным тест-объектом, каким является дрозофила в генетике (Постнов и др., 1987). Кроме дафний в

Государственный реестр экологического контроля внесены: водоросли *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, лиофилизированные генетически модифицированные бактерии *Escherichia coli*, светящиеся бактерии, инфузории *Paramecium caudatum*, рыбы *Poecilia reticulata* Peters.

1.2 Достоинства и недостатки биотестирования

Применение биохимического тестирования дает результаты, которые становятся источником информации о состоянии на конкретных экологических нишах и отражает процессы внутри них. Однако, исследования, в которых используются такие методы, являются обычно трудоемкими и долгими, а также должны быть выполнены с помощью высококвалифицированных сотрудников. Всё эти пункты существенно влияют на стоимость проведения биохимических анализов. Более того, многие из этих методов могут быть использованы только в лабораторных условиях и то вводится дополнительная задержка между отбором проб и их анализом. Данный аналитический подход не допускает включения эффекта от взаимодействия между токсичными веществами, такими как:

- 1) добавочный эффект специфических веществ (аддитивный синергизм);
- 2) повышенное воздействие, которое выше, чем ожидаемый от простого добавления эффектов отдельных компонентов (сверхаддитивный синергизм);
- 3) ослабление или даже нейтрализация взаимодействия между химическими веществами (антагонизм) [11-15].

По вышеуказанным причинам в последние годы, биоанализ с использованием живых организмов в качестве индикаторов (биоиндикаторов) превратились в альтернативу классическим методам биоанализа. Необходимость биоанализа большого количества образцов окружающей среды в относительно короткий промежуток времени привел к

разработке и повышению значимости быстрых, миниатюрных тестов для определения токсичности используются так называемые микробиотесты. Специфические реакции, проявляемые одноклеточными или малыми многоклеточными организмами, способные к билюминесценции, используются в таких испытаниях. Микробиотесты имеют много несомненных преимуществ, таких как [16]:

относительно низкая стоимость одного анализа;

- 1) работа с небольшими объемами проб;
- 2) хранение в иммобилизованной форме ферментов на специфической среде;
- 3) возможность работы сразу с несколькими образцами;
- 4) короткое время отклика;
- 5) повторяемость и воспроизводимость;
- 6) использование тестов вне лаборатории.

Дополнительным, часто существенным преимуществом является то, что микробиотесты могут быть использованы персоналом без специальной подготовки, даже без профессионального опыта работы с биоиндикаторами.

Микротокс, первый биоиндикаторный тест, для которого тестируемые организмы были доставлены в криптобиотической форме, был разработан в 1979 году в США. Билюминесцентная бактерия *Vibrio fischeri*, которая в нормальных условиях, использует около 10% своей метаболической энергии для производства света, была использована в качестве индикаторного организма. Данная реакция протекала при участии кислорода, необходимого для того, чтобы билюминесценция произошла. Этот процесс связан с окислительными процессами. [4]

Конечным продуктом биохимических реакций является возбужденное вещество химическое соединение - люцифераза, которая излучает свет при температуре длины волны 490 Нм. Интенсивность люминесценции может быть обработана как мера метаболического статуса; когда бактерии

прекрасно справляются, они излучают свет с наибольшей интенсивностью, в то время как наличие токсичных веществ приводит к уменьшению биолюминесценции бактерий [17]. Снижение интенсивности биолюминесцентного свечения пропорциональна токсичности вещества, которое присутствует в исследуемой среде.

Основная цель данных исследований по улучшению биотестов заключается в том, чтобы выявлять потенциальные источники токсичности в анализируемом материале образца и оценивать вредное воздействие на живые организмы.

1.3 Перспективы использования биолюминесцентных методов в биотестировании

В научных книгах уже сформулированы некоторые требования к системе биолюминесцентных тестов:

1. Для минимизации количества биотестов необходимо, чтобы их результаты, входящих в систему, не коррелировали между собой (Khronechek et al., 1996).

2. Для достаточно высокой точности результатов биотестов необходим переход от живого объекта к реактиву (Kratasyuk, 1990)

3. Выбор тест-объектов для включения в систему, должен происходить эвристическим методом, отбирая тест-системы наиболее чувствительные к веществам-поллютантам (Воробейчик, 1994).

Всем перечисленным требованиям отвечают биолюминесцентная методика анализа, основанная и на живых организмах, излучающих видимое свечения, так и ферментах – люциферазах, переводящих с высокой квантовой эффективностью энергию биохимических реакций в излучение оптического диапазона.

Биолюминесценция обеспечивает большие, но мало используемые возможности для создания широкого спектра новых методов

биотестирования, совмещающих в себе преимущества быстрой неспецифической системы обнаружения с возможностью сверхчувствительной специфического распознавания отдельных соединений, стабильность реагентов с возможностью осуществления анализов в полевых условиях. Это обусловлено тем, что в настоящее время хорошо развито приборное оборудование для преобразования небольших световых потоков в электрические импульсы. В книге Дерябина (2009) подробно изложены принципы регистрации биолюминесценции, приведены основные характеристики био- и хемилюминометров отечественного и зарубежного производства. Кроме того, для биологических компонентов (люцифераз и люциферинов), необходимых для создания биолюминесцентных методов, разработаны способы выделения и получения модифицированных ферментов с улучшенными характеристиками (Koksharov and Ugarova, 2011; Lomakina et al., 2006;) Особенно активно в биолюминесцентном анализе используется биолюминесценция светляков и генетически модифицированных бактерий, несущих гены люминесцентной системы природных светящихся организмов (бактерий, светляков, кишечнорастворимых). Новые свойства модифицированных люцифераз определяют развитие их применений. В частности, получен ряд результатов по улучшению свойств светляковой люциферазы, используемой для определения АТФ в различных биологических средах (Лундовских и др., 2000; Угарова и др., 2005; Власова и др., 2006). Показана зависимость ингибирования свечения генетически модифицированных бактерий *Escherichia coli* от присутствия минеральных солей (Бояндин и Попова, 2001, Дерябин, Алешина, 2008). Если же сопоставить с традиционными методами исследования, то во многих случаях применение методов биолюминесценции наряду с увеличением чувствительности позволяет сократить стоимость проведения анализа приблизительно на 70 %, и время проведения - в 5-10 раз. Современные аналитические методики на основе реакций биолюминесценции, катализируемых различными люциферазами, способны

обеспечить большую гамму задач – от экологического наблюдения среды обитания человека, до молекулярной диагностики разного вида заболеваний и инфекций (высокочувствительные и специфичные биолюминесцентные гибридационные анализы).

1.4 Ферментативные реагенты для биолюминесцентного анализа

1.4.1 Способы стабилизации ферментов

Иммобилизованные ферменты можно использовать в самых разных процессах. В последние годы появилось множество новых подходов для иммобилизации ферментов, которые имеют большую эффективность и более широкое использование. В течение последних двух десятилетий эта область быстро превратилась в междисциплинарную область. [6] Иммобилизованные ферменты также находят значительное применение в метаболизме лекарств, производстве биодизеля и антибиотиков, биоремедиации и пищевой промышленности. Широкое использование иммобилизованных ферментов в значительной степени связано с тем, что они дешевле, экологичнее и намного проще в использовании по сравнению с аналогичными технологиями.

Материалы, используемые для иммобилизации ферментов, называются носителями или опорными матрицами. Характеристики матрицы имеют первостепенное значение при определении успешности и результата иммобилизации фермента. Идеальная поддержка этих характеристик включает в себя следующие свойства:

- 1) материал должен быть недорогостоящим и экологически чистым, снижая экономический эффект влияние этого процесса.
- 2) материал должен быть полностью инертным после иммобилизации и не блокировать данную реакцию.

3) материал должен иметь термическое и механическое сопротивление, позволяющее иммобилизованному ферменту использоваться в различных условиях эксплуатации.

4) материал должен быть стабильный.

По своему химическому составу опорные матрицы классифицируются по двум основным категориям, а именно:

- 1) неорганические вспомогательные материалы
- 2) органические опорные материалы (органические опоры далее подразделяются на естественные и синтетические опоры)

Неорганические материалы в качестве опор включают стекло, силикагель, глинозем, оксиды металлов, цирконий и многие другие материалы на основе кремнезема широко используются, так как они обладают термической и механической стойкостью. Они также предлагают микробную резистентность и как неорганические носители не служат субстратом для бактериального либо грибкового роста. Характерной особенностью неорганической опоры является то, что они обеспечивают жесткость и пористость. Кроме того, они обеспечивают инвариантность диаметра пор, который обеспечивает фиксированный объем и форму [7].

Большое разнообразие органических полимеров, главным образом водонерастворимых полисахаридов как коллаген, хитозан, каррагинан, альгинат, целлюлоза, крахмал, агарозу и т. д., используют в качестве опорной матрицы для иммобилизации ферментов. Характерные особенности этих полимеров делают их хорошей опорной системой в том числе, их способность образовывать инертные гели, обусловленная их химической структурой, которая может быть легко активирована, они могут связываться с белками и ферментами в обратимом виде. Также органические полимеры доступны в больших количествах, недорогие, показывают высокую термическую и механическую стойкость путем сшивания с бифункциональными реагентами.

Крахмал - это натуральный полимер с линейной амилозой и разветвленными амилопектиновыми звеньями с хорошей водоудерживающей способностью и эффективным ферментативным иммобилайзером. В статье [8] сообщается, что в ходе проведения эксперимента для иммобилизации использовался гибридный носитель альгинат кальция-крахмал пероксидаза горькой тыквы. Было также замечено, что захваченный фермент был более стабилен в присутствии денатуратов, таких как мочевины, из-за внутренних углеводных фрагментов; с другой стороны, поверхностно-иммобилизованные ферменты имеют повышенную активность [8].

1.4.2. Выбор условий иммобилизации биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза

Ферменты препаратов были получены в виде так называемых дисков «Энзимоллюм», с помощью метода иммобилизации. Реагент «Энзимоллюм» включает совместно иммобилизованные ферменты NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза и субстраты тетрадеканаль и NADH. Активность дисков зависела в большей степени от приготовления реагента. Для получения геля для последующей иммобилизации использовали пищевой желатин и три типа крахмала: рисовый, кукурузный и картофельный. После этого изменяли концентрации гелей, а также режим и продолжительность высушивания иммобилизованного реагента «Энзимоллюм». Далее рассчитывали выход активности биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза, иммобилизованной в крахмальный и желатиновый гель. В таблице 1 представлена зависимость выхода активности биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза от концентраций гелей, которые были выбраны в качестве препарата для иммобилизации. Авторами было показано, что при сравнении

иммобилизованных реагентов выход активности биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза зависит от природы геля.

Таблица 1 - Выход активности биферментной системы NAD(P)H:FMNоксидоредуктаза и люцифераза, иммобилизованной в крахмальный и желатиновый гель.

Носитель для иммобилизации биферментной системы	Концентрация геля, %				
	3	3,5	4	5	6
	Выход активности биферментной системы, %				
Картофельный крахмал	60	44	25	18	-
Рисовый крахмал	51,4	-	12,8	22,6	-
Кукурузный крахмал	17,4	-	26	14,5	-
Желатин	-	-	17	7,2	6,9

«-» - измерения не проводили

Максимальный выход активности ферментов, которые были иммобилизованы в желатиновый гель, составил 17%, в крахмальный гель уже 60%. Авторы исследования такой результат объяснили различным влиянием носителя на биферментную реакцию. В случае первого измерения, в желатиновый гель вероятнее всего, прогнозировались белок-белковые взаимодействия, что и привело к частичному изменению конформации люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы. В случае второго измерения в крахмальный гель, не происходило ковалентной связи с группами фермента и полностью сохранялась его активность, так как он является нейтральным гелем. Авторами работы [20] был зафиксирован тот факт, что необходимым временем высушивания реагента «Энзимолум» является от 18 до 20 часов. При меньшем времени высушивания, диски недостаточно высыхали и при помещении их в реакционную смесь скоро разрушались. Также в ходе работы был подобран температурный режим высушивания иммобилизованных препаратов и определена оптимальная температура для

высушивания дисков с ферментами, иммобилизованными в крахмальный гель - 4°C.

Иммобилизованная биферментная система NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза не требовала специфических условий хранения для обеспечения поддержания высокой активности ферментов: при иммобилизации в крахмальный гель активность сохранялась в течение 2-х лет, а при иммобилизации в желатиновый гель – около месяца. В то же время, интенсивность свечения раствора биферментной системы уменьшалась до нуля в течение трех суток. Таким образом, авторами показано, что метод иммобилизации в крахмальный гель ферментов люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы является хорошим для разработки реагента для биолюминесцентного биотеста, поскольку иммобилизованные ферменты характеризуются высоким выходом активности и длительным временем хранения без потери активности по сравнению с иммобилизованной в желатиновый гель и растворимой биферментной системой.

В данный момент разработана тест-система [10] включающая ферменты и субстраты биферментной системы, а именно NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза иммобилизованная в крахмальный гель. Данная система удобна в использовании, используется в различных областях для изучения экологических, клинических и промышленных образцов. Прогресс в этой области заключается в том, что она экономична, экологична и проста в использовании по сравнению с другими параллельными технологиями. Однако, влияние субстратов на активность и стабильность ферментов не изучена до конца, поэтому данная работа будет посвящена оценке влияния субстратов на активность и стабильность ферментов светящихся бактерий при их совместной иммобилизации.

2. Материалы и методы

2.1 Материалы

Для поиска увеличения стабильности результатов анализа при многократных измерениях в процедуре иммобилизации варьировали такие условия, как: биферментная система NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза иммобилизованная в крахмальный гель, та же система но совместно с тетрадеканалем, и совместно с NADH. В работе использовали следующие реактивы: тетрадеканаль (C14) (“Merck”, Германия), картофельный крахмал, деканаль (C10), комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ), содержащий люциферазу из рекомбинантного штамма *E.coli* и NAD(P)H:FMN -оксидоредуктазу из *Photobacterium leiognathi*, произведенный лабораторией бактериальной биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Один флакон КРАБа содержал 0,5 мг/мл люциферазы, 0,15 ед.активности NAD(P)H:FMN -оксидоредуктазы. Для приготовления растворов использовали 0,05 М калий - фосфатный буфер pH 6,8.

2.2 Методы

Реакционная смесь содержала: диск с иммобилизованными ферментами, 50 мкл 0,0025 % тетрадеканаля, 50 мкл $5 \cdot 10^{-4}$ М FMN, 200 мкл 0,05 М буфера, 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М NADH. Иммобилизация в условиях эксперимента проходила для четырех случаев. В первом случае диск содержал только ферменты L+R, во втором случае L+R+ тетрадеканаль, в третьем случае была использована система L+R+NADH, четвертая система содержала совместно все компоненты. Измерения интенсивности свечения проводили на биолюминометре GloMax 20/20, Promega. Активность биферментной системы NADH-FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в

иммобилизованном состоянии определяли по величине максимальной интенсивности свечения – I.

Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ EXCEL («Microsoft», США). Вычисляли среднее значение параметров биолюминесценции и стандартное отклонение. Для оценки степени достоверности различий использовали критерий Стьюдента.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Определение параметров свечения и чувствительности иммобилизованной биферментной системы (R+L) при использовании в качестве субстрата алифатического альдегида с разной длиной углеродной цепи.

Установлено, что люциферазы светящихся бактерий проявляют биолюминесцентную активность с альдегидами, длина цепи которых от 8 до 16 атомов углерода [4]. При этом природным субстратом бактериальной люциферазы считается тетрадеканаль (14 углеродный альдегид) [18].

Для оценки влияния субстратов на активность и чувствительность ферментов светящихся бактерий при их совместной иммобилизации, в первую очередь, была исследована возможность иммобилизации биферментной системы (L+R) с альдегидами разной углеродной цепи. Были выбраны деканаль (C10), додеканаль (C12), тетрадеканаль (C14). Однако, в ходе подготовки к эксперименту не представлялось возможным приготовить водно-спиртовой раствор додеканаля по причине низкой растворимости. Далее в работе использовали деканаль (C10) и тетрадеканаль (C14).

Для проведения иммобилизации биферментной системы (L+R) совместно с субстратами: альдегидом и NADH необходимым этапом являлось определение концентрации альдегидов, обеспечивающие максимальную интенсивность свечения.

Была определена зависимость интенсивности свечения растворимой биферментной системы (L+R) от концентрации тетрадеканаля (C14) и деканаля (C10) (Рисунок 3). Показано, максимальная интенсивность свечения биферментной системы (L+R) наблюдается при добавлении 50 мкл 10,9 мкмоль/л тетрадеканаля. При использовании деканаля в качестве субстрата люциферазы максимальная интенсивность свечения наблюдалась при добавлении 50 мкл 59,1 мкмоль/л.

Вместе с тем, при указанных концентрациях альдегида в случае использования тетрадеканала максимальная интенсивность свечения вдвое больше максимальной интенсивности свечения при использовании деканала. Это можно объяснить большим сродством тетрадеканала к люциферазе.

Сродство альдегида к люциферазе обусловлено гидрофобными взаимодействиями между алифатическим фрагментом альдегида и гидрофобными группами фермента, поэтому с увеличением длины углеродной цепи альдегид прочнее связывается с люциферазой [19].

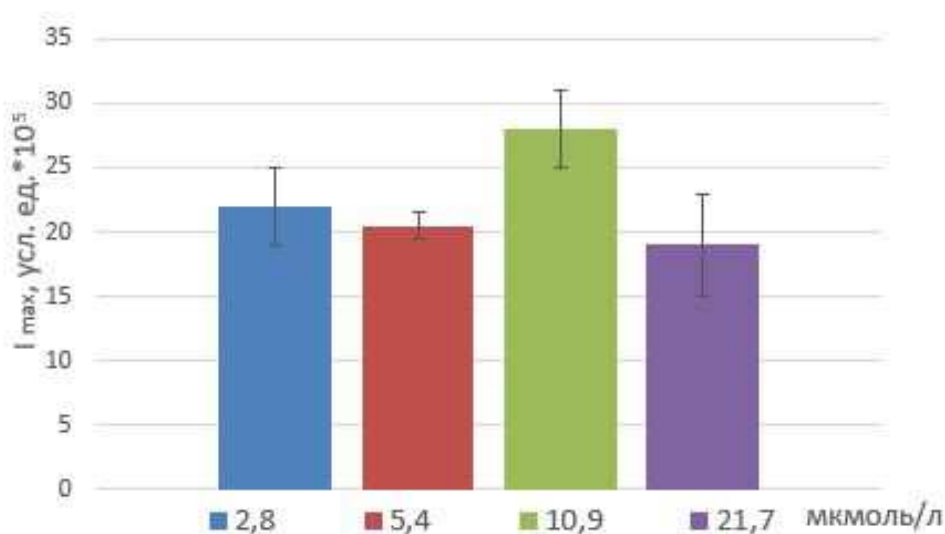


Рисунок 1 - Зависимость интенсивности свечения растворимой биферментной системы (L+R) от концентрации тетрадеканала

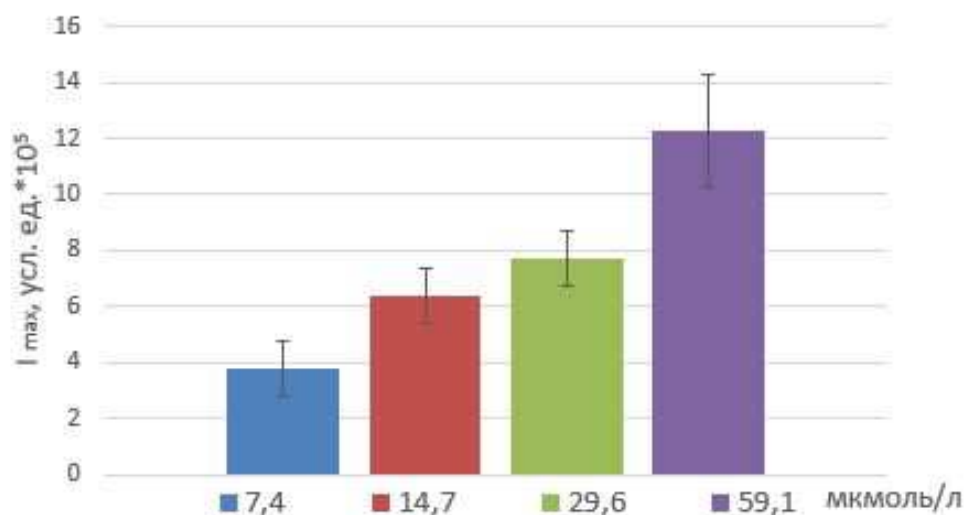


Рисунок 2 - Зависимость интенсивности свечения растворимой биферментной системы (L+R) от концентрации деканала

Далее была проведена иммобилизация биферментной системы (L+R) совместно с субстратами НАДН и тетрадеканаль или деканаль, где количество альдегида в иммобилизованном реагенте соответствовало количеству, обеспечивающему максимальную интенсивность свечения биферментной системы. Количество NADH в реагенте составляло $1,6 \cdot 10^{-6}$ г. Выход активности в случае использования тетрадеканала составил 18%, в случае деканала 11%. (Рисунок 3)

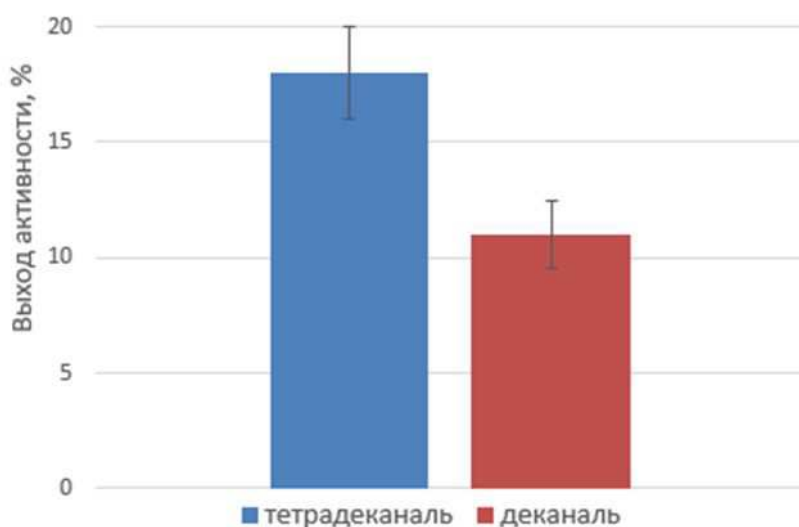


Рисунок 3 - Выход активности иммобилизованной биферментной системы (L+R)

Для определения чувствительности исследована зависимость интенсивности свечения иммобилизованной биферментной системы (L+R) от концентрации сульфата меди при использовании в качестве субстрата тетрадеканала и деканала (Рисунок 4).

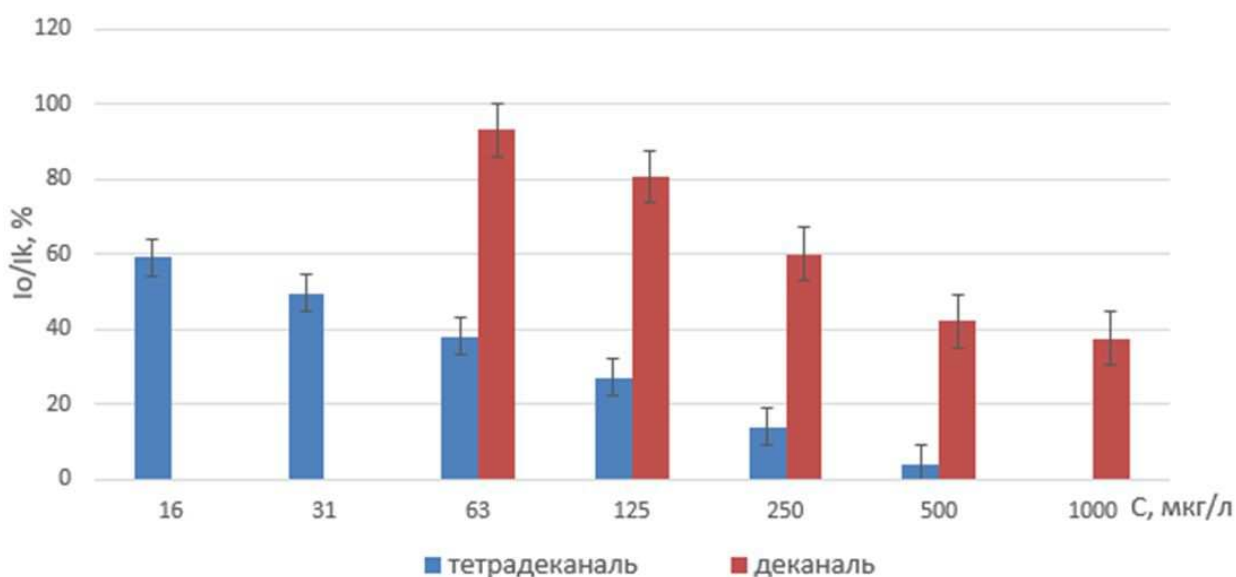


Рисунок 4 - Зависимость интенсивности свечения иммобилизованной биферментной системы (L+R) от концентрации сульфата меди при использовании в качестве субстрата.

Показано, 50% ингибирование активности иммобилизованной биферментной системы в случае тетрадеканалья наблюдалось при концентрации 32 мкг/л сульфата меди, в случае деканалья 500 мкг/л.

Таким образом, показано, что интенсивность свечения биферментной системы NAD(P)H:FMN -оксидоредуктаза-люцифераза при использовании в качестве субстрата люциферазы тетрадеканалья на порядок выше, чем при использовании деканалья и поэтому для дальнейшей работы перспективным является использование тетрадеканалья.

3.2. Оценка влияния субстратов тетрадеканаль и NADH на активность и стабильность биферментной системы (R+L)

Ранее экспериментально было обнаружено, что реагент, включающий совместно иммобилизованную биферментную систему (R+L) с субстратами NADH и тетрадеканаль, теряет свою активность при хранении. Потеря активности иммобилизованной биферментной системы (R+L) препятствует ее дальнейшему широкому использованию.

Для оценки влияния субстратов на стабильность ферментов при их совместной иммобилизации проведено сравнение интенсивности свечения биферментной системы (R+L), иммобилизованной без субстратов и иммобилизованной совместно с субстратами NADH и тетрадеканаль в зависимости от времени хранения (Рисунок 3).

В каждом случае нормирование интенсивности свечения проводили по отношению к максимальному значению в первый день хранения. Реагенты хранили в закрытых флаконах в холодильной камере при 8 °С.

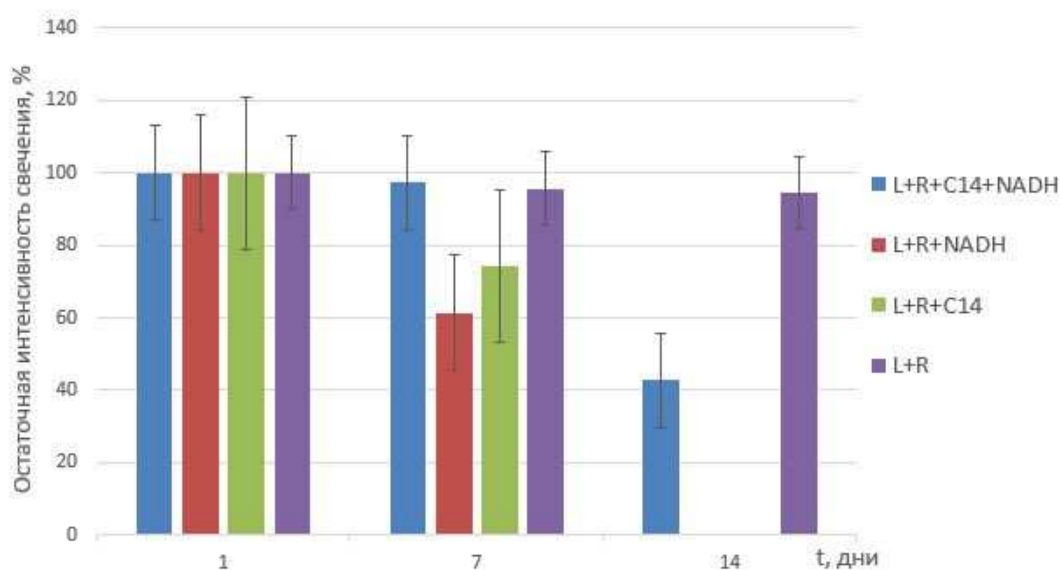


Рисунок 5. Зависимость остаточной интенсивности свечения биферментной системы (R+L), иммобилизованной совместно с субстратами, от времени хранения.

Из рисунка видно, реагент, включающий биферментную систему (R+L) иммобилизованную совместно с NADH, наименее стабилен. Потеря активности составила 40 % уже на 7 день хранения. Потеря активности реагента, включающего биферментную систему (R+L) иммобилизованную совместно с тетрадеканалем, на 7 день хранения составила 25 %. Реагент, включающий только иммобилизованные ферменты люциферазу и NADH:FMN-оксидоредуктазу сохранял максимальную активность (100 %) на протяжении 14 дней хранения.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что быстрая потеря активности при хранении биферментной системы (R+L), иммобилизованной совместно с субстратами NADH и тетрадеканаль, обусловлена наличием в реагенте NADH.

Кроме того, был проведен анализ кинетических кривых реакции биферментной системы (R+L), иммобилизованной совместно с субстратами.

На рисунке 6 приводится пример зависимости интенсивности свечения биферментной системы (R+L), иммобилизованной совместно с субстратами, от времени измерения.

Из рисунка видно, что время выхода интенсивности свечения на максимум зависит от состава реагента. Так, наименьшее время выхода на максимум наблюдалось у реагента, включающего биферментную систему (R+L) иммобилизованную совместно с NADH и тетрадеканаль, наибольшее - у реагента, включающего только иммобилизованные ферменты люциферазу и NADH:FMN-оксидоредуктазу. В таблице 2 приведены значения времени выхода интенсивности свечения на максимум (T_{max}) для всех рассматриваемых реагентов. Погрешность измерений составила не более 20%.

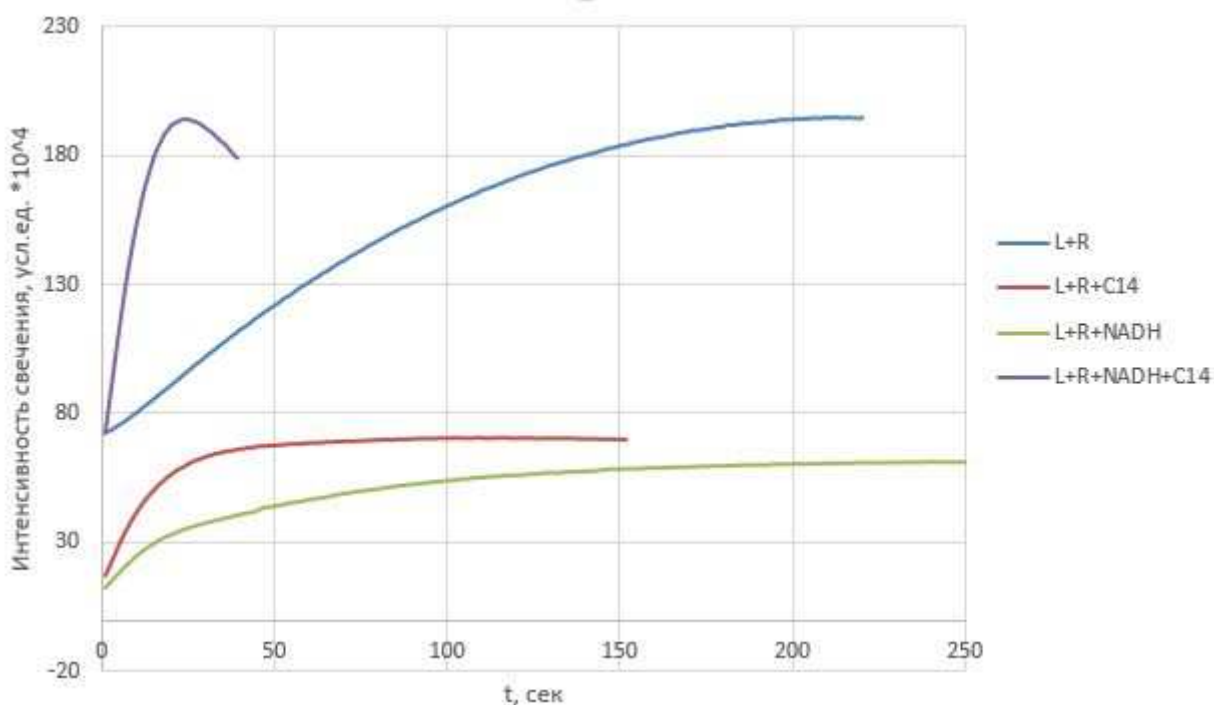


Рисунок 6 - Зависимость интенсивности свечения биферментной системы (R+L), иммобилизованной совместно с субстратами, от времени измерения.

Таблица 2 - Время выхода на максимум интенсивности свечения биферментной системы (R+L), иммобилизованной совместно с субстратами

Реагент	T_{\max} , сек
L+R	200
L+R+C ₁₄	50
L+R+NADH	170
L+R+C ₁₄ +NADH	25

Вероятно, во всех рассмотренных случаях, различия значений времени выхода интенсивности свечения на максимум можно объяснить различной скоростью диффузии субстратов из раствора, к ферментам, находящимся в крахмальном диске. Предполагается, что в ходе проведения измерения интенсивности свечения, ферменты люцифераза и NADH:FMN-оксидоредуктаза не диффундируют из крахмального диска в раствор и реакция протекает внутри диска. Так, исходя из значений времени выхода интенсивности свечения на максимум, можно предположить, что скорость диффузии тетрадеканала к молекулам ферментов, находящимся в крахмальном диске, значительно меньше скорости диффузии NADH. В случае реагента, включающего биферментную систему (R+L) иммобилизованную совместно с NADH и тетрадеканаль, для реакции необходима диффузия в крахмальный диск только субстрата FMN и время выхода интенсивности свечения на максимум в этом случае на порядок меньше, чем для реагента, включающего только ферменты люциферазу и NADH:FMN-оксидоредуктазу. При этом, мы полагаем, что во всех рассмотренных случаях скорость диффузии субстрата FMN в крахмальных дисках одинакова.

В результате проделанных экспериментов можно сделать однозначное заключение о влиянии субстратов NADH и тетрадеканаль на активность и стабильность ферментов люцифераза и NADH:FMN-оксидоредуктаза при их совместной иммобилизации в крахмальный гель. Однако так и остаются неясными факторы иммобилизации, влияющие на точность результатов при многократных измерениях.

ВЫВОДЫ

1. Выход активности биферментной системы (R+L) иммобилизованной совместно с NADH и тетрадеканалем выше выхода активности биферментной системы (R+L) иммобилизованной совместно с NADH и деканалем в 1,5 раза при концентрациях альдегидов 10,9 и 59,1 мкмоль/л соответственно. Чувствительность реагентов к действию сульфата меди при использовании в качестве субстрата тетрадеканаля выше на порядок, чем при использовании деканала.
2. Субстраты NADH и тетрадеканаль влияют на активность и стабильность ферментов биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза при их совместной иммобилизации. Остаточная интенсивность свечения реагента на 7 день хранения составляет 60 %.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Roda, A., Pasini, P., Mirasoli, M., Michelini, E., Guardigli, M. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol.* 2004;22(6), 295-303.
2. Есимбекова Е.Н., Лоншакова-Мукина В.И., Безруких А.Е., Кратасюк В.А. Принципы конструирования многокомпонентных реагентов для энзимологического анализа. – *ДАН.* – 2015. – Т. 461. – №4. – С. 472–475.
3. Esimbekova E.N., Kondik A.M., Kratasyuk V.A. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity. – *Environ Monit Assess.* – 2013. – V. 185. – I 7. – P. 5909–5916.
4. И.И. Гительзон, В.А. Кратасюк, В.Н. Лопатин, Д.А. Апонасенко, В.С. Филимонов, З.Г. Холостова, Н.А. Гаевский, Ю.С. Григорьев, А.А. Тихомиров. Экологическая биофизика. Т.1. Фотобиофизика экосистем. Логос, Москва, 2002
5. Жмур, 1997; Loon, Hermens, 1995.
6. 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>
7. Flores-Maltos, A., Rodríguez-Durán, L. V., Renovato, J., Contreras, J. C., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2011). Catalytic properties of free and immobilized *Aspergillus niger* tannase. *Enzyme Research*, 2011, 768183. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/768183>.
8. Matto, M., & Husain, Q. (2009). Calcium alginate–starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 57, 164–170.

9. Malhotra, D. B., & Chaubey, A. (2003). Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors and Actuators. B: Chemical*, 91, 117–127.
10. Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S., & Hameed, A. (2010). Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology*, 9, 4836–4844.
11. R. Boluda, J.F. Quintanilla, J.A. Bonilla, E. Sa´ez, M. Gamo´n, *Chemosphere* 46 (2002) 355.
12. T. Reemtsma, A. Putschew, M. Jekel, *Waste Manage.* 19 (1999) 181.
13. T. Reemtsma, O. Fiehn, M. Jekel, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 771.
14. L. Guzella, *Chemosphere* 37 (1998) 2895.
15. B. Brohon, R. Gourdon, *Soil Biol. Biochem.* 32 (2000) 853.
16. A. Kuczyn´ska, L. Wolska, J. Namies´nik, *Zastosowanie biotesto´w w badaniach s´rodowiskowych. W: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu s´rodowiskowym. (Praca zbiorowa pod redakcja J. Namies´nika, W. Chrzanowskiego i P. Szpinek), CEAM, Gdan´ska, Poland, 2003, p. 667 (in Polish).*
17. A.R. Fernandez-Alba, M.D. Hernando Guil, G. Dı´az Lo´pez, Y. Chisti, *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 195.
18. (Ulitzur S. and Hastings J. W., 1979).
19. Немцева Е.В., Кудряшова Н.С., Механизм электронного возбуждения в билюминесцентной реакции бактерий, (2007).
20. И.Г. Торгашина, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк, Физико-химические характеристики биферментной системы надн:фмн-оксидоредуктаза-люцифераза иммобилизованной в гели различной природы, (2007).
21. Kratasyuk VA, Kuznetsov AM, Gitelson JI (1997) Bacterial bioluminescence in ecological education. In: Hastings JW, Kricka ZJ, Stanley PE (eds) *Bioluminescence and chemiluminescence (molecular reporting with photons)*. Willey, Chichester, pp 177–180.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
В.А. Крайнов
подпись инициалы, фамилия
« 22 » июня 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 Физика

Оценка влияния субстратов на стабильность ферментов светящихся бактерий
при их совместной иммобилизации

Научный руководитель Ирина Васильевна Торашина И. Г. Торашина
подпись, дата датированная печатью инициалы, фамилия
Выпускник А. А. Шахова А. А. Шахова
подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2020