

На правах рукописи

Торгашина Ирина Геннадьевна

ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННОГО  
ФЕРМЕНТАТИВНОГО РЕАГЕНТА ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ  
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТОВ

03.00.16 – экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Красноярск - 2007

Работа выполнена на кафедре биофизики Института естественных и гуманитарных наук ФГОУ ВПО «Сибирский федеральный университет»

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор Кратасюк Валентина Александровна

Официальные оппоненты:

Доктор сельскохозяйственных наук, профессор Пальникова Елена Николаевна

Кандидат биологических наук, профессор Григорьев Юрий Сергеевич

Ведущая организация: ФГОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет»

Защита состоится 14 ноября 2007 г. в 14 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета К 212.099.02 при ФГОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» по адресу:

660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института естественных и гуманитарных наук ФГОУ ВПО «СФУ»

Автореферат реферат разослан \_\_\_\_\_ сентября 2007 г.

Ученый секретарь  
диссертационного  
совета, к.б.н., доцент



Г. Н. Скопцова

**АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.** В настоящее время для решения различных задач экологического мониторинга используется более 100 методов биологического тестирования. Наряду с общепринятыми живыми организмами, такими как бактерии, простейшие, водоросли и др., в качестве тест-объектов начинают использоваться разные ферментативные системы, отвечающие за важнейшие функции живых организмов. Примеров ферментативных биотестов в настоящее время можно привести только два. Это датчик, созданный на основе холинэстеразы, а также ферментативные тесты с использованием моноферментной и биферментной систем светящихся бактерий. Однако при использовании ферментов в биотестах возникает ряд трудностей. Во-первых, ферменты неустойчивы при хранении, а также при различных воздействиях: повышенных температурах, экстремальных значениях рН и т.д. Во-вторых, использование ферментов светящихся бактерий в экологическом мониторинге осложняется отсутствием удобного и высокочувствительного реагента. Решение вышеизложенных проблем возможно при использовании в биотестах иммобилизованного реагента. Иммобилизация ферментов позволяет разработать стабильный и удобный дозированный реагент, включающий все необходимые компоненты биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, для биолюминесцентного анализа. Однако успех получения такого препарата определяется выбором подходящего носителя и метода иммобилизации. В связи с этим, чрезвычайно актуальным является поиск методов и условий иммобилизации ферментов светящихся бактерий, обеспечивающих высокую каталитическую активность при максимальной чувствительности к поллютантам.

**Цель работы:** Исследование взаимодействия ферментов и субстратов в гелевом окружении в зависимости от условий иммобилизации для создания многокомпонентного иммобилизованного реагента, предназначенного для ферментативного биотестирования при проведении экологического мониторинга водных систем.

**Основные задачи исследования:**

1. Изучение условий иммобилизации биферментной системы светящихся бактерий для разработки реагента, обеспечивающего высокую чувствительность к действию поллютантов.
2. Сравнение фермент-субстратных взаимодействий в иммобилизованной и растворимой биолюминесцентной биферментной системе: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза для понимания условий работы реагента в экологических ферментативных биотестах.
3. Сравнение чувствительности растворимого и иммобилизованного реагента к действию антропогенных поллютантов с целью разработки нового ферментативного биотеста с использованием иммобилизованного реагента.

**Научная новизна.** Впервые изучено взаимодействие ферментов и субстратов при совместной иммобилизации ферментов (НАДН: ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы) и субстратов (тетрадеканаль, ФМН и НАДН). Проведено сравнение влияния полимерных носителей различной природы на чувствительность и активность биферментной системы светящихся бактерий. Изучены механизмы стабилизации смесей ферментов и

субстратов при смене микроокружения в различных условиях (температура, рН и т.д.). Получены зависимости чувствительности люциферазных биотестов от условий иммобилизации.

**Практическая значимость.** Впервые разработан многокомпонентный иммобилизованный реагент для экологических ферментативных биотестов, отличающийся следующими преимуществами: простота проведения анализа, высокая стабильность при хранении и использовании, а также при воздействии повышенных температур, экстремальных значений рН и т.д. На основе иммобилизованного реагента разработан новый подход для создания ферментативных биотестов для экологического мониторинга водных экосистем и других видов мониторинга. Метод и реагент пригодны для использования, как в лабораторных, так и в полевых условиях.

#### ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

1. Многокомпонентный иммобилизованный дозированный реагент для биолюминесцентных ферментативных биотестов: условия получения и применения в экологическом мониторинге водных экосистем.
2. Фермент-субстратные взаимодействия в иммобилизованной и растворимой биолюминесцентной биферментной системе: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза как основа для увеличения чувствительности ферментативных биотестов.
3. Сравнительный анализ чувствительности экологических ферментативных биотестов с использованием растворимого и иммобилизованного реагента.
4. Новый подход для создания ферментативных биотестов для экологического и других видов мониторинга с использованием иммобилизованного многокомпонентного реагента.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.** Результаты работы докладывались на 41-ой Международной научной студенческой конференции, «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2004); 11-ой Всероссийской студенческой научной конференции «Экология и проблемы защиты окружающей среды» (Красноярск, 2004); Научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых-физиков «Физика и Эйнштейн» (Красноярск, 2005); Всероссийской научной конференции «Современные аспекты экологии и экологического образования» (Казань, 2005); IV Съезде фотобиологов России (Саратов, 2005); Всероссийской конференции аспирантов и студентов по приоритетному направлению «Рациональное природопользование» (Ярославль, 2005); Школе-конференции «Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии» (Пушино, 2006); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-экологические проблемы природопользования в центральной Сибири» (Красноярск, 2007).

**ПУБЛИКАЦИИ.** По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и 10 тезисов и материалов конференций.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, главы с изложением результатов работы, заключением, выводами и списка литературы. Работа изложена на 100 страницах машинописного текста,

проиллюстрирована 16 таблицами и 9 рисунками. Список литературы содержит 124 источников, в том числе 65 - зарубежных.

ПРИНЯТЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ: ФМН, ФМНН<sub>2</sub> – окисленная и восстановленная формы флавиномононуклеотида, НАД, НАДН – окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотида, RCHO, RCOOH – длинноцепочечный алифатический альдегид и соответствующая жирная кислота, КРАБ – комплект реактивов аналитической биоллюминесценции, L – люцифераза, R – НАДН:ФМН-оксидоредуктаза, C<sub>14</sub> – тетрадеканаль, ДТТ – дитиотрейтол, ПДК – предельно допустимая концентрация, ЦБК – целлюлозно-бумажный комбинат, ХПК – химическое потребление кислорода, I<sub>макс</sub> – максимальная интенсивность свечения, С – концентрация субстрата или ингибитора, K<sub>i</sub> – константа инактивации, K<sub>m</sub> – константа Михаэлиса, E<sub>a</sub> – энергия активации.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Первая глава диссертационной работы посвящена обзору литературы по методам биотестирования токсичности сред. Приведены примеры использования бактериальных биоллюминесцентных биотестов и биотестов на основе ферментативных реакций светящихся бактерий. Представлен обзор методов иммобилизации различных светящихся организмов и выделенных из них ферментных систем. Рассмотрены преимущества и недостатки использования иммобилизованных биоллюминесцентных систем в биотестировании. Обосновано использование метода иммобилизации в гели для создания иммобилизованного реагента для ферментативных биоллюминесцентных тестов. Метод иммобилизации в полисахаридные гели выбран, поскольку в этом случае не происходит искажения структуры фермента и сохраняется высокая каталитическая активность. Выбор желатинового геля в качестве носителя обусловлен тем, что многие ферменты в клетке функционируют в тесном контакте с другими ее компонентами, в частности с липидами и белками и поэтому полагают, что изучение поведения ферментов иммобилизованных на белках позволяет понять закономерности их функционирования *in vivo*. Кроме того, ценность выбранных полимерных носителей заключается в их нетоксичности, легкости биodeградации, что позволяет применять крахмал и желатину в фармацевтической и пищевой промышленности. Вместе с тем предложенные методы иммобилизации обеспечивают возможность совместной иммобилизации ферментов с их субстратами, что позволяет разработать удобный и высокочувствительный биотест для экологического мониторинга.

Вторая глава диссертации посвящена описанию методов исследования. В работе использовали комплект реактивов аналитической биоллюминесценции (КРАБ), содержащий люциферазу (L) из рекомбинантного штамма *E.coli* и НАД(Р)Н:ФМН-оксидоредуктазу (R) из *Photobacterium leiognathi*, произведенный лабораторией бактериальной биоллюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск).

Иммобилизацию люциферазы и НАДН:ФМН-оксидоредуктазы в гель проводили по модифицированному методу Кратасюк В.А. и др.(1986). Для

получения многокомпонентного иммобилизованного реагента в гель помимо ферментов вносили растворы субстратов: тетрадеканаль, ФМН, НАДН. Об активности полученных иммобилизованных препаратов судили по величине максимальной интенсивности свечения ( $I_{\text{макс}}$ , мВ).

Исследование влияния фенолов, хинонов, солей металлов, а также проб воды ЦБК различной степени очистки на биферментную систему в растворимом и иммобилизованном состоянии проводили путем добавления анализируемых водных проб в реакционную смесь для измерения биолюминесценции. Реакцию биолюминесцентных биотестов определяли по величине остаточного свечения  $I_0/I_k \cdot 100\%$  и константе ингибирования  $K$ . Константы Михаэлиса для биферментной системы в растворе и иммобилизованном состоянии определяли по углу наклона прямых зависимостей скорости реакции от концентрации субстратов в координатах Лайнуивера – Бэрка. За скорость реакции принимали величину максимальной интенсивности свечения биферментной системы ( $I_{\text{макс}}$ ). Зависимость активности ферментов от рН окружающего раствора изучали, измеряя интенсивность свечения реакционной смеси, содержащей биферментную систему в растворимом или иммобилизованном состоянии при добавлении буфера с различным рН и ионной силой при комнатной температуре. Зависимость активности ферментов от температуры изучали, измеряя интенсивность свечения биферментной системы после инкубации ферментов в жидкостном термостате VT-8 (Термэкс-2, Россия) при температурах: от 5 до 70 °С. Реакцию инициировали добавлением НАДН.

Третья глава диссертации посвящена описанию результатов исследований и их обсуждению. В первом разделе рассматриваются условия иммобилизации биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза в крахмальный и желатиновый гели, относящиеся к полисахаридам и белкам, соответственно.

Иммобилизованные препараты ферментов получали в виде дисков, активность которых зависела от условий приготовления реагента. Для приготовления геля использовали пищевой желатин и различные типы крахмала: картофельный, рисовый и кукурузный. Варьировали концентрации гелей, время и режим высушивания иммобилизованных реагентов. Выход активности биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, иммобилизованной в крахмальный и желатиновый гель, рассчитывали как процентное отношение интенсивности свечения иммобилизованного реагента к интенсивности свечения биферментной системы в растворе. Выход активности биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза зависит от природы полимерного геля, используемого для иммобилизации и его концентрации (табл. 1). Максимальный выход активности ферментов, иммобилизованных в крахмальный гель, составил 100%, иммобилизованных в желатиновый гель - 17%. Такой результат объясняется различным влиянием носителя на биферментную систему. В случае иммобилизации в крахмальный гель не происходит ковалентного взаимодействия с активными группами фермента и полностью сохраняется его активность. В случае иммобилизации ферментов в желатиновый гель происходят белок-белковые взаимодействия, что,

возможно, приводит к частичному изменению конформации люциферазы и НАДН:ФМН-оксидоредуктазы. Для работы выбран 3,5% картофельный крахмальный гель и 5% желатиновый.

Таблица 1

Выход активности биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-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	100	82,6	64,4	31,8	-
Рисовый крахмал	51,4	-	12,8	22,6	-
Кукурузный крахмал	17,4	-	26	14,5	-
Желатин	-	-	17	7,2	6,9

«-» - измерения не проводились

Иммобилизованная биферментная система НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза не требует специальных условий хранения для обеспечения поддержания высокой активности ферментов: при иммобилизации в крахмальный гель максимальная активность сохраняется в течение 2-х лет, при иммобилизации в желатиновый гель – месяц. В то же время, интенсивность свечения раствора биферментной системы уменьшается до нуля в течение трех суток.

Необходимым этапом для разработки многокомпонентного высокочувствительного реагента, включающего и ферменты и субстраты биолюминесцентной реакции, является поиск условий, определяющих чувствительность биферментной системы светящихся бактерий.

Известно, что чувствительность ферментативных реагентов к действию поллютантов уменьшается при увеличении концентрации ферментов, так как от количества ферментов зависит их активность (Березин и др., 1987). Поскольку биферментная система, иммобилизованная в крахмальный гель, имеет высокую активность, одним из путей для обеспечения высокой чувствительности к действию поллютантов является уменьшение количества ферментов в иммобилизованном реагенте (диске). Наряду с этим, для увеличения чувствительности к поллютантам варьировали количеством субстратов ФМН и НАДН в реакционной смеси. Зависимости остаточной интенсивности свечения биферментной системы, иммобилизованной в крахмальный гель, при действии сульфата меди от количества люциферазы в диске при разных количествах ФМН и НАДН в реакционной смеси представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что чувствительность биферментной системы увеличивается с уменьшением как количества люциферазы, так и количества субстратов. Максимальная чувствительность иммобилизованной в

крахмальный гель биферментной системы достигалась при количестве люциферазы - 0,8 мкг, ФМН – 1,3 мкг и НАДН – 14 мкг.

Таблица 2

Остаточная интенсивность свечения иммобилизованной в крахмальный гель биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза при добавлении  $\text{CuSO}_4$  (1 мг/л).

Субстраты	Количество люциферазы					
	4 мкг			2 мкг		
ФМН, мкг	13	1,3	1,3	13	1,3	1,3
НАДН, мкг	56	28	14	56	28	7
Остаточная интенсивность свечения, %	100	100	69	100	100	48,7
	1,3 мкг			0,8 мкг		
ФМН, мкг	13	6,5	1,3	13	1,3	1,3
НАДН, мкг	56	28	14	56	14	7
Остаточная интенсивность свечения, %	66,5	79	62,5	33	12	0

Для дальнейших исследований был приготовлен иммобилизованный реагент, содержащий ферменты и субстраты в ранее подобранных количествах, а именно: 0,8 мг люциферазы, 1,3 мг ФМН, 14 мг НАДН, 137 нг тетрадеканала. Наибольшей активностью обладали реагенты, содержащие  $(R+L)+C_{14}$ ;  $(R+L)+\text{НАДН}+C_{14}$ , иммобилизованные в 3% и 3,5% крахмальный гель. В этом случае выход активности составлял 100% (рис. 1).

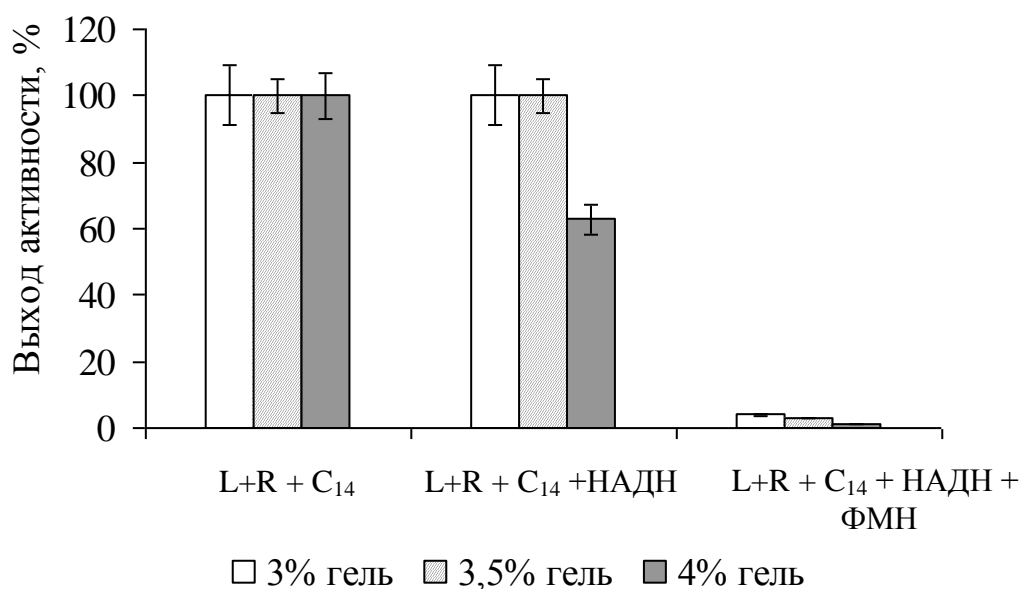


Рис. 1. Выход активности биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, иммобилизованной совместно с субстратами в крахмальный гель.



Реагент, содержащий все компоненты реакционной смеси имел низкий выход активности (4%) и характеризовался высокой скоростью каталитической реакции, что делает невозможным регистрацию свечения, вследствие этого реагент L+R+C<sub>14</sub>+НАДН+ФМН является непригодным для биолюминесцентного анализа.

Таким образом, в качестве лучшего из препаратов для дальнейшего исследования выбран реагент следующего состава (R+L)+C<sub>14</sub>+НАДН. Этот реагент содержит необходимое количество ферментов и двух субстратов, анализ токсичности водной среды при этом упрощается, так как сводится к добавлению к иммобилизованному препарату раствора ФМН и анализируемой пробы.

Аналогичные эксперименты проводили с иммобилизацией в желатиновый гель. Для совместной иммобилизации ферментов и субстратов в желатиновый гель использовали выше подобранные в экспериментах с крахмальным гелем количества субстратов: 14 мг НАДН и 137 нг тетрадеканала. Количество люциферазы было выбрано 4 мкг, поскольку при иммобилизации в желатиновый гель происходит более сильная инактивация фермента. Уменьшение содержания люциферазы становится нецелесообразным из-за низкой активности иммобилизованного в желатиновый гель реагента.

Ранее нами было показано, что чувствительность биферментной системы зависит от количества ФМН, поэтому была получена зависимость чувствительности многокомпонентного реагента L+R+C<sub>14</sub>+НАДН к действию сульфата меди от количества ФМН в реакционной смеси (табл. 3).

Таблица 3

Остаточная интенсивность свечения биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, иммобилизованной совместно с тетрадеканалем и НАДН при добавлении CuSO<sub>4</sub>.

Концентрация CuSO <sub>4</sub> - 1 мг/л	L+R+C <sub>14</sub> +НАДН, иммобилизованные в крахмальным гелем			
	Количество люциферазы 0,8 мкг			
ФМН, мкг	13	6,5	3,3	1,3
Остаточная интенсивность свечения, %	100	100	100	52
Концентрация CuSO <sub>4</sub> - 10 мг/л	L+R+C <sub>14</sub> +НАДН, иммобилизованные в желатиновый гелем			
	Количество люциферазы 4 мкг			
ФМН, мкг	13	6,5	3,3	1,3
Остаточная интенсивность свечения, %	100	95	94	85

Из таблицы 3 видно, что чувствительность ферментативного реагента зависит от количества ФМН для биферментной системы, иммобилизованной как в крахмальным, так и в желатиновый гелем. Чувствительность реагента

увеличивается при уменьшении количества добавляемого ФМН. Причем чувствительность биферментной системы, иммобилизованной в крахмальный гель, выше в 10 раз по сравнению с биферментной системой, иммобилизованной в желатиновый гель. Ингибирование ферментативной реакции, катализируемой иммобилизованным в крахмальный гель реагентом  $L+R+C_{14}+НАДН$ , начиналось при добавлении сульфата меди в концентрации 1 мг/л, в то время, как для реагента, иммобилизованного в желатиновый гель, это значение составляло 10 мг/л. Таким образом, показано, что чувствительность многокомпонентного биолюминесцентного иммобилизованного реагента  $L+R+C_{14}+НАДН$  зависит от природы выбранного носителя, а также от количества люциферазы и субстратов ФМН и НАДН.

Во втором разделе главы 3 рассматриваются условия использования полученных иммобилизованных реагентов, поскольку для практических целей часто требуется, чтобы ферменты работали при повышенных температурах, экстремальных значениях рН, в присутствии высоких концентраций органических растворителей и т.д.

Исследовали влияние рН реакционной смеси на активность растворимой и иммобилизованной биферментной системы. Исходный раствор ферментов для иммобилизации приготавливали в 0,05 М фосфатном буфере с рН 6,8, т.е. в условиях, обеспечивающих максимальную активность биферментной системы *in vitro*.

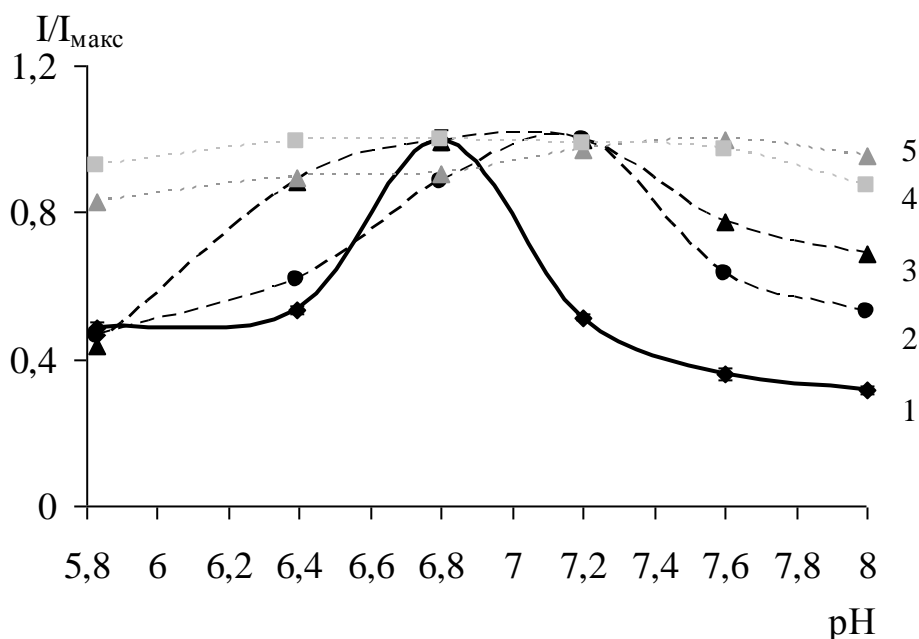


Рис. 2. Зависимость интенсивности свечения биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза от рН реакционной смеси. Нормирование интенсивности свечения проводили по отношению к максимальному значению. 1 -  $L+R$ , растворимые; 2 -  $L+R$ , иммобилизованные в желатиновый гель; 3 -  $L+R+C_{14}+НАДН$ , иммобилизованные в желатиновый гель; 4 -  $L+R+C_{14}+НАДН$ , иммобилизованные в крахмальный гель; 5 -  $L+R$ , иммобилизованные в крахмальный гель.

Как видно из рисунка 2 зависимость интенсивности свечения растворимой биферментной системы от рН реакционной смеси имеет колоколообразный вид с максимумом в точке 6,8, что в данном случае является рН-оптимумом. В случае реагентов L+R и L+R+C<sub>14</sub>+НАДН, иммобилизованных в крахмальный гель, наблюдается расширение рН-оптимума как в область низких значений рН, так и в область высоких значений.

Интенсивность свечения была не менее 80% во всем рассмотренном диапазоне значений рН от 5,8 до 8,0., что указывает на значительную стабилизацию ферментов вследствие процесса иммобилизации по отношению к изменению рН реакционной смеси. В случае реагентов L+R и L+R+C<sub>14</sub>+НАДН, иммобилизованных в желатиновый гель, происходил сдвиг рН – оптимума в щелочную область до 7,2.

Таким образом, тест с использованием иммобилизованных в крахмальный гель ферментов и субстратов, не реагирует на изменение рН реакционной смеси и может быть использован для анализа водных проб, характеризующихся широким диапазоном значений рН.

Известно, что при иммобилизации ферментов на разных носителях происходит увеличение термостабильности. Для изучения зависимости интенсивности свечения биферментной системы в растворимом и иммобилизованном состоянии от температуры проводилось инкубирование биолюминесцентных ферментативных реагентов при разных температурах с последующим измерением интенсивности свечения реагентов.

На рисунке 3 показана зависимость интенсивности свечения биолюминесценции для разных реагентов от температуры инкубирования. Для растворимой биферментной системы температурный оптимум (т.е. диапазон температур, при которых наблюдается максимальная интенсивность свечения препаратов ферментов) составлял 20-25<sup>0</sup>С, при 40<sup>0</sup>С растворимая биферментная система полностью теряла свою активность. Иммобилизованные реагенты сохраняли высокую каталитическую активность при действии температур во всем рассмотренном диапазоне (от 4<sup>0</sup>С до 70<sup>0</sup>С), Так, для реагентов L+R и L+R+C<sub>14</sub>+НАДН, иммобилизованных в крахмальный гель, интенсивность свечения составляла не менее 60% от максимальной, для реагентов, иммобилизованных в желатиновый гель, не менее 50%. При иммобилизации ферментов и ферментов совместно с субстратами в крахмальный гель температурный оптимум составляет от 4 до 50<sup>0</sup>С, в желатиновый гель - от 15 до 50<sup>0</sup>С. Таким образом, иммобилизованная в крахмальный гель биферментная система пригодна для использования в широком диапазоне температур.

Для подтверждения стабилизации иммобилизованных реагентов необходимо исследовать их активность при длительном воздействии высоких температур.

На рисунке 4 представлена температурная зависимость инактивации иммобилизованной и растворимой биферментной системы в координатах Аррениуса.

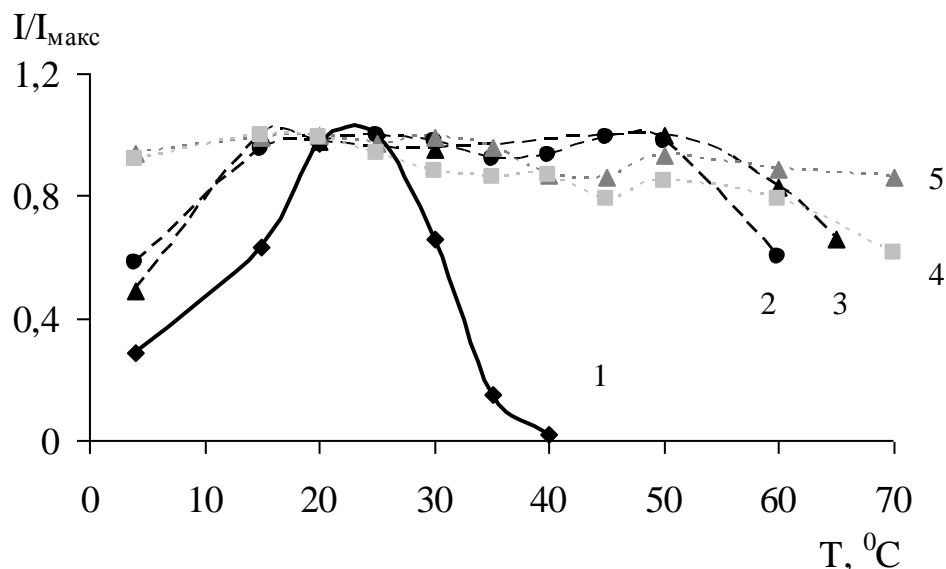


Рис. 3. Зависимость интенсивности свечения биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктазы-люциферазы от температуры инкубирования. Нормирование интенсивности свечения проводили на максимальное значение. 1 - L+R, растворимые; 2 - L+R, иммобилизованные в желатиновый гель; 3 - L+R+C<sub>14</sub>+НАДН, иммобилизованные в желатиновый гель; 4 - L+R+C<sub>14</sub>+НАДН, иммобилизованные в крахмальный гель; 5 - L+R, иммобилизованные крахмальный в гель.

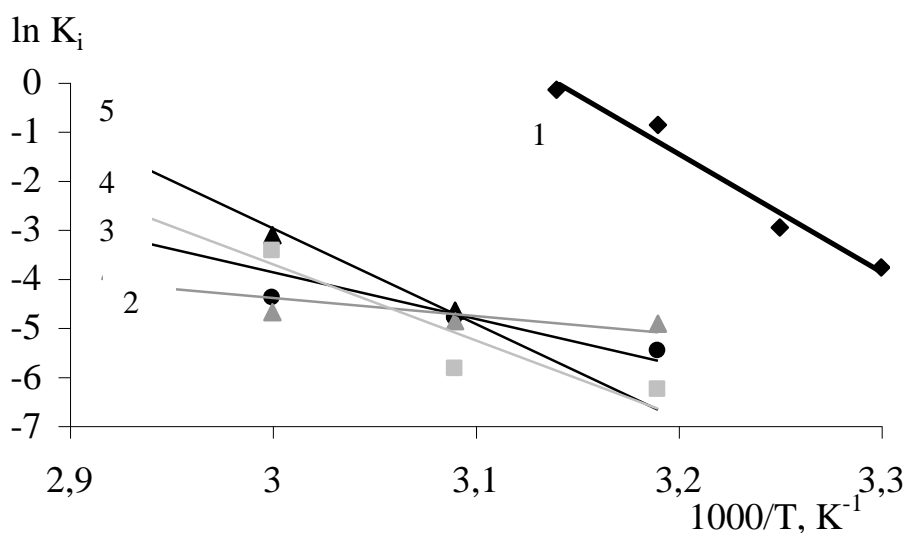


Рис. 4. Константы скоростей инактивации биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктазы-люцифераза в координатах Аррениуса. 1 - L+R, растворимые; 2 - L+R, иммобилизованные крахмальный в гель; 3 - L+R, иммобилизованные в желатиновый гель; 4 - L+R+C<sub>14</sub>+НАДН, иммобилизованные в крахмальный гель; 5 - L+R+C<sub>14</sub>+НАДН, иммобилизованные в желатиновый гель.

По углу наклона прямых рассчитаны эффективные значения энергии активации: для растворимой биферментной системы - 201 кДж/моль; для L+R иммобилизованных в желатиновый гель - 79 кДж/моль; для

L+R+C<sub>14</sub>+НАДН иммобилизованных в желатиновый гель - 162 кДж/моль; для L+R иммобилизованных в крахмальный гель - 30 кДж/моль; для L+R+C<sub>14</sub>+НАДН иммобилизованных в крахмальный гель - 129 кДж/моль.

Таким образом, значения энергии активации для иммобилизованных препаратов ферментов меньше, чем для растворимых. Это означает, что в процессе иммобилизации ферментов в крахмальный и желатиновый гели происходит ужесточение конформации белков и ограничение их подвижности в иммобилизованном реагенте. Образовавшийся в процессе иммобилизации комплекс белок-матрица является термодинамически более выгодным по сравнению с растворимой биферментной системой, так как характеризуется меньшим значением энергии активации.

При сравнении влияния различных носителей на термоинактивацию иммобилизованной биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза видно, что для желатинового геля значения энергии активации больше, чем для крахмального геля, как для реагентов L+R, так и L+R+C<sub>14</sub>+НАДН. Это подтверждает предположение о том, что иммобилизация в желатиновый гель приводит к частичному изменению конформации ферментов люциферазы и/или НАДН:ФМН-оксидоредуктазы. Среди рассмотренных реагентов самым термодинамически стабильным является иммобилизованный в крахмальный гель реагент L+R, поскольку характеризуется наименьшей энергией активации (30 кДж/моль).

Таким образом, реагенты, полученные путем иммобилизации биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, обладают рядом несомненных преимуществ по сравнению с растворимыми препаратами ферментов: они сохраняют свою стабильность в более широком температурном диапазоне, являются более устойчивыми к изменению химического окружения (например, pH), хранятся в течение длительного времени без обеспечения специальных условий хранения. В связи с этим многокомпонентный реагент L+R+C<sub>14</sub>+НАДН удобен для использования в экологическом мониторинге водных систем, как в лабораторных, так и полевых условиях.

В третьем разделе главы 3 рассматриваются способы проведения биолюминесцентного анализа для растворимой биферментной системы и многокомпонентного иммобилизованного реагента, приводится сравнение чувствительности растворимой и иммобилизованной биферментной системы к действию модельных поллютантов.

Метод определения токсичности водной пробы с помощью биферментной системы заключается в изменении интенсивности свечения биферментной системы в реакционной смеси при добавлении исследуемого раствора. Реакционная смесь для проведения биолюминесцентной реакции, катализируемой растворимой биферментной системой НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза включает раствор ферментов, субстратов и буферный раствор, необходимый для поддержания оптимального для работы ферментов pH. К этой смеси добавляется анализируемая проба в объеме 50 мкл (метод 1, табл. 4). Таким образом, соотношение объем пробы/объем реакционной смеси - 1/10. Здесь при анализе происходит разбавление пробы в реакционной смеси, где основной объем составляет

буферный раствор (500 мкл). Соли буфера могут взаимодействовать с веществами в тестируемой пробе, не оказывая при этом должного эффекта на активность ферментов. В этом случае затруднена корректная интерпретация результатов. При анализе с использованием иммобилизованного реагента, как было показано выше, рН окружающего раствора не оказывает существенного влияния на измерения и потому не требует добавления буфера. В этом случае, реакционная смесь состоит из реагента, содержащего ферменты и субстраты, раствора ФМН и анализируемой пробы (метод 2, табл. 4), что позволяет значительно упростить проведение анализа.

Таблица 4

Методы билюминесцентного анализа токсичности биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза

МЕТОД 1		МЕТОД 2
Растворимая биферментная система, иммобилизованный реагент L+R	Многокомпонентный реагент L+R+C <sub>14</sub> +НАДН	Многокомпонентный реагент L+R+C <sub>14</sub> +НАДН
Реакционная смесь		
1) Раствор ферментов (или диск с иммобилизованными L+R) 10 мкл 2) Раствор тетрадеканая 50 мкл 3) Раствор ФМН 5 мкл 4) Раствор НАДН 50 мкл 5) Буферный раствор 400 мкл 6) Анализируемая проба 50 мкл	1) Мембрана с иммобилизованными L+R+C <sub>14</sub> +НАДН 2) Раствор ФМН 5 мкл 3) Раствор буфера 500 мкл 4) Анализируемая проба 50 мкл	1) Мембрана с иммобилизованными L+R+C <sub>14</sub> + НАДН 2) Раствор ФМН 5 мкл 3) Анализируемая проба 500 мкл

На примере иммобилизованного в желатиновый гель реагента L+R+C<sub>14</sub>+НАДН проведено сравнение чувствительности реагента к действию сульфата меди в зависимости от используемого метода (рис. 5). Как видно из рисунка, различий в чувствительности иммобилизованного реагента L+R+C<sub>14</sub>+НАДН не наблюдается.

Таким образом, метод анализа водных проб с использованием многокомпонентного ферментативного билюминесцентного реагента L+R+C<sub>14</sub>+НАДН обладает значительными преимуществами по сравнению с

использованием растворимой биферментной системы, а именно: простотой проведения анализа, отсутствием необходимости добавления буферного раствора и поддержания определенного значения pH реакционной смеси.

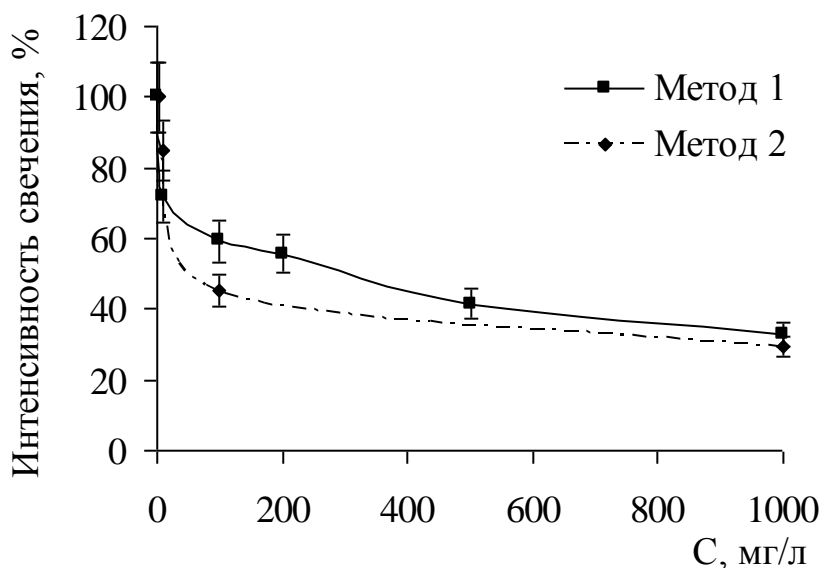


Рис. 5. Зависимость интенсивности свечения биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, иммобилизованной в желатиновый гель совместно с тетрадеканалем и НАДН, от концентрации сульфата меди при разных схемах проведения анализа.

Необходимым этапом для успешного использования разработанных иммобилизованных реагентов является исследование их чувствительности к ряду различных токсических соединений. В качестве модельных поллютантов в работе были выбраны ряды фенолов, хинонов и солей тяжелых металлов, поскольку эти вещества относятся к наиболее распространенным загрязнителям, поступающим в поверхностные воды со сточными водами различных предприятий.

В таблице 5 представлены концентрации поллютантов, вызывающие 50%-ингибирование биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза. Показано, что для большинства исследуемых поллютантов чувствительность растворимой биферментной системы и иммобилизованных реагентов L+R и L+R+C<sub>14</sub>+НАДН не различалась. Для реагентов, иммобилизованных в желатиновый гель, чувствительность отличалась на порядок для ряда поллютантов: бромгидрохинона, толухинона. В то же время, чувствительность биферментной системы, в том числе и иммобилизованной на исследуемых носителях, выше либо сравнима с ПДК некоторых хинонов для питьевой воды. Однако, для фенолов чувствительность как иммобилизованной, так и растворимой биферментной системы меньше указанных ПДК. Такой результат объясняется различиями в механизмах ингибирования биферментной системы фенолами и хинонами. В отличие от фенолов, хиноны вступают в конкурентные отношения с ФМН и тем самым нарушают взаимодействие между НАДН:ФМН-оксидоредуктазой и люциферазой, что приводит к увеличению чувствительности (Кудряшева и др., 1994).

Таблица 5

Концентрации поллютантов, вызывающие 50% ингибирование биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, (мг/л)

Название		Растворимая биферментная система	Иммобилизованная биферментная система			
			в крахмальный гель		в желатиновый гель	
			L+R	L+R+C <sub>14</sub> +НАДН	L+R	L+R+C <sub>14</sub> +НАДН
Хиноны	Бензохинон (ПДК 0,1 мг/л)	0,01	0,09	0,10	0,10	0,30
	Тимохинон	0,08	0,20	0,08	0,20	0,20
	Толухинон	0,09	0,05	0,01	0,40	0,30
	Нафтохинон (ПДК 0,25 мг/л)	0,10	0,20	0,08	0,30	0,80
Фенолы	Бромгидрохинон	3,80	8,30	9,90	39,60	39,60
	Гидрохинон (ПДК 0,2 мг/л)	21,00	25,00	12,00	47,20	47,20
Соли	CoCl <sub>2</sub>	2,60	0,10	0,50	0,50	0,50
	CuSO <sub>4</sub>	0,40	0,50	0,60	0,50	0,60
	K <sub>4</sub> [Fe(CH) <sub>6</sub> ]	0,70	0,80	0,80	0,70	1,20
	K <sub>3</sub> [Fe(CH) <sub>6</sub> ]	0,50	0,60	0,60	0,60	0,50



Проведено исследование влияния проб сточных вод различной степени очистки Енисейского целлюлозно-бумажного комбината на биолюминесценцию биферментной системы. В таблице 6 представлены результаты анализа проб сточной воды разной степени очистки, предоставленные лабораторией цеха очистки промышленных стоков.

В работе исследовали чувствительность растворимой биферментной системы и иммобилизованного в крахмальный гель многокомпонентного реагента  $L+R+C_{14}+НАДН$  в зависимости от соотношения объемов реакционной смеси и пробы, а также момента внесения пробы в реакционную смесь. В первом случае исследуемую пробу воды добавляли после достижения максимального уровня свечения, т.е. когда биферментная система функционирует в стационарном режиме и определяли остаточную интенсивность свечения  $I_0/I_k \cdot 100\%$  (метод 1, табл. 7). Во втором случае 50 мкл анализируемого образца сточной воды помещали в реакционную смесь непосредственно перед запуском реакции субстратом реакции - ФМН. Контрольное значение интенсивности свечения регистрировали в реакционной смеси без добавления анализируемого образца сточной воды (метод 2, табл. 7). В третьем случае объем реакционной смеси для растворимой биферментной системы был уменьшен до 100 мкл, при этом объем анализируемой пробы воды составлял 500 мкл. Таким образом, соотношение количества компонентов биферментной системы и анализируемого раствора составляло 1:5.

Реакционная смесь иммобилизованного реагента  $L+R+C_{14}+НАДН$  состояла из 500 мкл анализируемой пробы и 5 мкл раствора ФМН. В качестве контрольного раствора добавляли либо 500 мкл 0,05 М натрий-фосфатный буфера рН 7, либо 500 мкл дистиллированной воды. Контрольный и анализируемый образцы добавляли до запуска реакции ФМН (метод 3, табл. 7).

Таблица 6

Протокол результатов анализа сточной и очищенной воды лаборатории цеха очистки промышленных стоков ООО Енисейский целлюлозно-бумажный комбинат (от 22.03.2007)

Определяемый компонент	Ед. изм.	Результат измерений		
		Проба №1	Проба №2	Проба №3
рН	ед. рН	6,5	6,2	3,3
ХПК	мг/дм <sup>3</sup>	3000	2200	2000
Взвешенные вещества	мг/дм <sup>3</sup>	300	74	51
Аммоний ион	мг/дм <sup>3</sup>	66	53	48
Нитриты	мг/дм <sup>3</sup>	<0,02	<0,02	<0,02
Нитраты	мг/дм <sup>3</sup>	6,2	0,1	0,1

Проба: №1 – поступающая в цех сточная вода; №2 – сточная вода после механической очистки; №3 – вода после очистных сооружений.

Таблица 7

Остаточная интенсивность свечения (I<sub>0</sub>/I<sub>к</sub>, %) биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза - люцифераза при действии проб сточных вод ЦБК

Проба/ разведение	МЕТОД 1 Добавление 50 мкл пробы после достижения I <sub>max</sub>		МЕТОД 2 Добавление 50 мкл пробы перед запуском реакции ФМН		МЕТОД 3 Изменение соотношения пробы и реакционной смеси (5:1)	
	Растворимая система L+R	Иммобилизованная система L+R+C <sub>14</sub> +НАДН	Растворимая система L+R	Иммобилизованная система L+R+C <sub>14</sub> +НАДН	Растворимая система L+R Контроль буфер/ Контроль дН <sub>2</sub> O	Иммобилизованная L+R+C <sub>14</sub> +НАДН Контроль буфер/ Контроль дН <sub>2</sub> O
№1 / 1	3,0	-	-	-	0 / 0	0 / 0
№1 / 10	78,9	62,9	81,5	39,0	4,5 / 24,0	9,1 / 9,5
№1 / 100	-	-	-	-	36,3 / 190,0	65,9 / 69,0
№2 / 1	11,4	-	-	-	0 / 0	0 / 0
№2 / 10	90,0	80,9	67,8	59,0	8,6 / 45,0	19,7 / 20,6
№2 / 20	106,7	-	-	-	22,6 / 118,0	41,4 / 43,4
№3 / 1	9,1	-	-	-	0 / 0	58,4 / 63,6
№3 / 10	89,6	89,7	57,9	63,4	9,2 / 48,0	77,6 / 81,3
№3 / 20	104,0	-	-	-	13,9 / 73,0	105,1 / 110,1

«-» - измерения не проводились

Результаты эксперимента показали (табл. 7), что проведение анализа с использованием растворимой биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза возможно методом 1 либо методом 2, где количество добавляемой в реакционную смесь пробы составляет 50 мкл. Растворимая биферментная система оказалась непригодной для исследования представленных проб методом 3, поскольку в этом случае отсутствует буферный раствор и рН реакционной смеси не соответствует оптимальному значению (6,8). Таким образом, нельзя разделить два эффекта: уменьшение интенсивности свечения биферментной системы в результате ингибирования ферментативной активности компонентами анализируемого образца и инактивацию ферментов вследствие изменения рН реакционной смеси. Препараты ферментов, иммобилизованные в крахмальный гель, не требуют добавления буфера в реакционную смесь и позволяют проводить измерение в широком диапазоне значений рН. Показания биотеста с использованием иммобилизованного многокомпонентного реагента соответствуют изменению химических характеристик анализируемых проб: согласно показаниям биотеста токсичность проб уменьшается в ряду проба 1 > проба 2 > проба 3.

Таким образом, показана возможность использования иммобилизованного ферментативного многокомпонентного реагента для определения степени загрязнения водных систем сточными водами ЦБК.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны условия получения многокомпонентного иммобилизованного дозированного реагента для экологического мониторинга водных систем, включающего ферменты (НАДН:ФМН-оксидоредуктазу и люциферазу) и субстраты (тетрадеканаль, НАДН) биферментной системы светящихся бактерий. Реагент не требует специальных условий хранения и сохраняет 100 % активности в течение 2-х лет.
2. При иммобилизации биферментной системы НАД(Р)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза в крахмальный и желатиновый гели наблюдается повышение устойчивости ферментов к химическим и физическим факторам среды: рН-оптимум расширяется как в кислую, так и щелочную области, повышается устойчивость ферментов к высоким концентрациям солей, а также термостабильность.
3. Иммобилизация биферментной системы в крахмальный и желатиновый гели не приводит к существенной потере чувствительности ферментативных реагентов к действию модельных токсических веществ. Увеличение чувствительности иммобилизованного многокомпонентного реагента достигается варьированием состава реагента и выбором носителя для иммобилизации.
4. Предложен новый подход для создания ферментативных биотестов для экологического и других видов мониторинга, заключающийся в использовании иммобилизованного многокомпонентного реагента, позволяющего оптимизировать проведение ферментативного биотестирования.

Основные положения диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Esimbekova E.N. Disk-shaped immobilized multicomponent reagent for bioluminescence analyses: correlation between activity and composition / E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk, I.G. Torgashina // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2007. - №40 – P. 343-346.
2. Кратасюк В.А. Роль научного исследования в оптимизации экологического образования / В.А. Кратасюк, Е.Г. Лапатина-Кратасюк, И.Е. Суковатая, И.Г. Торгашина, О.А. Осипенко // *Вестник КрасГУ*. - 2006. - №6/1. - С. 281-286.
3. Есимбекова Е.Н. Имобилизованный многокомпонентный реагент для билюминесцентных биотестов токсичности / Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк, Никифорова М.А., Торгашина И.Г. // *Производство экологически безопасной продукции (проблемы и пути решения)*. Прил. к «Вестнику КрасГАУ»: Сб. науч. ст. Вып 1. – 2005. – С. 109 – 114.
4. Торгашина И.Г. Имобилизованный реагент на основе биферментной системы светящихся бактерий для мониторинга водных экосистем / И.Г. Торгашина, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // *Материалы Всероссийской конф. аспирантов и студентов по приоритетному направлению «Рациональное природопользование»*. 2005. – Ярославль, 2005. - С. 205 – 208.
5. Торгашина И.Г. Имобилизация биферментной системы светящихся бактерий в крахмальный гель для мониторинга водных экосистем / И.Г. Торгашина, Т.А. Парфенчук, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // *Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии: Тез. докл. Школа-конференция*. 2006. – Пущино, 2006. - С. 121 – 123.
6. Торгашина И.Г. Исследование чувствительности иммобилизованной биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза к действию фенолов и хинонов / И.Г. Торгашина // *Материалы ХLI международной науч. студ. конф.* 2003. – Новосибирск, 2003. - С. 67.
7. Торгашина И.Г. Исследование чувствительности билюминесцентных тестов к компонентам химического и радиационного загрязнения водных экосистем / И.Г. Торгашина // *НКСФ-2004: Тез. докл. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых-физиков*. 2004. – Красноярск, 2004. - С. 61.
8. Торгашина И.Г. Исследование чувствительности билюминесцентных тестов к действию ионизирующего излучения / И.Г. Торгашина // *Экология и проблемы защиты окружающей среды: Тез. докл. XI Всероссийская студенческая науч. конф.* 2004. – Красноярск, 2004. - С. 135 – 136.
9. Есимбекова Е.Н. Исследование влияния гелевого окружения на активность биферментной системы светящихся бактерий НАДН: ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк, И.Г. Торгашина // *III Съезд биофизиков России: Тез. докл.* 2004. – Воронеж, 2004. - С. 33 – 34.

10. Торгашина И.Г. Разработка иммобилизованного реагента на основе биферментной системы светящихся бактерий НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / И.Г. Торгашина // Физика и Эйнштейн. НКСФ-2005: Тез. докл. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых-физиков. 2005. – Красноярск, 2005. -. С. 119.
11. Торгашина И.Г. Исследование чувствительности биолюминесцентных тестов к действию химического загрязнения водных экосистем / И.Г. Торгашина, Е.Н. Есимбекова // 9-ая Дальневосточная молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии: Тез. докл. 2005. – Владивосток, 2005. -. С. 57.
12. Торгашина И.Г. Исследование чувствительности биолюминесцентных тестов к действию ионизирующего излучения и химического загрязнения водных экосистем / И.Г. Торгашина, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Современные аспекты экологии и экологического образования: Тез. докл. Всероссийская научная конференция. 2005. – Казань, 2005. -. С. 303 – 304.
13. Есимбекова Е.Н. Иммобилизованный реагент на основе биферментной системы светящихся бактерий НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк, И.Г. Торгашина // IV Съезд фотобиологов России: Тез. докл. 2005. – Саратов, 2005.- С. 44 - 45.