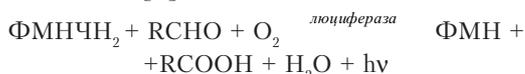


## СТАБИЛИЗИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ГЛИЦЕРИНА И САХАРОЗЫ НА БИФЕРМЕНТНУЮ СИСТЕМУ СВЕТАЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ НАД(Ф)Н:ФМН-ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА

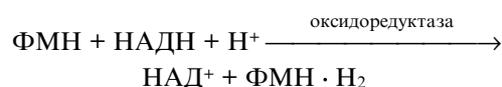
Исследовано влияние вязкости реакционной среды на термостабильность и кинетику темоинактивации ферментов биферментной системы светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза. Показано, что увеличение вязкости реакционной среды приводит к увеличению термостабильности биферментной системы, в сахарозе наблюдается стабилизация долгоживущего интермедиата биолюминесцентной реакции.

Ключевые слова: биферментная система светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, биолюминесценция, стабилизация ферментов, глицерин, сахароза.

Биолюминесцентный анализ в настоящее время является одним из перспективных экспрессных методов биологического мониторинга окружающей среды для оценки загрязнения природных водных источников, промышленных стоков, почв и воздуха, а так же широко используется для исследований в области медицины, сельского хозяйства, фундаментальной биологии и др., например, для анализа различных метаболитов и активности ферментов, токсинов, мутагенов и других веществ, воздействующих на живые организмы. Бактериальная биолюминесценция *in vivo* и *in vitro* обладает высокой чувствительностью к действию различных ингибиторов биологической активности: анестетиков, наркотиков, промышленных ядов, инсектицидов, пестицидов, отравляющих и лекарственных веществ [1]. Биферментная система светящихся бактерий, применяемая *in vitro*, состоит из двух ферментов: люциферазы и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы. Способность люцифераз трансформировать энергию химических связей в световую относит ее к уникальному классу ферментов. Химической основой свечения бактерий является ферментативное окисление люциферазами восстановленного флавиномононуклеотида ФМНЧН<sub>2</sub> и длинноцепочечного алифатического альдегида RCHO кислородом воздуха соотвествующей жирной кислоты, воды и видимого света [2]:



Считается, что восстановление ФМН в бактериях происходит в реакции, катализируемой НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой:



При создании и использовании люциферазных биотестов для экологического мониторинга и в различных областях биотехнологии приходится иметь дело с проблемой нестабильности белков сопряженной ферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люциферазы вообще, и их термостабильности, в частности. Разработка новых способов проведения бактериальной биферментной биолюминесцентной реакции, в том числе и в водно-органических реакционных средах [3], [4], позволяет добиться высокой эффективности катализа и максимальной стабильности фермента.

Целью данной работы было исследование влияния глицерина и сахарозы на термостабильность и кинетику темоинактивации биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, в условиях различной вязкости.

### Материалы и методы исследования

Лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов, произведенные в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН [5]. Один флакон лиофилизованного препарата (КРАБ) содержит 0,4 мг/мл люциферазы (L) ЕС 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *E.coli* и 0,18 ед. активности НАДН:ФМН-оксидоредуктазы (R) ЕС 1.5.1.29 (*Ph. leiognathi*). Перед измерениями лиофилизированные ферменты растворяли в 0,05 М калий фосфатном буфере (рН 6,8). В работе использовали следующие реактивы: НАДН и ФМН фирмы «Seriva» (Германия), тетрадеканаль фирмы «Merck» (Герма-

ния). Для регистрации кинетических параметров биферментной биолюминесцентной системы проводили реакцию в смеси следующего состава: 10 мкл КРАБа; 50 мкл алифатического альдегида; 200 мкл 0,05 М фосфатный буфера; 10 мкл флавин-мононуклеотида (ФМН); 50 мкл 0,1 М НАДН. Все вязкие растворы готовили с использованием фосфатного буфера, концентрацию вещества выражали в молях и объемных процентах. Активность и стабильность биферментной системы изучали в присутствии разных концентраций глицерина (5, 10, 25, 50%), сахарозы (20, 25, 30, 40%) и без них (контроль). Термоинактивацию биферментной системы изучали, инкубируя ферменты в течение 10 мин при разных температурах, в интервале от 15 до 50 °С в растворах различных концентраций глицерина и сахарозы. Величину динамической вязкости биолюминесцентной системы в исследуемом диапазоне температур брали из химического справочника.

Измерения проводили на люминиметре GloMax®-20/20 фирмы «Turner BioSystems» (Sunnyvale, USA). Температуру растворов поддерживали с помощью жидкостного циркуляционного ультратермостата VT-8 (Термэкс-2, Россия). В кювету биолюминиметра вносили последовательно все компоненты реакционной смеси, быстро перемешивали, помещали кювету в биолюминиметр и регистрировали величину максимальной интенсивности свечения. Биолюминесцентная реакция растворимой биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза представляют собой длительное свечение с монотонным спадом биолюминесценции. Максимум интенсивности свечения ( $I_0$ ) характеризует начальную скорость реакции и концентрацию фермент-субстратных комплексов, образуемых в ходе реакции. Спад биолюминесценции определяет скорость распада фермент-субстратного комплекса во времени и подчиняется экспоненциальному закону. Константа спада биолюминесценции ( $k_{cat}$ ) вычисляется по спаду свечения от 80% до 20% от максимальной интенсивности:  $k_{cat} = (\ln I_{80} - \ln I_{20})/t$ . Как правило, проводили не менее 5 измерений. Статистическая обработка полученных экспериментальных результатов проводится методом наименьших квадратов с использованием пакета программ Excel for Windows-98.

## Результаты и обсуждение

Присутствие глицерина и сахарозы в реакционной среде увеличивает вязкость реакционной среды для катализа и изменяет кинетику биферментной биолюминесцентной реакции. Показано, что глицерин и сахароза в разной степени ингибируют интенсивность свечения биолюминесценции диапазоне температур от 20–25 °С (рис. 1а). Сахароза является более сильным ингибитором биферментной биолюминесцентной реакции по сравнению с глицерином при температурах, которые ниже или равны оптимальному значению температуры для водно-буферных смесей, который равен 25 °С, как показано в работах [6], [7]. Следовательно,

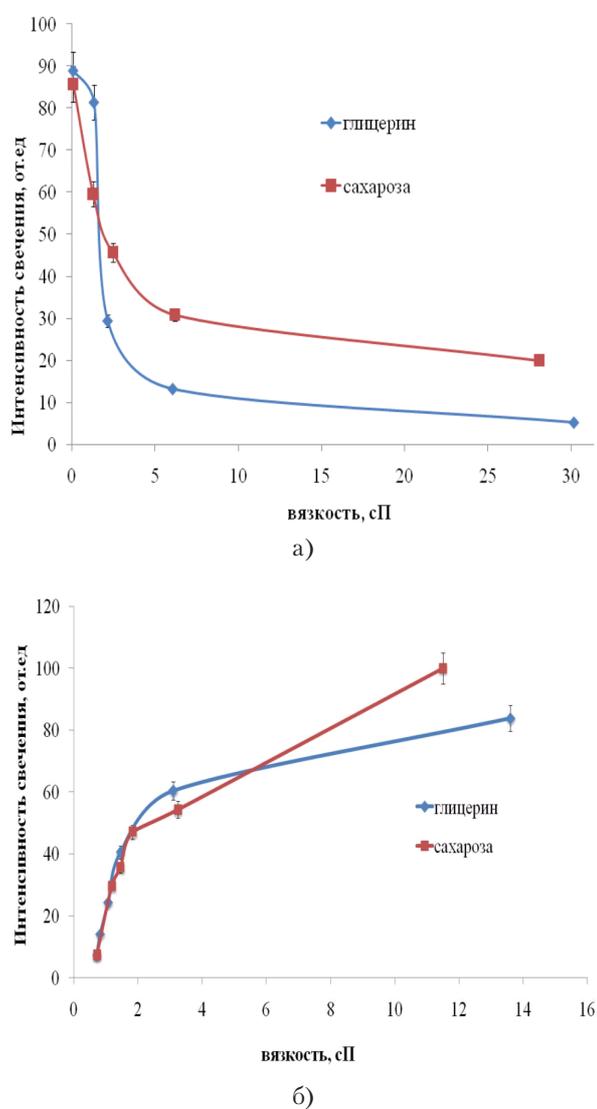


Рисунок 1. Зависимость максимальной интенсивности свечения биолюминесцентной реакции  $I_{max}$  от вязкости реакционной смеси при температурах: а)  $T = 20$  °С; б)  $T = 35$  °С

при этих температурах увеличенная вязкость реакционной среды препятствует образованию фермент-субстратных комплексов, образуемых в ходе реакции, и зависит от природы используемого вязкого растворителя.

При инкубировании ферментов при температурах на  $10^{\circ}\text{C}$  выше оптимума наблюдается увеличение значения  $I_0$  биолюминесценции биферментной биолюминесцентной системы с увеличением вязкости реакционной среды (рис. 1б), причем эти зависимости как для сахарозы, так и для глицерина практически совпадают, что свидетельствует о зависимости скорости ферментативных процессов главным образом от вязкости реакционной среды, тогда как природа растворителя не является фактором, определяющим изменение интенсивности свечения биолюминесценции.

Полученные результаты показали, что увеличение вязкости реакционной среды, путем увеличения добавляемых концентраций глицерина и сахарозы, приводит к увеличению термостабильности биферментной системы: температурный оптимум увеличивается на  $10^{\circ}\text{C}$  по сравнению с контролем и наблюдается при близких значениях вязкости реакционной среды, моделируемой разными по природе растворителями (глицерином и сахарозой). Т. о., показано, что моделирование реакционной среды для ферментативного катализа повышением ее вязкости защищает биферментную биолюминесцентную систему от термоинактивации при повышенных температурах.

Изучение кинетики термоинактивации биферментной системы светящихся бактерий по-

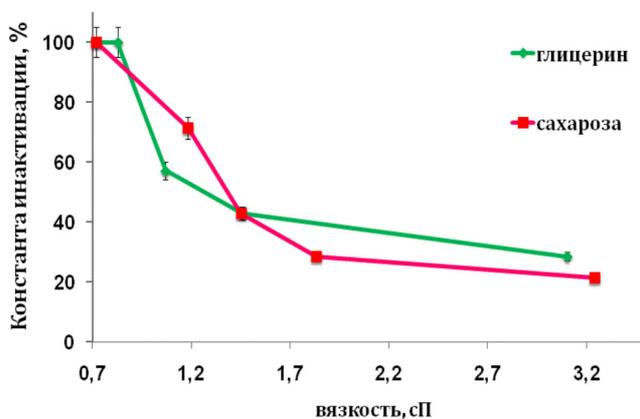


Рисунок 2. Зависимость величины константы скорости инактивации биферментной системы *NAD(P)H:FMN*-оксидоредуктаза-люцифераза от вязкости при  $T=35^{\circ}\text{C}$

казало, что кинетика термоинактивации в контроле и в присутствии в реакционной смеси различных концентраций глицерина и сахарозы имеет принципиально одинаковый характер на всём диапазоне температур: зависимости в полупологарифмических координатах от времени, представляют собой прямые, т. е. фермент инактивируется в соответствии с кинетикой реакции первого порядка.

Таким образом, было показано, что во всех случаях не зависимо от добавляемых концентраций глицерина и сахарозы, потеря активности описывалась простой экспонентой. Это свидетельствует о том, что термоинактивация биферментной системы в экспериментальных моделях является мономолекулярным процессом и значение константы первого порядка скорости инактивации является величиной, напрямую характеризующей термостабильность белковой глобулы в данных условиях. Зависимость константы скорости термоинактивации от вязкости представлены на Рис.2. Константа скорости инактивации первого порядка уменьшается, следовательно, стабильность биферментной системы увеличивается, с увеличением вязкости растворителя в равной степени, а значит и не зависит от природы растворителя.

Органические растворители, увеличивающие вязкость реакционной среды, оказывают существенное влияние не только на интенсивность светоизлучения биферментной биолюминесцентной системы, но и на константу спада биолюминесценции ( $k_{cat}$ ), которая, характеризует распад возбужденного интермедиата. Показано, что при температурах выше оптимального значения при увеличении концентраций глицерина происходит постепенное и монотонное увеличение величины  $k_{cat}$ , относительно контроля. В присутствии 50% концентрации глицерина наблюдается максимальная величина  $k_{cat}$ , увеличение происходит в 3,5 раза относительно контроля. Противоположная картина наблюдается в реакционной среде в присутствии сахарозы: величина  $k_{cat}$  при добавлении 20% сахарозы резко падает до 10% относительно контроля. Последующее увеличение добавляемых концентрации сахарозы влечет небольшие уменьшения величины  $k_{cat}$ , минимальное значение  $k_{cat}$  наблюдается в присутствии 40% сахарозы и составляет 5% от контроля. Т. о., показано,

что в реакционных смесях с глицерином при высоких температурах происходит уменьшение времени жизни долгоживущего интермедиата ферментативной реакции, что ведет к уменьшению времени светоизлучения реакции, тогда как в присутствии сахарозы происходит стабилизация возбужденного интермедиата реакции.

### Выводы

В результате проведенного исследования показано, что сахароза является более эффек-

тивным проектантом биферментной бактериальной биолюминесцентной системы по сравнению с глицерином. В сахарозе наблюдается стабилизация долгоживущего интермедиата реакции. Термоинактивация ферментов биолюминесцентной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в условиях различной вязкости является мономолекулярным процессом, что указывает на отсутствие процессов диссоциации ферментов на субъединицы и последующей денатурации.

27.08.2013

**Работа выполнена при поддержке мега-проекта «Биолюминесцентные биотехнологии» (договор №11.G34.31.0058) в рамках Постановления Правительства РФ №220 от 9 апреля 2010 г. «О мерах по привлечению ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования», Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.A18.21.1911**

### Список литературы:

1. Kratasyuk, V.A., Esimbekova E.N., Gladyshev M.I., Khromichuk E.B., Kuznetsov A.M., Ivanova E.A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems // Chemosphere. – 2001. -№42. – P. 909-915.
2. Tu S.C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases // Photochem. Photobiol. Sci. – 2007. №7. – P. 183-188.
3. Doukyu, N., Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes // Biochemical engineering journal. – 2010. – №48. – P. 270-282.
4. Sukovataya I.E., Tyulkova N.A. Kinetic analysis of bacterial bioluminescence in water-organic media // Luminescence. – 2001, – №16. – P.271-273.
5. Tjul'kova N.A. Purification of bacterial luciferase from Photobacterium leiognathi with use FPLS-sistem // Jezowska-Trzebiatowska B., ed. Biological luminescence. – 1989. – P. 369-374.
6. Tyulkova, N.A., Sandalova T.P. Comparative study of temperature effects on bacterial luciferases // Biochemistry. – 1996. V. 2. – №61. – P. 205-214.
7. Sutormin.O.S., Sukovataya I.E., Kratasyuk V.A. Thermal stability of coupled enzyme system NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase in solvents of different viscosity // Luminescence. – 2012. V. 27. – №2. – P. 162.

Сведения об авторе:

**Кратасюк Валентина Александровна**, заведующий кафедрой биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, e-mail: valkrat@mail.ru

**Суковатая Ирина Егоровна**, заместитель директора Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, кандидат биологических наук, доцент, e-mail: ISukovataya@sfu-kras.ru

**Сутормин Олег Сергеевич**, аспирант кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, e-mail: sutormin.oleg@yandex.ru 660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79, ауд. 1308

UDC 543.94, 577.151.03

Sutormin.O.S., Sukovataya I.E., Kratasyuk V.A.

### THE STABILIZING EFFECT OF GLYCEROL AND SUCROSE ON THE COUPLED ENZYME SYSTEM OF BIOLUMINESCENCE BACTERIA NADH:FMN-OXIDOREDUCTASE-LUCIFERASE

The influence of the viscosity of the reaction medium on the thermal stability and thermal inactivation kinetics of the coupled enzyme system of bioluminescence bacteria NAD(P)H:FMN-oxidoreductase-luciferase was investigated. It was showed that the increasing viscosity of the reaction medium leads to increase of thermal stability of the coupled enzyme system. Sucrose stabilizes long-lived intermediate of bioluminescent reaction.

Key words: the coupled enzyme system of bioluminescence bacteria NAD(P)H:FMN-oxidoreductase-luciferase; stabilization of enzymes; glycerol; sucrose.