

СТАБИЛИЗАЦИЯ БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ NADH:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗА + ЛЮЦИФЕРАЗА ПУТЕМ ПОМЕЩЕНИЯ В ГЕЛИ И ВЯЗКИЕ РАСТВОРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

На сегодняшний день ключевой задачей является развитие методов экологического мониторинга. Метод биотестирования с использованием ферментов из светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктазы и люциферазы (Red + Luc) имеет неоспоримые преимущества: простота, быстрота анализа, невысокая стоимость. Однако разработанные к настоящему времени ферментативные реагенты требуют ряда усовершенствований, и в большей степени - повышения стабильности. Целью работы было создание усовершенствованного высокостабильного ферментативного реагента для биOLUMИнесцентного анализа уровня загрязненности окружающей среды.

Показано, что использование крахмала и желатина в качестве стабилизирующих добавок, повышающих вязкость среды, нецелесообразно. Подтверждено, что для создания стабильных ферментативных реагентов на основе Red + Luc перспективной технологией является иммобилизация путём включения в гели биополимеров [1].

Показано также, что наличие буферных солей оказывает значительное влияние на динамику высыхания капель в ходе процедуры иммобилизации Red + Luc в гели желатина / крахмала (рисунок). Обнаружено воздействие кристаллизации на ферменты, включаемые в гель. Из полученных результатов был сделан вывод о том, что для повышения активности и стабильности ферментативных реагентов следует ограничить содержание в их составе буферных солей.

Выяснить точное местоположение ферментов внутри иммобилизованных реагентов не удалось. Выявлено, что субстрат FMN распределен по всей площади высохших крахмальных капель и локализован в центральной части высохших желатиновых капель. Добавление субстрата тетрадеканала приводит к нарушению однородности крахмальных высушенных капель, а именно к возникновению зернистой структуры геля и круговых кристаллов буферных солей (сферолитов) в центральной части.

В результате проведенного исследования была модифицирована методика приготовления ферментативных реагентов для биOLUMИнесцентного анализа, и был получен более стабильный реагент путем иммобилизации Red + Luc в желатиновый гель. Данный ферментативный реагент может быть применен в области экологического мониторинга с целью предупреждения возможных загрязнений воды, почвы и воздуха.

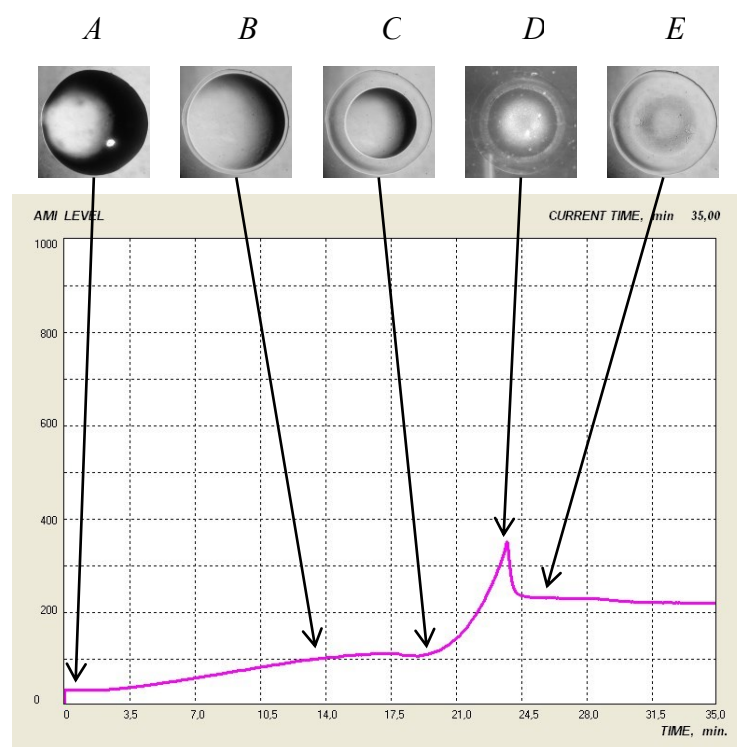


Рис. Этапы высыхания капли 1 %-го раствора желатина в калий-фосфатном буфере и соответствующие им участки кривой акустомеханического импеданса: *A – C* — уплотнение купола капли и гелеобразование; *C – D* — кристаллизация солей в гелевой матрице; *D – E* — испарение остатков свободной воды.

Список литературы

1. Говорун А. Е., Есимбекова Е. Н., Кратасюк В. А. Функционирование НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы в условиях макромолекулярного краудинга: моделирование *in vitro* // Доклады Академии наук. 2019. Т. 486. № 4. С. 500-503.