

## ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРИНА И САХАРОЗЫ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ СОПРЯЖЕННОЙ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ $NAD(P)H:FMN$ - ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА

Сутормин О.С

Научный руководитель – доцент Суковатая И.Е.

*Сибирский федеральный университет*

Все обширные знания, накопившиеся в области механистической энзимологии, были получены изучением ферментов в водных растворах. Наше понимание ферментативного катализа может увеличиться, если в фундаментальные измерения будет внесено экспериментирование с использованием органических растворителей, как реакционной среды. Чтобы понять преимущество протекания реакций в неводных средах нужно необходимо исследовать основные и ключевые характеристики этих реакций: зависимость ферментативных свойств от природы растворителя, количество воды, требуемой для катализа, каталитические параметры и конформационная стабильность фермента в органических растворителях и т.д. Объяснение таких проблем должно обеспечить понимание в таких вопросах, как белковая структура и динамика, роль воды в ферментативном катализе и белковые внутримолекулярные взаимодействия.

Для направленного изменения свойств белков наряду с геной инженерией и белковым дизайном одним из перспективных подходов считается «дизайн среды», который предполагает многообразие методов в использовании неводных растворителей и их смесей, или водно-органических растворов.

Одним из перспективных подходов к решению проблемы стабилизации сопряженной ферментной системы  $NAD(P)H:FMN$ -оксидоредуктаза-люциферазы считается «дизайн среды», который предполагает воздействие на конформацию белка и его функции путём изменения среды, окружающей фермент.

С этой точки зрения гораздо важнее исследовать функционирование не отдельно взятого фермента, а цепей сопряженных ферментативных реакций., кроме того обладает большей чувствительностью, чем моноферментная, и в настоящее время широко используются для мониторинга окружающей среды, контроля чистоты воздуха, качества природных и сточных вод, в медицине и гигиене, в сельском хозяйстве, пищевой промышленности и других областях.

Отличительной особенностью сопряженной ферментной системы  $NAD(P)H:FMN$ -оксидоредуктаза-люцифераза является возможность регистрации кванта света, который может быть способом оценки при использовании биферментной билюминесцентной системы в различных аналитических методах. В результате первой реакции, катализируемой  $NADH:FMN$ -оксидоредуктазой, происходит восстановление  $FMN$  с помощью  $NADH$ . Вторая реакция, катализируемая люциферазой, является билюминесцентной и сопровождается испусканием кванта света.

В данной работе исследовано влияние глицерина и сахарозы на структурную стабильность и функцию сопряженной ферментной системы  $NAD(P)H:FMN$ -оксидоредуктаза-люцифераза с помощью изменений физико-химических характеристик среды. Отдельно исследовался температурный оптимум системы.

Измерения проводились на Биолуминометре *Temer BioSystems* (*Temer BioSystems, Sunnyvale, USA*), термостате *Vt8 termex* (США), использовалась люцифера 95% очистки. В ходе биферментной биолуминесцентной реакции регистрировали следующие кинетические параметры: интенсивность свечения, константу спада и квантовый выход. Максимум интенсивности свечения ( $I_{max}$ ) характеризует начальную скорость и концентрацию фермент-субстратных комплексов, образуемых в ходе биферментной реакции. Спад биолуминесценции определяет скорость распада фермент-субстратного комплекса и во времени подчиняется экспоненциальному закону. Константа спада биолуминесценции ( $k_{cn}$ ) вычисляется по спаду свечения от 80% до 20 % от максимальной интенсивности:  $k_{cn} = (\ln I_{80} - \ln I_{20}) / t$ . Общее число квантов  $Q = I_{max} / k_{cn}$  пропорционально общему числу молекул фермент-субстратного комплекса, распавшихся с излучением.

Результаты исследования показали, что максимум активности бактериальной люциферазы в отсутствие добавок наблюдается при температуре 25 °С. В том время, как максимум свечения люциферы в присутствии концентраций 5,43 М глицерина с вязкостью 6,05 мПа·с и 4,06 М сахарозы с вязкостью 7,2 мПа·с, сдвигается и наблюдается при температуре 30 °С.

Было показано, энергия активации биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза зависит от микроокружения ферментов. При добавлении глицерина энергия активации понижается по сравнению с контрольным значением (равным 1,05 кДж/(моль·К)) и равна 0,66 кДж/(моль·К). В сахарозе энергия активации для этого процесса увеличивается до 1,67 кДж/(моль·К).

Полученные результаты показали, что увеличение вязкости приводит к изменению температурного оптимума активности бактериальной люциферазы: наблюдается сдвиг в сторону более высоких температур. Одинаковый сдвиг оптимума в разных по природе вязких растворителях может свидетельствовать о том, что в большей степени температурный оптимум зависит от вязкости реакционной среды, а не от природы растворителя. Увеличение вязкости реакционной среды приводит не только к сдвигу температурного оптимума в сторону более высоких температур, но и к увеличению значения максимальной интенсивности свечения по отношению к контролю. В данном случае изученные вязкие органические растворители выступают как активаторы биферментной системы.

В присутствии сахарозы происходит увеличение величины энергии активации. Объяснить полученный результат, вероятно, можно влиянием органических растворителей на термодинамические состояния реагирующих веществ. В присутствии органических веществ происходит увеличение способности субстратов растворяться в органических растворителях и изменяется субстратная специфичность. Появление способности субстратов легко растворяться органических растворителях, в свою очередь приводит к термодинамической стабилизации субстрата в основном состоянии. Таким образом, для того чтобы термоинактивировать сопряженную ферментативную систему нужны дополнительные затраты энергии, чем в основном состоянии. Глицерин не показывает схожих с сахарозой стабилизационных свойств. Вероятно, это связано, что глицерин является не полярным органическим растворителем и его присутствие не приводит к значительным изменениям в структуре фермента, которые могли бы улучшить стабилизацию фермента при высоких температурах. Зато полученные результаты показали, что присутствие неполярного растворителя приводит к увеличению ферментативной активности при температурах выше оптимума температур.

Работа поддержана грантами министерства образования и науки № 02.740.11.0766 и № 2.2.2.2/5309 и грантом U.S CRDF (grant RUX0-002-KR-06/BP4M02).

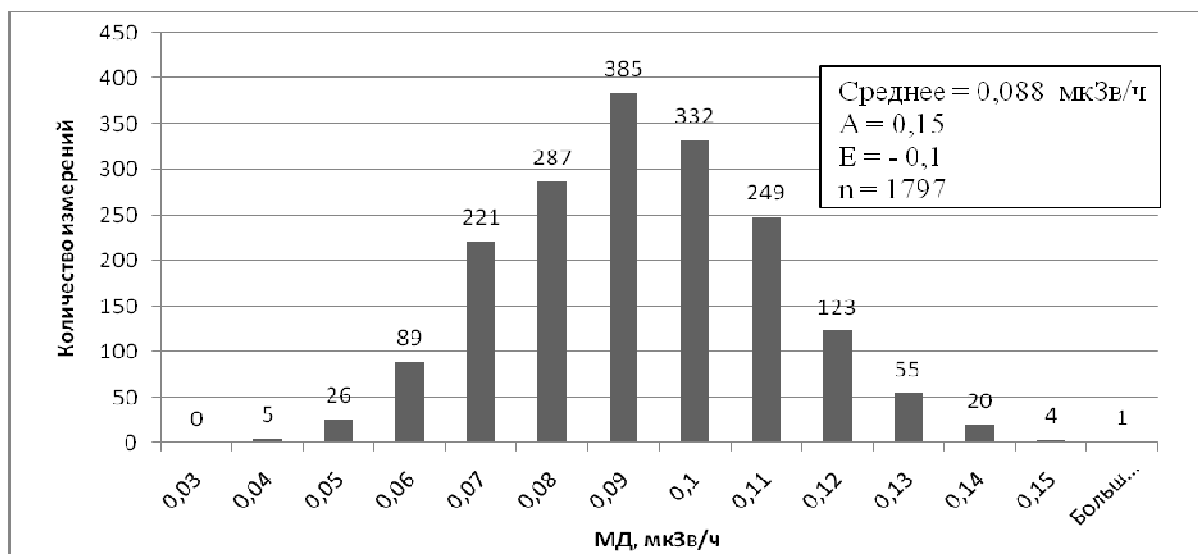


Рисунок 1. Частотное распределение результатов измерения МД при АГС

Значения коэффициентов асимметрии (А) и эксцесса (Е), характерные для этого распределения, меньше критических величин, соответственно равных 0,17 и 0,34 при  $p = 0,99$ . Это свидетельствует о соответствии распределения полученных результатов нормальному закону и, тем самым, подтверждает возможность использования среднего арифметического значения, равного  $0,088 \pm 0,037$  мкЗв/ч, для установления среднего значения гамма-фона и диапазона его варьирования, характерного для всех маршрутов АГС.

Ни один из средних результатов не выходит за пределы варьирования общего среднего, ограниченные 95 % доверительной вероятностью, равные 0,050...0,124 мкЗв/ч. Диапазон варьирования отдельных частных результатов из числа 1 797 значительно шире и составляет 0,037...0,156 мкЗв/ч. Причина этого заключается в большой погрешности этих результатов, превышающей  $\pm 50$  %, обусловленной спецификой проведения АГС.

Различия между средними значениями, характерными для отдельных районов, с учетом их стандартных отклонений также статистически незначимы. Поэтому для всех районов может быть принято ранее вычисленное среднее значение гамма-фона на автодорогах, равное  $0,088 \pm 0,037$  мкЗв/ч. Участков автодорог с повышенными значениями гамма-фона, превышающими среднее значение в два и более раз, не выявлено.

По результатам гамма-съемки и дозиметрических измерений на КП и ТУ получены средние значения МД гамма-излучения  $0,100 \pm 0,012$  мкЗв/ч и  $0,101 \pm 0,016$  мкЗв/ч соответственно.

Частотное распределение результатов измерения удельной активности  $^{137}\text{Cs}$ , показанное на рисунке 2. Оно соответствует, так называемому, гамма-распределению, которое относится к числу общих статистических моделей и используется для описания совокупностей случайных величин, ограниченных с одной стороны.

Гамма-распределение является частным случаем гамма-функции, при определенных параметрах которой получают различные виды распределений, в том числе нормальное и логарифмически нормальное распределения, которые являются «привилегированными» при описании закономерностей распределения микрокомпонентов в земных объектах.

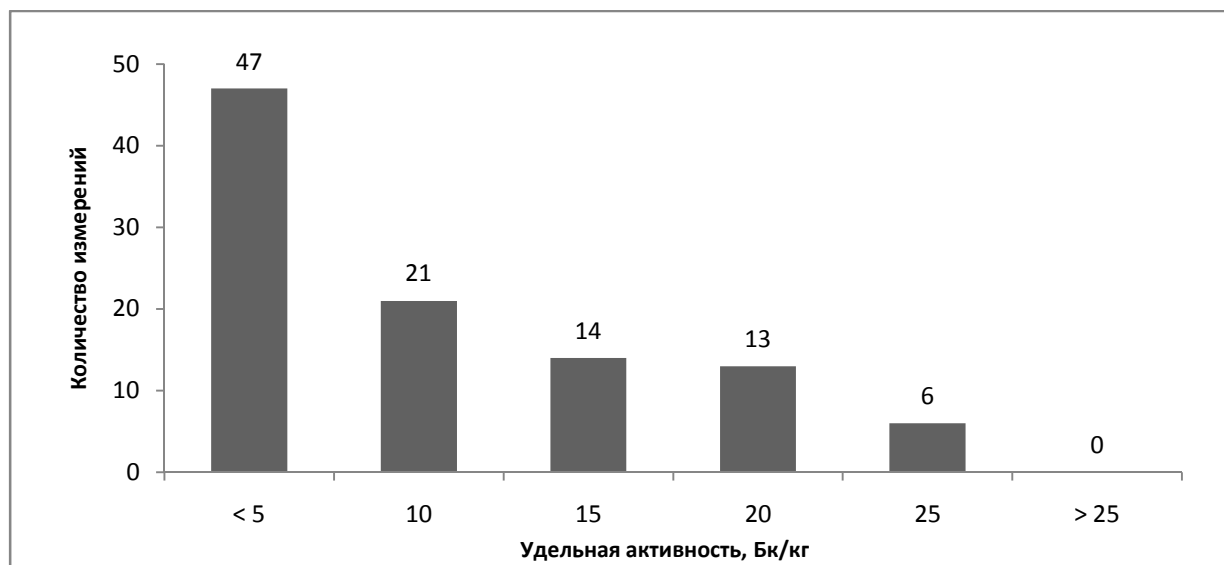


Рисунок 2. Частотное распределение результатов определения УА  $^{137}\text{Cs}$  в пробах почв, отобранных на КП и ТУ

В случае, показанном на рисунке 2, гамма-распределение можно рассматривать как вариант логнормального распределения, усеченного со стороны низких значений УА  $^{137}\text{Cs}$ . Одна из причин возникновения логнормального распределения связана с особенностью распределения микрокомпонентов в природных средах.

Эта особенность заключается в том, что размах варьирования содержаний микрокомпонентов в сторону высоких значений много больше, чем в сторону низких значений, тогда как математическое ожидание наоборот смещено в сторону малых значений, начинающихся с нулевых.

Для выборок, подчиняющихся гамма-распределению, в качестве оценки параметра положения обычно используют среднее арифметическое значение, доверительный интервал которого для выборок небольшого объема несимметричен и определяется произведением среднего арифметического на коэффициенты  $\gamma_1$  и  $\gamma_3$ , специально предназначенные для определения доверительных границ в случае гамма-распределения. Для выборки численностью 185 измерений при доверительной вероятности  $p = 0,95$  эти коэффициенты равны 1,14 и 0,89.

С учетом вышеизложенного, УА  $^{137}\text{Cs}$ , в пробах почво-грунтов, отобранных на КП и ТУ, оценивается средним значением 8,6 Бк/кг, заключенным в доверительном интервале 7,7...9,8 Бк/кг. А учитывая большой объем выборки, при котором доверительный интервал становится близким к симметричному, полученный результат можно записать в более привычном виде –  $8,6 \pm 1,2$  Бк/кг.

Было установлено, что вклад в формирование гамма-фона на территории центральных районов Красноярского края за счет излучения ЕРН составляет приблизительно 58...60%, «космический» компонент вносит около 20%, излучения ТРН (прежде всего  $^{137}\text{Cs}$ ) глобальных и локальных выпадений обычно не превышают 20...22%, а зачастую гораздо меньше. При этом почвы в пределах КП и ТУ, расположенных на левобережье р. Енисей в ближней зоне от ФГУП «ГХК» (на удалении до 8...10 км, за пределами поймы Енисея), как правило, характеризуются повышенными значениями УА  $^{137}\text{Cs}$ , достигающими значений 25...30 Бк/кг.

Таким образом, статистическая обработка полученных результатов позволила: установить частотное распределение значений гамма-фона и УА основного дозообразующего техногенного радионуклида  $^{137}\text{Cs}$  в почвенном покрове; определить

средние значения этих параметров и доверительные интервалы для территории каждого из административных районов; количественно оценить вклад каждого из компонентов, формирующих гамма-фон.

Обобщение и анализ полученных результатов с учетом географического положения, ландшафтно-геохимических и почвенных условий территории свидетельствуют об отсутствии статистически значимого вклада предприятий ФГУП «ГХК» на формирование местного гамма-фона даже в ближней 20-ти километровой зоне наблюдения.