

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Федеральный исследовательский центр  
КРАСНОЯРСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**Обособленное подразделение  
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**ТЕЗИСЫ  
КОНКУРСА-КОНФЕРЕНЦИИ  
МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ И СПЕЦИАЛИСТОВ**

**31 мая 2021 г.**

## ПРОГРАММА

### НАУЧНОЙ СЕССИИ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ И СПЕЦИАЛИСТОВ ИБФ СО РАН 2021 ГОДА

Открытие конкурса-конференции 31 марта (среда), в 10:00, ауд. 1-08

Вступительное слово:

Председатель конкурсной комиссии, д.б.н., Надежда Николаевна Сущик

Доклады молодых учёных (10 мин. доклад + 5 мин. вопросы):

- |   |   |                                     |
|---|---|-------------------------------------|
|   | <b>Андрущенко Павел Юрьевич</b>   |                                     |
| 1 | Использование чешуи для идентификации жилых и мигрирующих из притоков особей байкальского хариуса на участке реки Енисей с измененным гидрологическим режимом | 10 <sup>05</sup> – 10 <sup>20</sup> |
|   | <b>Копылова Ксения Васильевна</b>   |                                     |
| 2 | Сравнение эффектов коммерческих препаратов пестицидов и их действующих веществ на ферментативные реакции, катализируемые оксидоредуктазами                    | 10 <sup>20</sup> – 10 <sup>35</sup> |
|   | <b>Бульхин Александр Олегович</b>   |                                     |
| 3 | Длинноцепочечные алкеноны в верхних слоях донных отложений озер Северо-Минусинской котловины как потенциальный биоиндикатор палео-климата                     | 10 <sup>35</sup> – 10 <sup>50</sup> |
|   | <b>Ефремов Максим Константинович</b>  |                                     |
| 4 | Биолюминесцентная реакция искусственной люциферазы NanoLuc с целентеразином и его белок-связанной формой (СВР)  | 10 <sup>50</sup> – 11 <sup>05</sup> |
|   | <b>Дудаев Алексей Евгеньевич</b>  |                                     |
| 5 | Модификация поверхности плёнок из ПГА разного химического состава методом лазерной абляции  | 11 <sup>05</sup> – 11 <sup>20</sup> |
|   | <b>Вахрушев Вадим Игоревич</b>  |                                     |
| 6 | Происхождение аномальной активности <sup>137</sup> Cs в слоях донных отложений реки Енисей  | 11 <sup>20</sup> – 11 <sup>35</sup> |
|   | <b>Калябина Валерия Павловна</b>  |                                     |
| 7 | Дизайн биосенсора на основе биферментной системы светящихся бактерий для анализа загрязнения сложных по составу сред  | 11 <sup>35</sup> – 11 <sup>50</sup> |
|   | <b>Посохина Екатерина Дмитриевна</b>  |                                     |
| 8 | Выделение и изучение некоторых свойств экстрацеллюлярной оксидазы из высшего гриба <i>Neonothopanus nambi</i>   | 11 <sup>50</sup> – 12 <sup>05</sup> |
|   | <b>Колесник Ольга Владиславовна</b>   |                                     |
| 9 | Гуминовые вещества как природные радиопротекторы на примере радионуклида трития и морских бактерий  | 12 <sup>05</sup> – 12 <sup>20</sup> |

- Суковатый Лев Алексеевич**
- 10 Анализ доступности активного центра бактериальной люциферазы для молекул осмолитов методами молекулярной динамики 12<sup>20</sup> – 12<sup>35</sup>
- Башмакова Евгения Евгеньевна**
- 11 Выявление онкомаркера MIA биOLUMиНесцентным микроанализом 12<sup>35</sup> – 12<sup>50</sup>
- Рыльцева Галина Александровна**
- 12 Функциональная оценка полигидроксиалканоатов для применения в качестве компонента биоактивных сосудистых имплантатов 12<sup>50</sup> – 13<sup>05</sup>
- Коротов Игорь Александрович**
- 13 Высокоактивные делеционные мутанты люциферазы *Metridia longa*: получение и характеристика репортерных свойств 13<sup>05</sup> – 13<sup>20</sup>
- Лоншакова-Мукина Виктория Ивановна**
- 14 Стабильные многокомпонентные иммобилизованные препараты на основе бутирилхолинэстеразы для ингибиторного анализа 13<sup>20</sup> – 13<sup>35</sup>
- Сапожникова Кристина Юрьевна**
- 15 Рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 и синтез полигидроксиалканоатов на различных растительных маслах 13<sup>35</sup> – 13<sup>50</sup>
- Лисица Альберт Евгеньевич**
- 16 Влияние диффузии на кинетику реакции, катализируемой бактериальной люциферазой 13<sup>50</sup> – 14<sup>05</sup>

**Подведение итогов конференции экспертной комиссией:**

д.б.н. Надежда Николаевна Сущик – Председатель  
д.ф.-м.н. Сергей Игоревич Барцев  
к.б.н. Мария Юрьевна Трусова  
к.б.н. Татьяна Анатольевна Зотина  
к.б.н. Елена Владимировна Еремеева

**Заключительное слово:**

Председатель конкурсной комиссии, д.б.н., Н.Н. Сущик

## **Использование чешуи для идентификации жилых и мигрирующих из притоков особей байкальского хариуса на участке реки Енисей с измененным гидрологическим режимом**

Андрущенко Павел Юрьевич

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

Сибирский федеральный университет

Зарегулирование стока рек плотинами гидроэлектростанций (ГЭС) оказывает существенное воздействие на популяции мигрирующих видов рыб, препятствуя их перемещению между участками верхнего и нижнего бьефа. Нарушение уровенного и термического режима реки в нижнем бьефе ГЭС также может приводить к изменению миграционного процесса между основным руслом и его придаточной системой. Ранее такой эффект был описан для некоторых популяций европейского хариуса *Thymallus thymallus*, перешедших к оседлому образу жизни на участках ниже плотин (Northcote, 1995). Мы предполагаем, что сходная ситуация наблюдается в р. Енисей на участке нижнего бьефа Красноярской ГЭС, где вследствие изменения температурного режима, обитающий здесь хариус частично перестал мигрировать в притоки (Зуев и др., 2021), а также нарастил свою численность и скорость роста. Вместе с этим, хариус по-прежнему встречается в притоках термически измененного участка Енисея, что ставит вопрос о его происхождении, объеме пократной миграции и, как следствие, современной роли притоков в поддержании численности хариуса в основном русле Енисея.

В работе оценивалась возможность использования чешуи байкальского хариуса *Thymallus baicalensis* Dybowski, 1874, как маркера мигрирующих и жилых рыб на участке реки Енисей с измененным термическим режимом в нижнем бьефе Красноярской ГЭС. Тестировалась выборка из 161 особи хариуса, отловленных в основном русле Енисея вблизи устья одного из крупных притоков – реки Кан, в июле-ноябре 2019 года. Общая выборка была дифференцирована на потенциально жилых рыб, имеющих 15 и более склеритов во втором законченном годовом кольце чешуи, и потенциально мигрирующих (менее 15 склеритов). Доля мигрантов в общей выборке составила 18,6%. Наибольший их процент был отмечен в июле (24%), в августе-сентябре он составлял 20-22%, в октябре — 15%, в ноябре мигранты не встречались. Статистически значимые различия по линейным размерам между жилыми и мигрирующими рыбами 2-3 летнего возраста выявлены в июле-августе; различия по содержанию радиоцезия ( $^{137}\text{Cs}$ ) зафиксированы в августе. На основании полученных результатов предложена модель распределения хариуса, согласно которой молодые особи в летнее время массово перемещаются из крупных прогретых притоков Енисея в основное русло Енисея, где температура воды не превышает 12°C. Предложенный метод выявляет преимущественно неполовозрелых и впервые созревающих особей, расселяющихся из притоков, но мало пригоден для идентификации половозрелых рыб, осуществляющих кратковременные нерестовые миграции.

Работа выполнена при финансировании гранта Российского фонда фундаментальных исследований и Красноярского краевого Фонда поддержки научной и научно-технической деятельности № 20-44-240009.

### Литература:

- [1] Northcote T.G. (1995) Comparative biology and management of Arctic and European grayling (Salmonidae, *Thymallus*). Rev. Fish. Biol. Fisheries. 5 (2): 141-194.
- [2] Зуев И.В., Андрущенко П.Ю., Чупров С.М., Зотина Т.А. (2021) Особенности строения чешуи байкальского хариуса *Thymallus baicalensis* в условиях измененного гидрологического режима. Биология внутренних вод. 1: 47-54.

## **Сравнение эффектов коммерческих препаратов пестицидов и их действующих веществ на ферментативные реакции, катализируемые оксидоредуктазами**

Копылова Ксения Васильевна

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

Пестициды используются в сельском хозяйстве для повышения урожайности сельскохозяйственных культур и борьбы с вредителями. Многообразие целевых объектов применения пестицидов и различные физико-химические свойства действующих веществ (д.в.) привели к созданию множества препаративных форм пестицидов. Пестицидные составы содержат действующие вещества и вспомогательные ингредиенты (формулянты), которые добавляются для усиления их эффекта и стабильности. Недавние исследования показали, что формулянты не могут быть классифицированы как однозначно инертные компоненты поскольку в некоторых случаях способны оказывать негативный эффект на живые организмы. Представленная работа направлена на изучение эффектов воздействия пестицидных препаратов на ферментные системы. В рамках оценки риска концепция Путей неблагоприятного исхода (Adverse Outcome Pathways) позволяет связать экспериментальные данные с фактическими неблагоприятными исходами.

Наша работа предлагает ответить на вопрос: можно ли сделать вывод о токсичности препаративных форм пестицидов на основе сведений о токсичности их действующих веществ. Были поставлены следующие задачи: а) Оценить влияние коммерческих пестицидных препаратов и их действующих веществ на ферментные системы, катализируемые оксидоредуктазами; б) Сравнить чувствительность ферментных реакций разной длины цепи сопряжения ферментов к пестицидным препаратам и их действующим веществам.

В качестве тест-объектов были использованы: моноферментная система, катализируемая алкогольдегидрогеназой (ADH), биферментная система светящихся бактерий НАДН: ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза (R + L), и триферментная система алкогольдегидрогеназа + NADH:FMN-оксидоредуктаза + люцифераза (ADH + R + L). Анализ изменений активности ферментов в присутствии и отсутствие анализируемых веществ проводили оптическими методами. Для количественной оценки ингибирующего действия токсикантов на ферменты использовали параметр  $IC_{50}$ , представляющий собой концентрацию токсиканта, вызывающую снижение активности ферментных систем на 50%.

Проведен анализ влияния пестицидных препаратов «Дельцид» (д.в. дельтаметрин) и «Ликвидатор» (д.в. глифосат) и их действующих веществ на ферментные системы. Было показано, что препарат «Ликвидатор» оказывает больший ингибирующий эффект на ферментные системы по сравнению с действующим веществом. Значения  $IC_{50}$  для глифосата и «Ликвидатора» составили  $10561 \pm 950,5$  и  $0,8 \pm 0,08$  мг/л соответственно при использовании в качестве тест-объекта биферментной системы светящихся бактерий R+L. Аналогично значения  $IC_{50}$  для дельтаметрина и «Дельцида» составили  $1 \pm 0,12$  и  $0,06 \pm 0,007$  мг/л соответственно при использовании в качестве тест-объекта триферментной системы ADH+R + L. Исходя из наших данных, можно сделать вывод, что анализ токсичности исключительно действующих веществ может не позволить в полной мере оценить токсичность пестицидных препаратов в целом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта № 20-44-242001.

## Длинноцепочечные алкеноны в верхних слоях донных отложений озер Северо-Минусинской котловины как потенциальный биоиндикатор палео-климата

Бульхин Александр Олегович

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

Использование молекулярных биохимических маркеров палео-климата является передовым направлением в области палео-лимнологических реконструкций. Одним из наиболее перспективных классов биомаркеров являются длинноцепочечные алкеноны (ДЦА) – липиды, синтезируемые исключительно микроводорослями отдела *Haptophyta* порядка *Isochrysidales*, служащие индикаторами температуры и в некоторых случаях солёности среды обитания. Химическая структура ДЦА представлена С35 – С42 метил- и этил-кетонами с 2 – 4 ненасыщенными связями в алифатической цепи. Было показано, что длина углеродной цепи алкенонов коррелирует с солёностью воды, а также, что содержание тетра-ненасыщенных алкенонов снижается с увеличением солёности. В настоящее время, выделение гаптофитовых водорослей из природных водоемов в чистую культуру является трудной задачей, поэтому их биоразнообразие в озерах выявляется молекулярно-генетическими методами. Цель работы – выявить зависимости в распределении количества и состава ДЦА в верхних слоях донных отложений двадцати озер Северо-Минусинской котловины и видовое биоразнообразие алкенон-продуцентов от физико-химических факторов среды.

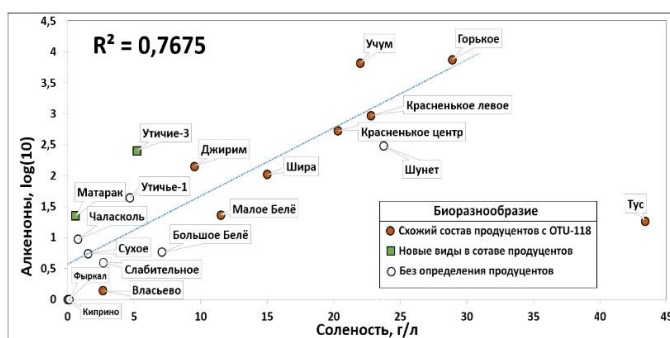


Рис. 1. Зависимость содержания алкенонов от солёности озер и видовой состав продуцентов

Керны донных отложений озер отбирали в конце июля 2019 г и конце мая 2020 г. В лаборатории от кернов отделяли верхний слой толщиной в 1 см. Пробы высушивали, фильтровали и омыляли. Неомыляемые фракции с алкенонами анализировались методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Отбор проб воды и полевые измерения проводились вблизи точек отбора донных отложений. Было выявлено, что в верхних слоях донных отложений основными фракциями являются ДЦА С37, С38 и С39 с 4, 3 и 2-мя транс-двойными связями, а С40 с 3 и 2-мя. Содержание алкенонов ранжировалось от 7,4 мг/г до 0,4 мкг/г. Основными алкенон-продуцентами являются представители семейства *Isochrysidales* II группы, схожие по видовому составу во всех выбранных для генетического анализа озерах, особо часто встречался вид OTU-118. В исключения попали озера Матарак и Утичье-3, где отличался состав продуцентов и наблюдалась III группа. Озеро Тус выбивается из ряда по содержанию ДЦА при высоких концентрациях солей, что соотносится с литературными данными. Зависимость содержания ДЦА от солёности озер с основными алкенон-продуцентами представлены на рисунке 1. Содержание алкенонов было переведено в  $\log(10)$  для удобства.

Показано, что содержание алкенонов может служить качественным индикатором солёности озера, что позволит реконструировать динамику солёности водоемов по распределению алкенонов в кернах донных отложений.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта РФФИ-Тайвань 21-54-52001.

## Биолюминесцентная реакция искусственной люциферазы NanoLuc с целентеразином и его белок-связанной формой (СВР)

Ефремов Максим Константинович

Сибирский федеральный университет

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

NanoLuc – искусственная люцифераза, созданная на основе каталитической субъединицы люциферазы глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*. В результате мутагенеза (финальный вариант белка содержит более 10% аминокислотных замен) получен вариант, который при использовании нового синтетического субстрата — фуримазина, проявляет 150-кратную активность по сравнению с люциферазами *Photinus* и *Renilla* [1]. Малый размер (19 kDa) и уникальная яркость биолюминесценции делают NanoLuc привлекательной для применения в качестве биолюминесцентного репортера в молекулярном анализе.

В ходе данной работы был получен препарат рекомбинантной люциферазы NanoLuc в высокоочищенном виде и изучены параметры его ферментативной кинетики при взаимодействии с двумя типами субстрата целентеразина – свободным и иммобилизованным в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимом целентеразин-связывающем белке (СВР) мягкого коралла *Renilla muelery* [2] (Рис. 1).

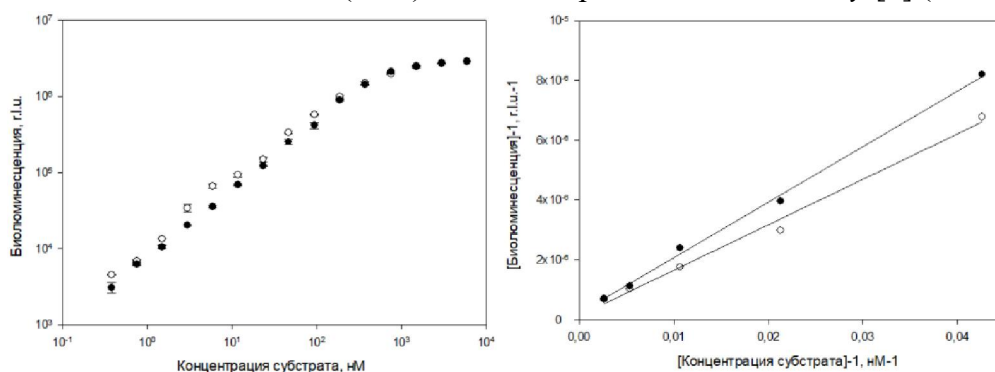


Рис. 1. Слева – зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации целентеразина (●) и СВР (○). Справа – график в двойных обратных координатах (Лайнуивера-Берка). Концентрация NanoLuc = 1 нМ в обоих экспериментах. Каждая точка – среднее значение от 3 независимых измерений.

Таблица 1. Параметры ферментативной кинетики NanoLuc<sup>1</sup>

Параметр ферментативной кинетики	Субстрат	
	Целентеразин	Целентеразин-связывающий белок
$K_m$ , М	$3,7 \cdot 10^{-7}$	$0,45 \cdot 10^{-7}$
$V_{max}$ , р.л.у.	$2,9 \cdot 10^3$	$0,36 \cdot 10^3$
$K_{cat}$ ( $V_{max}/[E]$ ), с <sup>-1</sup>	$2,9 \cdot 10^6$	$0,36 \cdot 10^6$
$K_{cat}/K_m$ , М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	$7,9 \cdot 10^{12}$	$8 \cdot 10^{12}$

<sup>1</sup>термин «кажущиеся» опущен

Как видно из представленных данных (Таблица 1), отношение  $k_{cat}/K_m$  составило приблизительно  $8 \cdot 10^{12} \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$  для обоих субстратов, что может означать, что оба типа субстрата окисляются люциферазой с одинаковой эффективностью.

Автор выражает благодарность соавторам работы, д.б.н. Л. А. Франк и к.б.н. В. В. Красицкой.

Литература:

- [1] Hall M. P., Unch J., Binkowski B. F., et al., Chem. Biol., V.7, PP. 1848–1857 (2012).  
 [2] Titushin M. S., Markova S. V., Frank L. A., et al., Photochem Photobiol Sci, V.7(2), PP.189-196 (2008).

## **Модификация поверхности плёнок из ПГА разного химического состава методом лазерной абляции**

Дудаев Алексей Евгеньевич

*Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН*

Ассортимент материалов синтетического и природного происхождения постоянно расширяется, но лишь немногие из них находят применение в практике, особенно в области биомедицины. Материалы биомедицинского назначения, особенно предназначенные для технологий клеточной и тканевой инженерии, должны отвечать спектру требований, среди которых комплиментарность поверхности по отношению к культивируемым клеткам, гидрофобно-гидрофильный баланс, адгезивные характеристики и т.п. В связи с этим актуальным направлением медицинского материаловедения является поиск перспективных биоматериалов и модификация поверхностных свойств изделий из них [1].

Одним из наиболее перспективных биоматериалов для медицины являются полигидроксиалканоаты (ПГА) – микробиологически синтезируемые полимеры, которые подвергаются полному биоразложению в естественной среде без образования токсичных отходов [2]. Эти биополимеры биосовместимы, однако вследствие высокой кристалличности обладают высокой гидрофобностью, что затрудняет прикрепление и пролиферацию эукариотических клеток.

Для преодоления таких ограничений применяют биологические, химические и физические методы. Новым и перспективным направлением является лазерная обработка поверхности с применением различных типов лазеров и режимов работы. Эта техника позволяет модифицировать химию поверхности, формировать микро- и наноразмерные трёхмерные структуры, а также изменять механику поверхности.

Впервые исследовано влияние обработки поверхности пленок, полученных из 4-х типов ПГА: поли-3-гидроксибутирата и его сополимеров с включением мономеров 3-гидроксивалерата, 4-гидроксибутирата и 3-гидроксигексаноата с близким содержанием последних (порядка 30 мол.%) в двух режимах обработки CO<sub>2</sub> лазером – в постоянном и квазиимпульсном (периодическом).

При постоянном облучении векторными линиями при мощности 3 Вт на поверхности пленок формировались оплавленные области в виде бороздок, в которых у большинства образцов были повышенные значения краевого угла смачивания и снижение шероховатости. Квазиимпульсный режим растровым методом при мощности 13,5 Вт сопровождался образованием лунок без выраженных оплавленных зон с пониженной величиной краевого угла и повышением шероховатости у большинства образцов.

В культуре фибробластов мыши NIH 3T3 в МТТ-тесте исследована биосовместимость поверхности пленок и выявлено противоположное действие режимов облучения на развитие фибробластов. Количество жизнеспособных клеток на образцах при постоянном режиме обработки сопровождалось снижением по сравнению к исходным пленкам, от 13.0 до 27.2%, однако при квазиимпульсном режиме, значительно выросло; от 1.26 до 1.76 раз и от 1.66 до 1.83 раза, по сравнению к исходным и обработанным постоянным излучением, соответственно. Этот важный результат открывает возможность направленного влияния на адгезионные свойства полимерных изделий по отношению к клеточным культурам. Например, ограничение развития микробного обрастания при изготовлении упаковки пищевых продуктов и, наоборот, стимулирование развития эукариотических культур при конструировании скаффолдов в клеточных технологиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-43-240012. Благодарность научному руководителю Воловой Т.Г. за концептуализацию и анализ результатов.

### Литература:

- [1] Geyer, R.; Jambeck, J.R.; Law, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. Geyer, Jambeck. LawSci. Adv. 2017, 3,170-782.
- [2] Volova, T.G.; Shishatskaya, E.I.; Sinsky, A.J. Degradable polymers: Production, properties, applications. Nova Science Pub Inc., NY, USA, 2013, 380 p.



**Происхождение аномальной активности  $^{137}\text{Cs}$  в слоях донных отложений р. Енисей.**

*Вахрушев Вадим Игоревич*

*Сибирский федеральный университет*

*Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН*

Пойма реки Енисей загрязнена техногенными радионуклидами в результате деятельности Горно-химического комбината (ГХК) Росатома и глобальных выпадений [1]. В начальный период радиоактивных сбросов ГХК с 1958 по 1965 год сформировался относительно низкий уровень радиоактивного загрязнения  $^{137}\text{Cs}$  поймы р. Енисей. Экстремальный паводок 1966 года на р. Енисей, сопровождающийся расходом воды до  $18000 \text{ м}^3/\text{с}$  [2] через плотину Красноярской ГЭС, привёл к затоплению береговой промзоны ГХК и выносу из неё взвешенных частиц с радионуклидами на большие расстояния. Вследствие этого образовались слои донных отложений (ДО) и пойменных почв с аномальным содержанием  $^{137}\text{Cs}$  по течению реки от ГХК [1].

Цель работы – определение происхождения аномального содержания  $^{137}\text{Cs}$  в слоях ДО р. Енисей, отобранных на разном расстоянии по течению реки от сбросов ГХК.

В изученных нами кернах ДО поймы р. Енисей, отобранных в период 2009 – 2018 гг. на расстоянии до 330 км по течению реки от ГХК, были обнаружены слои аномального (до 26000 Бк/кг) содержания  $^{137}\text{Cs}$  (табл. 1). Ранее у береговой зоны вблизи г. Енисейска также были обнаружены аномальные слои [1] с удельной активностью  $^{137}\text{Cs}$  до 19900 Бк/кг. Авторы [1] на основании отношения изотопов цезия ( $^{137}\text{Cs}/^{134}\text{Cs}$ ) показали, что эти слои в пойме района г. Енисейска образовались в результате переноса ДО из зоны ГХК во время экстремального паводка 1966 года. Обнаруженные нами активности  $^{137}\text{Cs}$  в слоях ДО других районов р. Енисей (табл. 1) сопоставимы или превышают максимальные значения  $^{137}\text{Cs}$  для радиоактивной аномалии береговой зоны г. Енисейска. Рассчитанные нами изотопные отношения  $^{137}\text{Cs}/^{152}\text{Eu}$  и  $^{137}\text{Cs}/^{60}\text{Co}$  в слоях ДО соответствуют отношениям этих радионуклидов в работе [1], также в изученных нами аномальных слоях отсутствуют техногенные радионуклиды с коротким периодом полураспада. Проведённая датировка слоёв кернов из районов вблизи сбросов ГХК (Балчуг) с использованием метода отношения радионуклидов  $^{137}\text{Cs}/^{60}\text{Co}$  подтвердила образование аномальных слоёв в 1966 году. Всё это позволяет отнести обнаруженные нами аномальные слои ДО к паводку 1966 г.

*Таблица 1. Диапазоны удельной активности  $^{137}\text{Cs}$  (Бк/кг) и отношения техногенных радионуклидов в аномальных слоях кернов ДО и пойменных почв реки Енисей*

Район, годы отбора	$^{137}\text{Cs}$ , Бк/кг	$^{137}\text{Cs} / ^{152}\text{Eu}$	$^{137}\text{Cs} / ^{60}\text{Co}$
Енисейск, 1997 [1]	3500 ÷19900	290÷810	7000÷48000
Балчуг, 2009-2018	1000÷2600 0	150÷2090	2000÷16000
Стрелка, 2012	1100÷3100	160÷240	1500÷2000

При новых экстремальных паводках возможен перенос радиоактивных ДО и вынос их с глубины на поверхность. Поэтому выявление участков аномального радиоактивного загрязнения поймы реки Енисей позволит оценить масштаб перераспределения радиоактивных ДО по течению реки.

Автор выражает благодарность соавтору работы Дементьеву Д.В.

**Литература:**

- [1] Сухоруков Ф.В. и др. «Закономерности распределения и миграции радионуклидов в долине реки Енисей». Новосибирск, 2004. 287 с.  
 [2] Бабкин В.И. «О регулировании речного стока в XXI веке». Москва, 2018. 215 с.

## **Дизайн биосенсора на основе биферментной системы светящихся бактерий для анализа загрязнения сложных по составу сред**

Калябина Валерия Павловна

*Сибирский федеральный университет*

Сложные по составу среды, к которым относятся почва и плодоовощная продукция, способны в значительной степени аккумулировать потенциально токсичные вещества [1], становясь источником для дальнейшего загрязнения. Современные биосенсоры, основанные на ингибировании ферментов, применяются для обнаружения загрязнителей и токсичных соединений в различных средах [2]. При тестировании сложных по составу сред существует ряд трудностей, в том числе для точной интерпретации результатов необходимо учитывать свойства и эффекты природных компонентов незагрязненных образцов. Билюминесцентные методы анализа на основе ферментативных систем могут быть использованы при создании интегрального метода анализа сложных сред, загрязненных смесью токсических веществ [3]. Целью исследования являлась разработка схемы конструирования новых ферментативных сенсоров для оценки безопасности сложных по составу сред. Предложенная схема была апробирована при создании билюминесцентного ферментативного сенсора на основе биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+ люцифераза (P+Л).

На первом этапе конструирования ферментативного сенсора была установлена чувствительность ферментов к ряду тяжелых металлов и пестицидов на уровне их предельно допустимого содержания в пище. На следующем этапе оценивали влияние образцов плодоовощной продукции на активность биферментной системы P+Л в отсутствие загрязняющих веществ. При необходимости модифицировали процедуру пробоподготовки, чтобы уменьшить влияние контрольных (незагрязненных) сложных сред на ферменты. На третьем этапе были проведены модельные эксперименты по оценке чувствительности биферментной системы P+Л к смеси супернатантов образцов плодоовощной продукции и исследуемых токсикантов. Для создания билюминесцентного сенсора на четвертом этапе был разработан элемент биораспознавания, состоящий из ферментов P+Л и их субстратов – NADH и алифатического альдегида, совместно иммобилизованных в крахмальном геле. Для обеспечения высокой чувствительности распознающего элемента варьировали соотношение его компонентов и условия их иммобилизации в микрофлюидных чипах. В качестве завершающего шага разработки необходимо подобрать подходящий датчик, обеспечивающий детектирование сигнала биосенсора.

Предложенные принципы конструирования билюминесцентного ферментативного теста могут быть применены для разработки других ферментативных биосенсоров для интегральной экспрессной оценки безопасности сложных сред.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках проекта №. 20-44-242001.

### Литература:

- [1] Silva V., Mol H. G. J., Zomer P., et al., *Sci. Tot. Environ.*, V. 653, PP. 1532-1545 (2019).
- [2] Amine A., Arduini F., Moscone D., Palleschi G., *Biosens. Bioelectron.*, V. 76, PP. 180–194 (2016).
- [3] Kalyabina V. P., Esimbekova E. N., Torgashina I. G., et al., *Dokl. Biochem. Biophys.*, V. 485, N 1., PP. 107-110 (2019).

## **Выделение и изучение некоторых свойств экстраклеточной оксидазы из высшего гриба *Neonothopanus nambi***

Посохина Екатерина Дмитриевна

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

Базидиальные грибы обладают значительным биотехнологическим потенциалом для получения широкого спектра ценных целевых продуктов, востребованных в медицине, биологии, фармакологии, пищевой и химической промышленности. Для ученых большой интерес представляют экстраклеточные оксидазы базидиомицетов (в частности, гем- и ФАД-содержащие), благодаря возможности их использования в аналитических приложениях. При этом исследователи ведут активный поиск для выявления среди базидиомицетов новых перспективных продуцентов известных оксидаз и обнаружения ферментов с новыми свойствами.

Цель данной работы состояла в выделении экстраклеточного фермента с оксидазной функцией из мицелия светоизлучающего гриба *Neonothopanus nambi* и изучении некоторых его свойств.

В работе использовали культуру базидиального гриба *N. nambi* IBSO 3293 из Коллекции микроорганизмов (ССIBSO 836) ИБФ СО РАН, ФИЦ «КНЦ СО РАН» (Красноярск). Биомассу получали методом глубинного культивирования мицелия в картофельно-сахарозной среде в течение 7-9 дней по разработанной ранее технологии [1].

Выделение экстраклеточных белков осуществляли инкубацией биомассы мицелия в растворе  $\beta$ -глюкозидазы при ее концентрации 0,5 МЕ/мл. Полученный водный экстракт, содержащий экстраклеточные белки, диализовали ультрафильтрацией через мембрану с пределом исключения 30 кДа для концентрирования белковых компонентов и удаления низкомолекулярных соединений. Белковый концентрат разделяли гель-фильтрационной хроматографией на колонке (1,6 x 33 см) с неподвижной фазой Sephadex G-200, уравновешенной раствором 50 мМ NaCl, используемым как элюент. Хроматографические фракции, содержащие наибольшую активность изучаемого фермента, объединяли и концентрировали. Для оценки нативной молекулярной массы выделенного фермента при указанных выше условиях проводили хроматографию маркерных белков – БСА и цитохрома С. Белковый состав финального препарата и молекулярную массу выделенного фермента в денатурирующих условиях оценивали с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Количественную оценку белка в образцах проводили с помощью микробиуретового метода. Активность изучаемого фермента в хроматографических фракциях и финальном препарате оценивали реакцией соокисления фенола с 4-аминоантипирином (4-ААП).

Установлено, что фермент, выделенный из гриба *N. nambi* с помощью описанной выше технологии, имеет высокую степень чистоты и является мономерным белком с молекулярной массой около 60 кДа. Выявлено, что фермент является ФАД-содержащим и катализирует соокисление фенола с 4-ААП без добавления  $H_2O_2$ , что отличает его от известных пероксидаз. Это позволило высказать предположение, что данный фермент является оксидазой со смешанной функцией. Кинетические параметры полученной оксидазы  $K_m$  и  $V_{max}$  для фенола составляют 0,21 мМ и 0,40 мкМ·мин<sup>-1</sup>. Фермент проявляет наибольшую каталитическую активность в температурном диапазоне 55–70 °С и при pH 5.

Мы предполагаем, что выделенная из базидиомицета *N. nambi* оксидаза может быть полезным ферментом для применения в аналитике, в частности, для колориметрического обнаружения фенола в водной среде без использования  $H_2O_2$ .

Автор выражает благодарность соавторам работы Н.О. Ронжину, О.А. Могильной, В.С. Бондарю

Литература:

[1] Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Bondar V.S., Asian Journal of Mycology, V.3, PP. 408–418 (2020).

## **Гуминовые вещества как природные радиопротекторы на примере радионуклида трития и морских бактерий**

Колесник Ольга Владиславовна

*Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН*

Низкодозовые биологические эффекты в настоящее время представляют особый интерес в связи с расширением районов с радиоактивными загрязнениями. Продукты радиоактивного распада могут воздействовать на сопряженные химические и биологические процессы в природных экосистемах, что может сопровождаться изменением баланса экосистемы в целом. Гуминовые вещества (ГВ) – продукты естественной трансформации органики в почве, водных отложениях, основной компонент плодородного слоя почв, полимерные полифункциональные соединений нерегулярного строения. Изучение воздействий низкоинтенсивного радиационного излучения в присутствии ГВ формирует основу для прогнозирования реакции живых организмов на больших территориях, зараженных низкоинтенсивным излучением после аварий, сбросов атомных станций или подземной разработки природных ресурсов.

Морские люминесцентные бактерии являются оптимальным биотестовым объектом для изучения низкодозового воздействия на водные микроорганизмы. Физиологическая активность бактерий оценивается по интенсивности их биолюминесценции. Люминесцентные бактериальные биотесты дают количественную меру токсичности и часто превосходят другие биотесты по быстродействию, точности, чувствительности и простоте.

Известно, что метаболическая активность бактерий связана с продукцией ими активных форм кислорода (АФК). Различные воздействия на бактериальную культуру, включая низкодозовую радиацию, способны изменять производство АФК.

Образцы бактериальной суспензии готовили из лиофилизированных препаратов бактерий по стандартной методике; для имитации морской среды и балансировки осмотических процессов использовали 3% раствор NaCl.

В качестве источника трития использовали тритиевую воду (НТО). НТО добавляли к растворам 3% NaCl и смешивали с бактериальными суспензиями до конечных удельных радиоактивностей: 2, 50 и 200 МБк/л.

В качестве источника гуминовых веществ использовали препарат Гумат-80, («Гумат», Иркутск, Россия), полученный методом безэкстракционной обработки угля. Выбранная концентрация ГВ составляла  $10^{-3}$  г/л.

Измерения интенсивности биолюминесценции и хемилюминесценции проводили с помощью планшетного люминометра Luminoskan Ascent (Thermal Fisher Corp.).

Биолюминесцентный отклик морских бактерий на воздействия трития соответствовал модели «гормезиса»: он включал стадии ингибирования и активации биолюминесценции, а также отсутствие эффекта. Показано, что присутствие ГВ в растворе снижает ингибирующие и активирующие эффекты трития. Выявлены корреляции между интенсивностью биолюминесцентного свечения и содержанием АФК в бактериальной суспензии в присутствии трития.

Результаты демонстрируют важную роль гуминовых веществ в природных процессах в регионах с низким уровнем радиоактивного загрязнения: ГВ могут смягчать радиотоксические эффекты, влияющие на микроорганизмы, выполняя радиопротекторную функцию.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-44-240004. Авторы выражают благодарность за руководство и участие в работе Кудряшевой Н.С., Рожко Т.В. и Бадуну Г.А.

## **Анализ доступности активного центра бактериальной люциферазы для молекул осмолитов методами молекулярной динамики**

Суковатый Лев Алексеевич

Сибирский федеральный университет

Условия протекания биохимических реакций в буфере отличны от окружения ферментов внутри клетки. Для приближения условий *in vitro* к *in vivo* используют, в том числе, осмолиты – низкомолекулярные соединения, которые синтезируются и накапливаются клетками для защиты от неблагоприятных внешних факторов (температура, давление, рН и др.). Известно, что присутствие ряда осмолитов повышает стабильность структуры белков и способствует сохранению их биологической активности. В настоящее время эффект осмолитов на биохимические процессы еще не до конца изучен. Так, некоторые из них могут проникать в активный центр фермента, что может напрямую влиять на эффективность катализа [1]. В данной работе исследованы механизмы действия полиолов и сахаридов на структуру и функцию бактериальной люциферазы, катализирующей в микроорганизмах биoluminesцентную реакцию.

Целью работы являлось определить доступность активного центра бактериальной люциферазы для осмолитов разного размера и химической природы с помощью методов молекулярной динамики (МД).

Для подготовки молекулярных систем, релаксации и вычисления МД использовали программный пакет GROMACS 5.1.4 и силовое поле CHARMM36. Каждая из систем представляла собой трехмерную структуру бактериальной люциферазы *V. harveyi* (PDB ID: 3FGC) в окружении молекул воды и 10, 20, 30, 40 вес.% водных растворов глицерина и сахарозы. Время расчетов динамики белка в каждом окружении составляло 40 нс.

Анализ плотности пространственного распределения молекул осмолитов вблизи поверхности люциферазы показал, что молекулы глицерина могут проникать в активный центр фермента и при высоких концентрациях (30, 40 вес. %) присутствуют там на протяжении всего времени МД, в отличие от молекул сахарозы, которые остаются у входа в сайт связывания флавина при любых концентрациях. Было сделано предположение, что наблюдаемый эффект объясняется различием в размере молекул и для проверки выполнено вычисление пространственного распределения других осмолитов: сорбитола, который примерно в 2 раза больше глицерина, и глюкозы, которая примерно в 2 раза меньше сахарозы. Была рассчитана функция парного распределения молекул осмолитов относительно аминокислотного остатка  $\alpha\text{Glu43}$ , расположенного на дне каталитической области активного центра люциферазы. Для 40%-й концентрации осмолитов установлено, что их проникновение в активный центр характеризуется следующим минимальным расстоянием до  $\alpha\text{Glu43}$ : глицерин – 1,6 Å, глюкоза – 5,5 Å, сорбитол – 6,7 Å и сахароза – 9,3 Å, что коррелирует с размерами молекул (эффективными гидродинамическими радиусами). Экспериментальное исследование показало, что глицерин и глюкоза ингибируют активность люциферазы, в то время как сорбитол и сахароза – нет, что говорит о наличии дополнительного механизма влияния осмолитов на каталитическую функцию фермента, помимо воздействия на аминокислотные остатки активного центра.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90118

### Литература:

[1] Petrović D. et al. Shuffling active site substate populations affects catalytic activity: the case of glucose oxidase //ACS catalysis. – 2017. – Т. 7. – №. 9. – С. 6188-6197.

## Выявление онкомаркера MIA билюминесцентным микроанализом

Башмакова Евгения Евгеньевна

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

Белок с меланома-ингибирующей активностью MIA (Melanoma Inhibitory Activity protein) ассоциирован с прогрессированием меланомы и выступает в роли раннего индикатора терапевтического ответа для оценки эффективности новых меланома-ингибирующих препаратов. Высокие требования к чувствительности анализа по выявлению MIA обусловлены низким пороговым значением данного белка в сыворотке (6.5 – 9.4 нг/мл). В качестве репортерных молекул для высокочувствительной детекции мишени особо интересны светоизлучающие (билюминесцентные) белки – люциферазы и фотопротейны. В частности, метки на основе  $Ca^{2+}$ -регулируемого фотопротейна обелина обеспечивают чувствительность анализа, сравнимую с радиоизотопной меткой. Для выявления онкомаркера MIA разработан дизайн твердофазного билюминесцентного иммуноанализа конкурентного типа. Для этого сконструирован, получен и охарактеризован гибридный белок MIA- $Ca^{2+}$ -регулируемый фотопротейн обелин как конкурирующий элемент аналитической системы. В модельных экспериментах по выявлению онкомаркера предложенным способом показана зависимость билюминесцентного сигнала от концентрации MIA в диапазоне от 9 до 2304 нг/мл (Рис.1). Полученные результаты определяют целесообразность поиска оптимальных условий анализа для повышения чувствительности, а также последующую адаптацию предложенного способа для клинического применения.

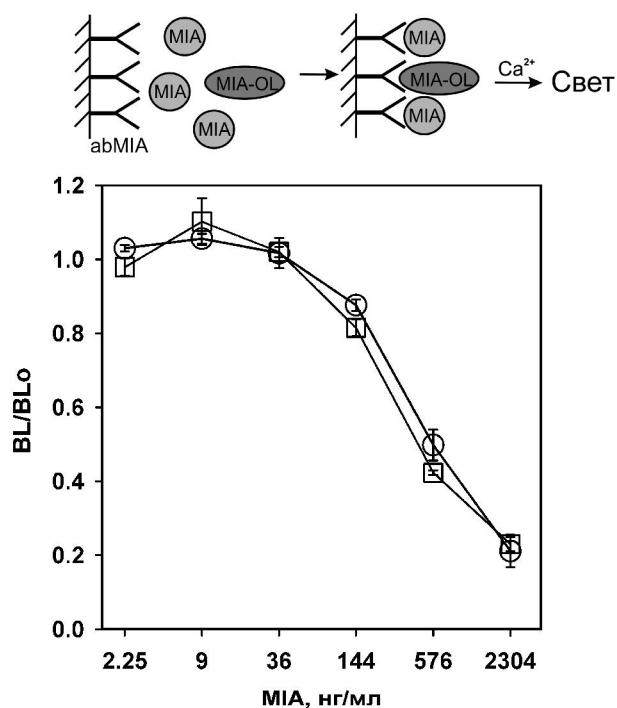


Рис. 1. Результаты билюминесцентного конкурентного анализа MIA в модельных сыворотках. Каждая точка – среднее от трех независимых измерений, BL/BL0 – отношение билюминесцентного сигнала от данного образца к сигналу от образца, не содержащего MIA. (-○-) – образцы MIA в буфере, (-□-) – в сыворотке крови, abMIA-антитела к MIA, MIA-OL- гибридный белок MIA- $Ca^{2+}$ -регулируемый фотопротейн обелин.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ для молодых ученых - кандидатов наук МК-772.2020.4 Автор выражает благодарность соавторам работы Кудрявцеву А.Н. и д.б.н. Франк Л.А.

## **Функциональная оценка полигидроксиалканоатов для применения в качестве компонента биоактивных сосудистых имплантатов**

Рыльцева Галина Александровна

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

Актуальным направлением исследований во всем мире является изучение нанотопографии имплантируемых медицинских изделий. Экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют об успешном эксплуатировании подхода, включающего анализ особенностей механо-химического сигналинга и направленной модификации нано-топографии для использования биоматериалов в реконструктивной биоинженерии различных органов и тканей. Для применения в кардиохирургии и рентгенхирургии актуальна разработка биоактивных сосудистых имплантатов, в том числе для сосудов малого и среднего диаметра, графтов и стентов, в условиях атеросклероза.

Неудачи сосудистых имплантатов обычно вызваны отсутствием адекватного формирования нео-эндотелия, что приводит к формированию в стент-графте тромбов и гиперплазии неоинтимы. Перспективным подходом к преодолению этих проблем является направленное создание функционального монослоя эндотелиальных клеток на поверхности имплантатов и экспериментальных образцов бионаноматериалов [1].

Первые данные о молекулярно-клеточных механизмах взаимодействия биополимерных материалов на основе полигидроксиалканоатов, ПГА, с другими функциональными клетками сердечно-сосудистой системы получены по отношению к моноцитам/макрофагам [2].

В исследовании анализировали механизмы взаимодействий эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) с подложками из поли3-гидроксибутирата (ПЗГБ), его сополимера с 3-гидроксивалератом [П(ЗГБ/ЗГВ), 85.0/15.0], а также с 4-гидроксибутиратом [П(ЗГБ/4ГБ) 92.0/8.0], и трехкомпонентный образец с 3-гидроксигексаноатом [П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) 66.4/23.4/10.2] в сравнении с Pellethane 2363-80A, известный как полиуретан, используемый в качестве одного из основных полимеров сосудистых имплантатов.

HUVES, выделенные из пупочной вены человека здоровых доноров, были получены из биобанка Института регенеративной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, идентификатор коллекции: MSU\_HUVES. Клетки культивировали на покрытом желатином пластике в среде для роста эндотелия (EGM-2, Lonza) и использовали для экспериментов на 2–3 пассажах.

Оценку биологической активности образцов производили с помощью теста AlamarBlue в культуре HUVES *in vitro*. Установлены пределы нормального функционирования HUVES для бионанополимерных материалов разных типов. Показано отсутствие негативного влияния материалов группы ПГА на физиологическое состояние клеток и увеличение жизнеспособности на 30% при сравнении с Pellethane 2363-80A. Наилучшие показатели установлены для образца П(ЗГБ/4ГБ). Контакт с полимерными пленками всех типов ПГА не приводил к ухудшению биологических свойств клеток

### Литература:

- [1] Franco D., et all. Accelerated endothelial wound healing on microstructured substrates under flow. *Biomaterials*, (2012).
- [2] Shishatskaya E.I., et all. The effect of the chemical composition and structure of polymer films made from resorbable polyhydroxyalkanoates on blood cell response. *International Journal of Biological Macromolecules*, (2019)

## **Высокоактивные делеционные мутанты люциферазы *Metridia longa*: получение и характеристика репортерных свойств**

Коротов Игорь Александрович

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

Биолюминесцентные репортеры нашли широкое применение в медицинских и биологических исследованиях благодаря высокой чувствительности, нетоксичности для объекта исследований и возможности наблюдать сигнал в реальном времени. Люциферазы – это общее наименование ферментов, катализирующие окисление субстрата кислородом воздуха с образованием квантов света. Несмотря на общую функцию, биолюминесцентные белки различных таксонов совершенно различны по структуре, свойствам и механизмам действия вследствие эволюционно независимого возникновения биолюминесцентной функции в различных таксонах. На сегодняшний день клонировано около десятка типов биолюминесцентных белков и все они опробованы в качестве репортеров. Но поиск новых и улучшение репортерных свойств существующих люцифераз постоянно продолжается в попытках расширить области применения и получить спектр репортеров с различными характеристиками, подходящих для решения конкретных задач.

Целентерезин-зависимая люцифераза из морских copepod *Metridia longa* катализирует простую реакцию окисления субстрата с излучением света без дополнительных кофакторов. Обладая небольшим размером, высокой яркостью и термостабильностью люцифераза *Metridia* была успешно использована как репортерный белок *in vitro* и *in vivo* [1]. Одна из изоформ люциферазы *Metridia*, MLuc7 размером всего 168 аминокислотных остатков (16.5 кДа) имеет наименьшие размеры среди природных люцифераз, что позволяет минимизировать метаболическую нагрузку на клетку-хозяина в исследованиях *in vivo*, уменьшить стерические и функциональные интерференции в случае использования репортера в составе фьюжин-белков.

Целью нашей работы было исследование возможности дальнейшего уменьшения размеров люциферазы MLuc7 как для исследования структуры каталитического домена, так и для получения полностью функционального биолюминесцентного репортерного белка с минимально возможными размерами. Для этого была получена серия делеционных мутантов MLuc7 люциферазы укороченных с N- и C-конца путём создания рекомбинантных плазмид с последующей трансформацией в клетки *E. coli*. Предварительная характеристика делеционных мутантов была выполнена при измерении активности грубых лизатов бактериальных клеток. Варианты ML7-G28 (укорочен на 28 аминокислот с N-конца) и ML7-28G4C (укорочен на 28 аминокислот с N-конца и 4 аминокислоты с C-конца) были отобраны как наиболее перспективные для практического применения, так как сохраняют высокую биолюминесцентную активность и термостабильность. Процедуры рефолдинга и очистки из клеток *E. coli* рекомбинантных укороченных люцифераз были оптимизированы для получения высокочистых препаратов, которые далее были использованы для характеристики их люминесцентных свойств. Показано, что делеционные мутанты ML7-G28, укороченный на 28 аминокислот, и ML7-28G4C, укороченный на 32 аминокислоты, могут оказаться перспективными биолюминесцентными репортерами, одними из наименьших на сегодняшний момент.

### Литература:

- [1] Markova S.V., Larionova M.D., Vysotski E.S. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: current knowledge and applications. *Photochem Photobiol*, 2019, May; 95(3):705-721.



**Стабильные многокомпонентные иммобилизованные препараты на основе бутирилхолинэстеразы для ингибиторного анализа***Лоншакова-Мукина Виктория Ивановна**Сибирский федеральный университет*

Бутирилхолинэстераза (BChE) фермент из группы эстераз, типа гидролаз, активно применяется в ингибиторном анализе поскольку позволяет на широком круге материалов изучить вопросы субстрат-ингибиторной специфичности, а также влияние иммобилизации и условий измерения на аналитические характеристики ферментативных биосенсоров, применяемых для контроля остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в различных средах. Для решения проблемы недостаточной стабильности BChE при её использовании и хранении используют различные методы иммобилизации. Целью работы является получение стабильных ферментных препаратов для ингибиторного анализа путем совместной иммобилизации компонентов ферментативных реакций в гели природных полимеров крахмала и желатина.

Активность BChE определяли по методу Элмана. По изменению оптической плотности во времени вычисляли скорость гидролиза субстрата BChE – S-бутирилтиохолина йодистого (S-BChI), по полученным результатам делали вывод об активности фермента. Определение оптической плотности образцов проводили на спектрофотометре UV-2700 (Shimadzu, Япония) на длине волны 412 нм

Установлено что, иммобилизация BChE совместно с индикатором на тиоловую группу в крахмальном или желатиновом геле обеспечивает выход активности фермента не менее 62% по сравнению с растворимой BChE (Рис.1).

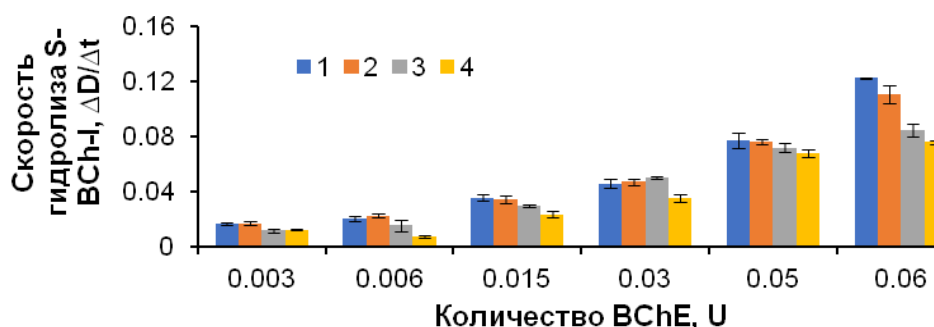


Рис. 1. – Зависимость скорости гидролиза S-BCh-I от количества BChE; 1 – растворимая BChE, 2 – BChE, иммобилизованная в крахмальном геле, 3 – BChE, иммобилизованная в крахмальном геле совместно с индикатором, 4 – BChE, иммобилизованная в желатиновом геле совместно с индикатором

Оптимизирован состав иммобилизованного препарата и условия иммобилизации, обеспечивающие высокую активность и стабильность препаратов при хранении и использовании в сочетании с чувствительностью к воздействию токсикантов и хорошей воспроизводимостью результатов. Показано, что препарат, на основе BChE, иммобилизованной совместно с индикатором на тиоловую группу в крахмальном и желатиновом гели, сохраняет активность более 300 суток. Большую чувствительность к действию веществ антихолинэстеразного действия имеют ферментные препараты на основе крахмального геля. Для малатиона полученное значение IC50 составляет 8 мкг/л.

Разработана методика для определения веществ антихолинэстеразного действия в различных образцах с использованием многокомпонентного препарата на основе бутирилхолинэстеразы, иммобилизованный совместно с индикатором тиоловых групп в крахмальном геле.

## Рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 и синтез полигидроксиалканоатов на различных растительных маслах

Сапожникова Кристина Юрьевна

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры гидроксипроизводных жирных кислот, синтезируемые микроорганизмами, представляют собой конкурентоспособную альтернативу синтетическим пластикам, но их производство - дорогостоящий процесс [1]. Одним из способов снижения стоимости ПГА является использование недорогих источников углерода, таких как растительные масла [2].

В качестве источников углерода использовали подсолнечное, рыжиковое и пальмовое масло. Культивирование бактерий в течение 72 ч на пальмовом масле привело к наибольшей сухой массе клеток (6,2 г/л) и содержанию внутриклеточного полимера (63%). Наименьшие значения были получены в эксперименте с подсолнечным маслом: 3,9 г/л биомассы, содержащей 29 % внутриклеточного полимера. В процессе роста бактерий показано избирательное и неравномерное потребление жирных кислот в составе масел.

Для увеличения доступности субстрата два типа эмульгаторов были протестированы – Твин-80 и кокоил глутамат натрия. Выходы биомассы и полимера для пальмового и растительного масел увеличились до 8-8.2 г/л и 5,2–5,4 г/л, а содержание полимера достигло 79-83% и 50-55% соответственно, в случае с рыжиковым маслом показатели практически не изменились (рис. 1).

Показано, что на растительных маслах бактерии синтезируют трехкомпонентный сополимер, состоящий из 3-гидроксibuтирата (97-99 мол.%), 3-гидроксивалерата (0.9–1.9 мол.%) и 3-гидроксигексаноата (0.4–1.3 мол.%). Исследованы молекулярно-массовые характеристики и температурные свойства синтезированного полимера.

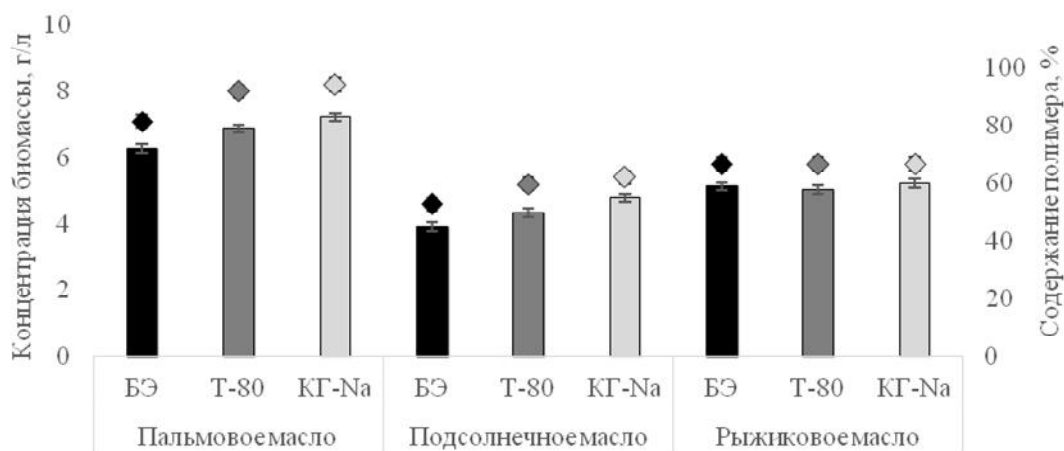


Рис. 1. Выходы бактериальной биомассы и ПГА при росте в течение 72 часов бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 на различных маслах с добавлением эмульгаторов. ◆ - концентрация биомассы бактерий, ■ - содержание полимера; БЭ – без обработки эмульгаторами, Т-80 – Твин-80, КГ-Na – кокоил глутамат натрия

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» (Соглашение № 074-02-2018-328). Автор выражает благодарность соавторам работы.

### Литература:

- [1] Koller M., Maršálek L., de Sousa Dias M. M. et al., *New biotechnology*, V.37, PP 24-38 (2017).  
 [2] Fukui T., Doi Y., *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.49, PP 333-336 (1998).

## **Влияние диффузии на кинетику реакции, катализируемой бактериальной люциферазой**

Лисица Альберт Евгеньевич

Сибирский федеральный университет

Изучение особенностей работы ферментов в условиях, приближенных к внутриклеточным, является важной задачей на пути к пониманию функционирования живых клеток как устойчивых саморегулирующихся систем. Одним из следствий неоднородности микроокружения ферментов в клетке является замедление диффузии компонентов реакции, что, с одной стороны, воздействует на скорость биохимических реакций, а с другой стороны, в некоторых случаях имеет важное функциональное значение. В данной работе было исследовано влияние замедленной диффузии на кинетику реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в вязких средах с различными концентрациями глицерина и сахарозы.

В работе использовали рекомбинантную люциферазу бактерий *P. leiognathi*, полученную в Институте биофизики СО РАН (Красноярск). Кинетику биолюминесцентной реакции в нестационарном режиме регистрировали методом остановленного потока на анализаторе SX-20 (Applied Photophysics). Константы скоростей отдельных стадий реакции определили при помощи математической модели, разработанной в программном пакете SciLab в лаборатории теоретической биофизики Института биофизики СО РАН (Красноярск). Молекулярно-динамические расчеты структуры люциферазы в воде и в окружении глицерина и сахарозы были проведены с помощью программного пакета GROMACS 5.1.4.

Были получены кинетические кривые биолюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в присутствии 10-40 вес.% глицерина и сахарозы. Установлено, что помимо замедления кинетики вследствие вязкости среды, играет роль природа косольвента: глицерин снижает квантовый выход и максимум интенсивности с ростом концентрации, в то время как для сахарозы они остаются близки к контрольному уровню. При помощи математической модели было проанализировано изменение скоростей отдельных стадий реакции в вязких средах. Результаты моделирования показали, что процесс связывания восстановленного флавиномононуклеотида является диффузионно-контролируемым, в то время как связывание кислорода не демонстрирует зависимости от вязкости, что может быть связано с высокой скоростью этой стадии. Разница в эффекте двух исследованных сред была обнаружена во влиянии на скорость формирования возбужденного интермедиата реакции: в присутствии сахарозы она увеличивается, в то время как в присутствии глицерина – остается такой же, как в буфере, или уменьшается.

Молекулярно-динамические расчеты позволили установить возможные механизмы влияния используемых косольвентов на биолюминесцентную реакцию. Расчеты показали, что молекулы глицерина, в отличие от сахарозы, проникают в активный центр фермента, хоть и не формируют постоянных водородных связей с аминокислотными остатками. Также интересным результатом является то, что при высоких концентрациях сахарозы происходит изменение предпочтительной конформации функционально важного остатка  $\alpha\text{Glu175}$ , что может способствовать формированию конформации активного центра, обладающей более высокой каталитической активностью.

Таким образом, установлено, что помимо замедления диффузионно-контролируемых стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, наблюдается специфический эффект сред на каталитическую константу.