

УДК 543.94, 577.151.03

## Температурная инактивация биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в желатине

А.Е. Безруких<sup>а\*</sup>,

Е.Н. Есимбекова<sup>б,а</sup>, В.А. Кратасюк<sup>а,б</sup>

<sup>а</sup> Институт фундаментальной биологии и биотехнологии,  
Сибирский федеральный университет,  
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

<sup>б</sup> Институт биофизики  
Сибирского отделения Российской академии наук,  
Россия 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50 <sup>1</sup>

Received 4.03.2011, received in revised form 11.03.2011, accepted 18.03.2011

*Исследовано влияние желатинового раствора и геля на биолюминесценцию биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза, изучены термостабильность и температурная инактивация биферментной системы в желатиновом окружении. Активность биферментной системы и кинетика её термоинактивации в желатине низкой концентрации, недостаточной для формирования геля, и в желатине высокой концентрации, способной к образованию геля, различаются. Установлено, что термоинактивация биферментной системы имеет нелинейный характер и происходит по диссоциативному механизму. Гелевая матрица желатина оказывает на ферменты стабилизирующее действие. Помещение ферментов в вязкую среду, созданную гелевым окружением желатина, не влияет на скорость ферментативных реакций.*

*Ключевые слова: бактериальная люцифераза, NADH:FMN-оксидоредуктаза, биолюминесценция, термоинактивация ферментов, стабилизация ферментов, желатин.*

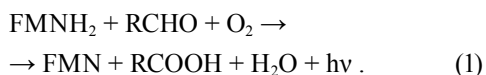
### Введение

Биферментная система светящихся бактерий, применяемая *in vitro*, состоит из двух ферментов: люциферазы и NADH:FMN-оксидоредуктазы. Люцифераза катализирует

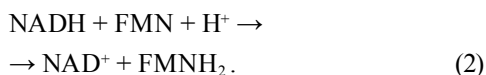
реакцию окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов при участии восстановленного флавиномононуклеотида, одним из продуктов реакции является излучение света в сине-зеленой области спектра:

\* Corresponding author E-mail address: aebezrukih@gmail.com

<sup>1</sup> © Siberian Federal University. All rights reserved



Время, требуемое для одного каталитического цикла люциферазы, намного больше, чем время жизни субстрата FMNH<sub>2</sub>, который автокаталитически окисляется кислородом менее чем за 1 с. (Гительзон и др., 1984). NADH:FMN-оксидоредуктаза катализирует реакцию



В присутствии оксидоредуктазы число оборотов люциферазы увеличивается, что позволяет наблюдать длительное свечение (Гительзон и др., 1984).

В мировой практике биферментная реакция светящихся бактерий используется, главным образом, для разработки специфических методов анализа различных метаболитов и активности ферментов (Kricka et al., 1983; Brolin et al., 1992; Roda et al., 2004), а также в качестве тест-объекта для определения интегральной токсичности различных сред (Кратасюк и др., 1987; Kudryasheva et al., 1998). Различные варианты сопряжения ферментативных реакций с бактериальной биолюминесценцией позволили создать комплекс ферментативных тестов, чувствительных к различным группам поллютантов (Kratasyuk et al., 2001; Vetrova et al., 2007). Однако применимость биферментной системы светящихся бактерий ограничивается ее химической нестабильностью и быстрой инактивацией при воздействии неблагоприятных факторов, например температуры, pH и т.п. (Петушков и др., 1982).

Одним из основных способов получения стабильных ферментов является их иммобилизация на разного рода носителях (Бере-

зин и др., 1987). Иммобилизация ферментов приводит к существенному изменению их физико-химических параметров: термостабильности, pH-оптимума, чувствительности к действию ионов солей и т.д. (Есимбекова и др., 2009). В некоторых случаях эти изменения способствуют улучшению характеристик иммобилизованных препаратов ферментов (Kratasyuk et al., 2003; Esimbekova et al., 2007; Есимбекова и др., 2009). Однако в большинстве случаев происходит существенная потеря активности ферментов в результате их инактивации при проведении процедуры иммобилизации (Березин и др., 1987). Подобрать наиболее оптимальный способ иммобилизации ферментов и, тем самым, существенно снизить потери активности ферментов при проведении иммобилизации позволяет изучение механизмов инактивации ферментов (Полтораки и др., 1986; Лундовских и др., 2000; Дементьева и др., 2000).

В настоящее время разработано более 30 различных способов иммобилизации ферментов, выделенных из светящихся организмов (Kratasyuk et al., 2003). Наиболее перспективными носителями для получения иммобилизованных препаратов ферментов светящихся организмов как основы ферментативных биосенсоров являются нейтральные полисахаридные гели и гель на основе желатина (Kratasyuk et al., 2003; Esimbekova et al., 2007; Есимбекова и др., 2009). Важным преимуществом метода включения ферментов в гель является значительная стабилизация ферментов, поскольку данные гели нейтральные, при их использовании не происходит инактивация ферментов, функциональная активность ферментов сохраняется (Есимбекова и др., 2009).

Целью данной работы было исследование влияния желатина, используемого в качестве носителя для иммобилизации ферментов, на

функционирование биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза, а также исследование термостабильности и термоинактивации биферментной системы в желатиновом окружении.

## Материалы и методы

В работе использовали лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов (комплект реактивов аналитической биолюминесценции, КРАБ), произведенные в лаборатории нанобиотехнологии и бактериальной биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Один флакон лиофилизованного препарата содержал 0,5 мг люциферазы (L) EC 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* (*P. leiognathi*) и 0,15 ед. активности NADH:FMN-оксидоредуктазы (R) EC 1.5.1.29 (*Vibrio fischeri*). Также в работе использовали отдельно лиофилизированные препараты люциферазы и NADH:FMN-оксидоредуктазы, содержащие такое же количество фермента, как и в препарате КРАБ. Во флакон с препаратом ферментов вносили 9 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера, раствор хранили на льду и использовали в течение 8 ч после приготовления.

Мы применяли следующие реактивы: NADH и FMN («Serva», Германия), тетрадеканаль («Merck», Германия), желатин («Fluka», Германия). Для приготовления растворов использовали 0,05 М калий-фосфатный буфер pH 6,8. Раствор 0,0025 %-го тетрадеканала готовили добавлением к 5 мл 0,05 М буфера 50 мкл 0,25 %-го спиртового раствора альдегида.

Желатиновый гель готовили следующим образом. Сухой порошок желатина заливали буферным раствором и оставляли набухать в течение 30 мин. Затем, тщательно помешивая, нагревали до температуры 80 °С.

Раствор тетрадеканала во время измерений выдерживали при комнатной температуре; необходимая температура растворов NADH, FMN и желатина в ходе работы поддерживалась при помощи циркуляционного термостата VT-8 (Termex, Россия).

Активность биферментной сопряженной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза измеряли в реакционной смеси следующего состава: 500 мкл раствора желатина; 5 мкл раствора КРАБа; 50 мкл 0,0025 %-го раствора тетрадеканала; 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN; 100 мкл 0,1 мМ раствора NADH.

В кювету биолюминометра вносили последовательно все компоненты реакционной смеси, быстро перемешивали, помещали кювету в биолюминометр и регистрировали величину максимальной интенсивности свечения ( $I_{\max}$ ). Все измерения проведены на биолюминометре Lumat LB 9507 («Berthold Technologies», Германия).

Активность биферментной системы изучали в присутствии желатина разных концентраций (0,5, 1, 1,5, 5 %) и без него (контроль) в диапазоне температур от 10 до 50 °С. Термоинактивацию биферментной системы изучали, инкубируя ферменты в течение 0,5-30 мин при разных температурах в интервале от 10 до 50 °С в 0,5, 1 и 5 %-м растворах желатина (прочность 180 блум) и без него (контроль), а также при T=33 °С в 1 %-х растворах желатина другой прочности (60 и 250 блум).

Скорости неферментативного окисления NADH, окисления NADH оксидоредуктазой в отсутствие люциферазы и при её добавлении (в составе препарата КРАБ), а также скорость окисления NADH препаратом люциферазы в присутствии 1 %-го раствора желатина и при его отсутствии определяли по изменению во времени оптической плотности, измеренной

на длине волны максимального поглощения NADH ( $\lambda=340$  нм). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре UVIKON 943 («Kontron Instruments», Италия). Скорость расходования NADH рассчитывали по формуле

$$V = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times \Delta t'} \quad (3)$$

где  $A$  – оптическая плотность раствора,  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции NADH при  $\lambda=340$  нм,  $t$  – время.

Для измерения в кювету спектрофотометра последовательно вносили 350 мкл раствора желатина, 10 мкл раствора фермента, 50 мкл 0,0025 %-го раствора тетрадеканала, 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN, 50 мкл 0,8 мМ раствора NADH. Растворы NADH, FMN и желатина во время эксперимента выдерживали в термостате при температуре 33 °С.

Определение каждой экспериментальной точки проводили не менее чем в 3-5 параллельных измерениях.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены зависимости интенсивности свечения биферментной системы светящихся бактерий от температуры в присутствии в реакционной смеси различных концентраций желатина. При низких концентрациях желатина (0,5 %) активность биферментной системы снижается во всем интервале исследованных температур. При увеличении концентрации желатина (1 % и более) наблюдается высокая интенсивность свечения при температуре, меньшей температуры гелеобразования  $T < T_g$ . Максимальное увеличение интенсивности наблюдается при  $T \approx T_g$  с последующим резким ее падением и уменьшением выхода активности ферментов при  $T > T_g$ . Кроме того, изменение интенсивности свечения при  $T \approx T_g$  становится более

выраженным при увеличении концентрации желатина.

Согласно литературным данным  $T_g \approx 27$  °С (Джеймс, 1980). Падение интенсивности свечения наблюдалось вблизи именно этой температуры. Таким образом, скорее всего, резкое изменение интенсивности свечения объясняется нарушением гелевой структуры желатина. Существенный рост биолюминесцентной активности в условиях гелеобразования может быть связан с неравномерным распределением ферментов в образце и наличием конгломератов белков биолюминесцентной системы и желатина вследствие значительного увеличения вязкости среды. Возможно также, что между молекулами ферментов и спиральными цепями желатина, формирующими гелевую матрицу, образуются связи, стабилизирующие ферменты и препятствующие их инактивации.

При температуре выше температуры гелеобразования тепловое движение молекул желатина, напротив, способствует инактивации ферментов. Снижение интенсивности свечения в растворе желатина низкой концентрации во всем диапазоне исследованных температур связано с тем, что концентрация желатина 0,5 % является недостаточной для образования геля.

Обнаружено, что кинетика термоинактивации бактериальной биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза как в присутствии в реакционной смеси 0,5 %-го желатина, так и в его отсутствие имеет принципиально одинаковый характер во всем диапазоне температур (рис. 2).

При температуре 30-40 °С наблюдается термоинактивация второго порядка, включающая два различных механизма инактивации биферментной системы, последовательно сменяющих друг друга и протекающих с разными скоростями.

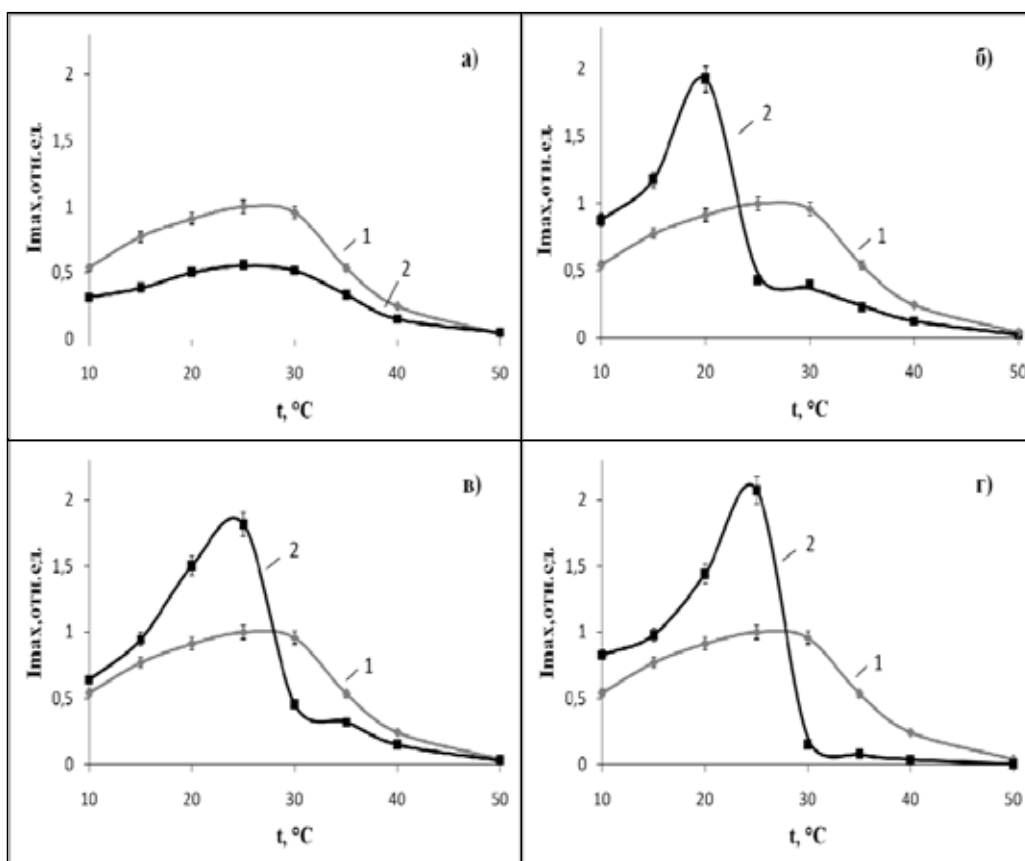


Рис. 1. Зависимость интенсивности свечения биферментной системы от температуры в присутствии растворов желатина разной концентрации (2) и без желатина (1): а – 0,5 %-й раствор желатина; б – 1 %-й раствор желатина; в – 1,5 %-й раствор желатина; г – 5 %-й раствор желатина

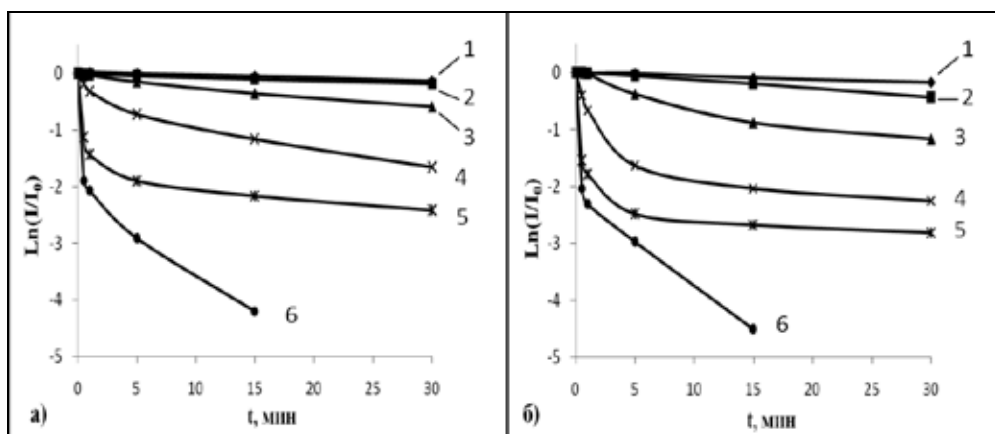


Рис. 2. Кинетические кривые термоинактивации биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза при разных значениях температуры (1 – 15 °C, 2 – 20 °C, 3 – 25 °C, 4 – 30 °C, 5 – 35 °C, 6 – 40 °C) в присутствии 0,5 %-го желатина (б) и его отсутствие (а)

Бактериальная люцифераза и NADH:FMN-оксидоредуктаза обладают четвертичной структурой и представляют собой гетеродимер и гомодимер соответственно (Fisher et al., 1996; Koike et al., 1998). Следовательно, первым преобладающим процессом, происходящим при термодеградации биферментной системы, по-видимому, является диссоциация ферментов на субъединицы. Процессу диссоциации соответствует первый «линейный» участок кинетических кривых термоинактивации. Затем после диссоциации люциферазы и (или) NADH:FMN-оксидоредуктазы на субъединицы при повышении температуры следует необратимая денатурация ферментов, которой соответствует второй «линейный» участок кинетических кривых термоинактивации биферментной системы (рис. 2).

Таким образом, термоинактивация биферментной системы светящихся бактерий происходит по диссоциативному механизму, характерному для большинства олигомерных белков. Так, например, инактивация светляковой люциферазы также включает в себя стадии диссоциации и необратимой денатурации (Полторак и др., 1986; Дементьева и др., 2000; Лундовских и др., 2000).

При температуре 15-25 °С в присутствии 0,5 %-го желатина и в его отсутствие наблюдалась медленная инактивация биферментной системы по первому порядку, связанная с процессом диссоциации ферментов на субъединицы. Денатурация при низкой температуре в исследуемом временном интервале не происходила.

Из рис. 2 видно, что первый этап термоинактивации, соответствующий диссоциации ферментов, в желатине происходит с большей скоростью, чем без него, при всех исследованных температурах. При этом наличие

желатина практически не влияет на скорость денатурации.

Изучение термоинактивации биферментной системы в 1 %-м растворе желатина показало, что кинетика термоинактивации в присутствии в реакционной смеси желатина и без него имеет одинаковый характер не во всём диапазоне температур, как в случае 0,5 % желатина, а только в том случае, когда  $T > T_g$ . При температуре 23-38 °С кинетические кривые инактивации в полулогарифмических координатах состоят из двух «линейных» участков, соответствующих процессам диссоциации и денатурации (рис. 3). При  $T > 43$  °С наблюдается быстрая инактивация первого порядка. Это объясняется тем, что кинетические режимы термоинактивации становятся экспериментально неразличимыми из-за резкого увеличения с ростом температуры скорости денатурации ферментов.

При анализе кривых инактивации, полученных для 5 %-го желатина, было выявлено, что кинетика термоинактивации в присутствии в реакционной смеси желатина и без него, так же как и для 1 %-го желатина, имеет похожий вид только при  $T > T_g$ . При  $T = 28-38$  °С наблюдается термоинактивация второго порядка, а при  $T > 43$  °С – первого порядка (рис. 4).

При температурах, меньших температуры гелеобразования желатина ( $T < T_g$ ), в присутствии 1 %-го и 5 %-го желатина происходит значительная активация биферментной системы с течением времени, в то время как в отсутствие желатина идёт медленная инактивация по первому порядку. Пример таких кинетических кривых для 1 %-го желатина приведён на рис. 5. Этот необычный результат подтверждает факт стабилизации ферментов при их помещении в гелевую матрицу желатина.

Кроме того, было замечено, что при помещении биферментной системы, выдержан-

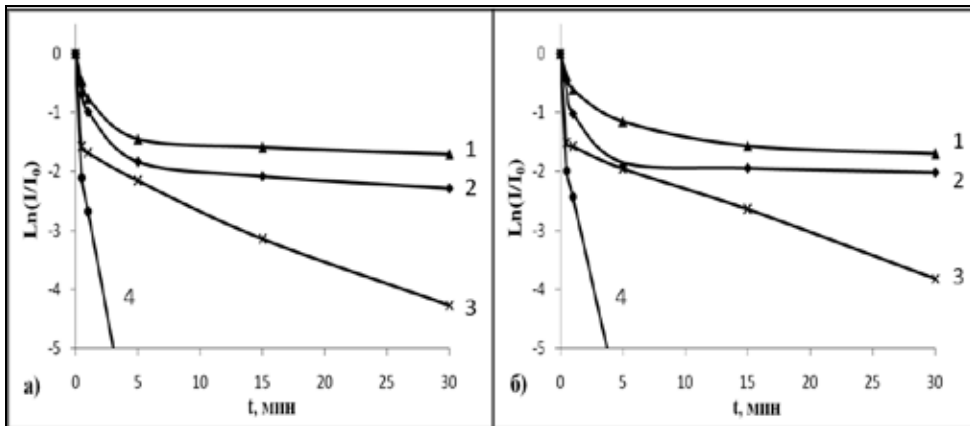


Рис. 3. Кинетические кривые термоинактивации биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза при разных значениях температуры (1 – 23 °С, 2 – 28 °С, 3 – 38 °С, 4 – 43 °С) в присутствии 1 %-го желатина (б) и в его отсутствие (а)

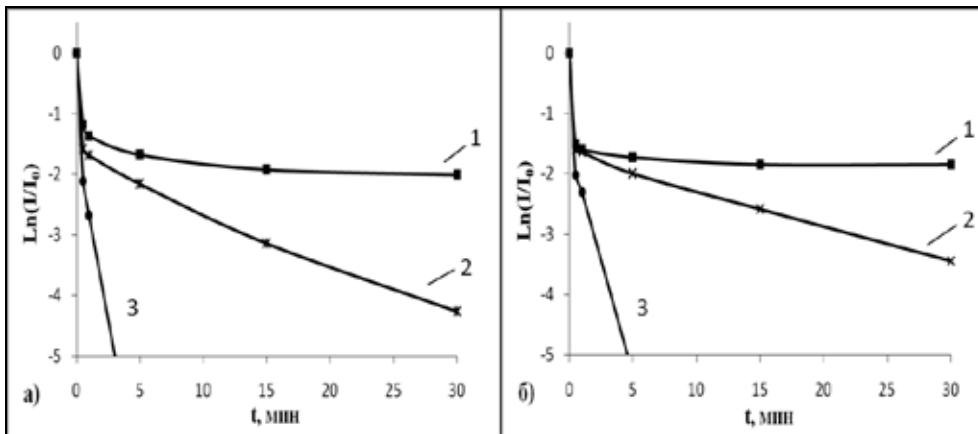


Рис. 4. Кинетические кривые термоинактивации биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза при разных значениях температуры (1 – 33 °С, 2 – 38 °С, 3 – 43 °С) в присутствии 5 %-го желатина (б) и в его отсутствие (а)

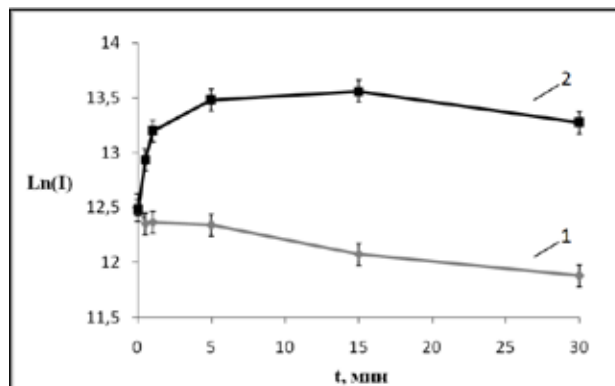


Рис. 5. Зависимость интенсивности свечения биферментной системы от времени выдерживания в присутствии 1 %-го желатина (2) и без него (контроль) (1) при 10 °С в полулогарифмических координатах

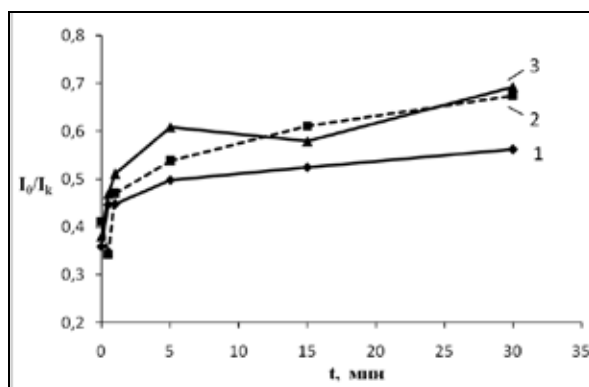


Рис. 6. Зависимость соотношения интенсивностей свечения биферментной системы в растворах желатина разной прочности (1 – 60 блум, 2 – 180 блум, 3 – 250 блум) и контрольном растворе (буфер) при варьировании времени инкубации ферментов, при 33 °C

ной в присутствии желатина при высокой температуре (35-50 °C) в течение небольшого промежутка времени (30 с – 1 мин), в условия комнатной температуры ( $\approx 20$  °C) происходит ее реактивация: например, после 20 мин выдерживания при комнатной температуре активность биферментной системы, предварительно выдержанной в течение 1 мин при 48 °C, возрастает в 9 раз. В отсутствие желатина такой эффект тоже наблюдается, однако в меньшей степени: при аналогичных условиях в течение 20 мин выдерживания при комнатной температуре активность биферментной системы возрастает в 5 раз. Таким образом, процесс термоинактивации биферментной системы частично обратим, наличие желатина способствует восстановлению активности ферментов.

Сравнение кинетических кривых термоинактивации в присутствии желатина разной прочности, выраженной в блумах, показало, что принципиальных различий кинетических характеристик биферментной системы в желатинах различной прочности нет. Также показано, что, несмотря на снижение абсолютного значения активности биферментной системы в растворах желатина, отношение активности в присутствии желатина к актив-

ности без него растет с увеличением времени инкубирования ферментов при данной температуре (рис. 6).

Проведена оценка эффективности функционирования люциферазы и NADH:FMN-оксидоредуктазы в условиях повышенной вязкости, создаваемой желатиновым раствором. Из полученных в эксперименте значений скорости изменения оптической плотности по формуле (3) были рассчитаны скорости ферментативного и неферментативного окисления NADH (табл. 1). Скорости как неферментативного окисления NADH, так и окисления NADH оксидоредуктазой (в том числе и в составе препарата КРАБ) в присутствии желатина не отличаются от скоростей окисления в буферном растворе.

Таким образом, в работе показано, что активность биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза и кинетика её термоинактивации в желатине, не образующем гель, (золе) и в гелеобразном желатине, получаемом при достаточных для формирования геля концентрациях желатина и при низких температурах, различаются. В то время как помещение ферментов в золь желатина приводит к снижению интенсивности биолюминесценции, включение ферментов в геле-



Таблица 1. Скорость ферментативного и неферментативного окисления NADH в присутствии 1 % желатина и без него

Фермент	V, мкмоль/мин	
	Буфер	Желатин
без ферментов	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2
люцифераза	1,26 ± 0,3	0,93 ± 0,04
оксидоредуктаза	2,6 ± 0,6	2,3 ± 0,3
КРАБ	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,2

вую матрицу желатина способствует их стабилизации и увеличению выхода активности, что даёт повод для рассмотрения возможности создания нового иммобилизованного реагента для биолюминесцентного анализа на основе иммобилизованных в желатиновый гель ферментов светящихся бактерий. Термоинактивация биферментной системы имеет нелинейный характер и протекает по диссоциативному ме-

ханизму. Желатин, находящийся в виде золя, ускоряет первый этап термоинактивации, а гелеобразный желатин, напротив, способствует активации биферментной системы. В присутствии желатина возможна реактивация биферментной системы при комнатной температуре. Помещение ферментов в вязкую среду, созданную гелевым окружением желатина, не влияет на скорость ферментативных реакций.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (ФЦП «Научно-педагогические кадры инновационной России», государственный контракт № 02.740.11.0766), РФФИ (грант 07-04-01340-а), Министерства образования и науки Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития (гранты № 2.2.2.2/5309 и RUX0-002-KR-06/BR4M02), Российской академии наук (Программа «Молекулярная и клеточная биология»), а также Президента РФ (грант НШ 64987.2010.4).*

### Список литературы

- Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В. и др. (1987) Биотехнология: Учеб. пособие для вузов: В 8 кн. / Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. М.: Высшая школа, 159 с. Кн. 7: Иммобилизованные ферменты.
- Гительзон И.И., Родичева Э.К., Медведева С.Е. и др. (1984) Светящиеся бактерии. Новосибирск: Наука, 278 с.
- Дементьева Е.И., Малюшенков Л.Г., Угарова Н.Н. (2000) Инактивация люциферазы светляков *Luciola mingrelica* гуанидинхлоридом и её реактивация. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 41: 366-370.
- Джеймс Т.Х. (1980) Теория фотографического процесса. Л.: Химия, 672 с.
- Есимбекова Е.Н., Торгашина И.Г., Кратасюк В.А. (2009) Сравнение иммобилизованной и растворимой биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза. Биохимия 74: 853-859.
- Кратасюк В.А., Гительзон И.И. (1987) Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе. Успехи микробиологии 21: 3-30.

Лундовских И.А., Дементьева Е.И., Угарова Н.Н. (2000) Кинетика и механизм термоинактивации рекомбинантной люциферазы светляков *Luciola mingrelica*. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 41: 362-366.

Петушков В.Н., Кратасюк Г.А., Кратасюк В.А., Белобров П.И. (1982) Термоинактивация бактериальной люциферазы. Биохимия 47: 1773–1777.

Полторак О.М., Чухрай Е.С. (1986) Диссоциативная термоинактивация биокатализаторов. Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология, Т. 5. ВИНТИ, М., С. 50-86.

Brolin S., Wettermark G. (1992) Bioluminescence Analysis. Weinheim, Germany: VCH, 151 p.

Esimbekova E.N., Kratasyuk V.A., Torgashina I.G. (2007) Disk-shaped immobilized multicomponent reagent for bioluminescent analyses: correlation between activity and composition. Enzyme and microbial technology 40: 343-346.

Fisher A.J., Thompson T.B., Thoden J.B., Baldwin T.O., Rayment I. (1996) The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. J. Biol. Chem. 271: 21956-21968.

Koike H., Sasaki H., Kobori T., Zenno S., Saigo K., Murphy M.E., Adman E.T., Tanokura M. (1998) 1.8 Å crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*: overall structure, cofactor and substrate-analog binding, and comparison with related flavoproteins. J. Mol. Biol. 280: 259-273.

Kratasyuk, V.A., Esimbekova E.N., Gladyshev M.I., Khromichuk E.B., Kuznetsov A.M., Ivanova E.A. (2001) The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems. Chemosphere 42: 909-915.

Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N. (2003) Polymer Immobilized Bioluminescent Systems for Biosensors and Bioinvestigations. In: Arshady R. (ed.) Polymeric Biomaterials, The PBM Series, vol. 1. Citus Books, London, p. 301-343.

Kricka L., Wienhausen G., Hinkley J., DeLuca M. (1983) Automated bioluminescent assay for NADH, glucose-6-phosphate, primary bile acids, and ATP. Anal. Biochem. 129: 392–397.

Kudryasheva N.S., Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N., Vetrova E.V., Nemtseva E.V., Kudinova I.Y. (1998) Development of the bioluminescent bioindicators for analyses of environmental pollutions. J. Field Analytical Chemistry and Technology 2: 277-280.

Roda A., Pasini P., Mirasoli M., Michelini E., Guardigli M. (2004) Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. Trends Biotechnol. 22: 295-303.

Vetrova E., Esimbekova E., Remmel N., Kotova S., Beloskov N., Kratasyuk V., Gitelson I. (2007) A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water. Luminescence 22: 206 – 214.

## **Thermoinactivation of Coupled Enzyme System of Luminous Bacteria NADH:FMN-Oxidoreductase-Luciferase in Gelatin**

**Anna E. Bezrukikh<sup>a</sup>,  
Elena N. Esimbekova<sup>b,a</sup> and Valentina A. Kratasyuk<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>*Siberian Federal University,  
41 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

<sup>b</sup>*Institute of Biophysics,  
50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

---

*Influence of gelatin solution and gel on bioluminescence of coupled enzymatic system of luminous bacteria NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase was analyzed, thermostability and thermoinactivation of coupled enzyme system in gelatinous environment were studied. Activity of coupled enzyme system and kinetics of its thermoinactivation in gelatin with low concentration, that is insufficient for gel formation, and in gelatin with high concentration, that is sufficient for gel formation, was different. It was determined that thermoinactivation of coupled enzyme system has nonlinear nature and occurs with dissociative mechanism. It was showed that gel matrix of gelatin stabilizes enzymes. There was no effect of viscous environment originating by gelatin surroundings on the rate of enzymatic reactions.*

*Keywords: bacterial luciferase, NADH:FMN-oxidoreductase, bioluminescence, thermoinactivation of enzymes, stabilization of enzymes, gelatin.*

---