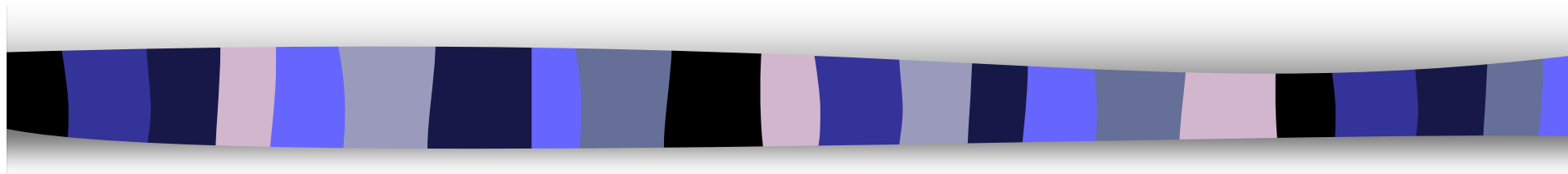


Температурные зависимости действия ферментов и инактивации ферментов





Температурные зависимости и инактивация ферментов

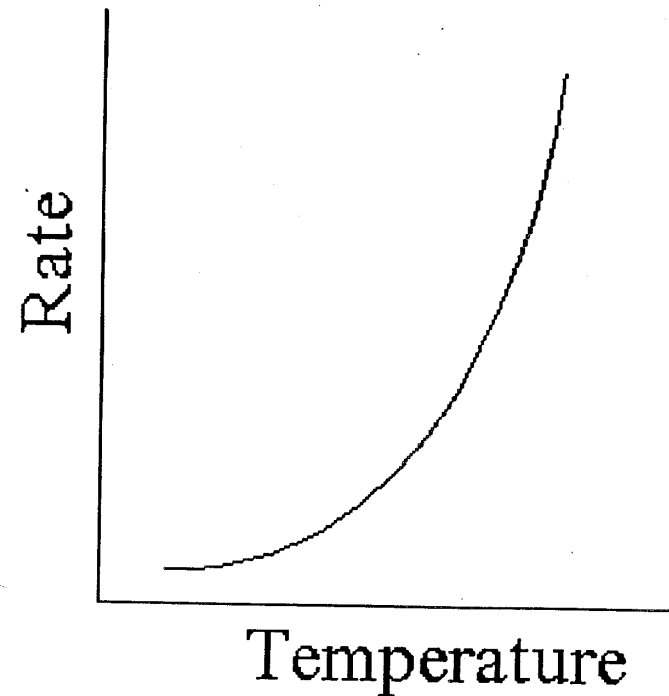
- Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры. Энергия и энтальпия активации
- Денатурация ферментов

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

$10^{\circ} \rightarrow 2-5$ times

$\Delta H^{\#} \approx 25$ kcal

$k_{90^{\circ}}/k_{20^{\circ}} = 13000$



Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры



$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{\text{ass}} = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln \{k_R / (k_B T / h)\} = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

Теория абсолютных скоростей:

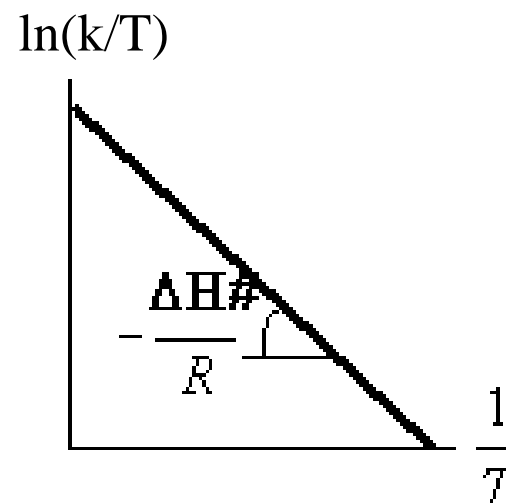
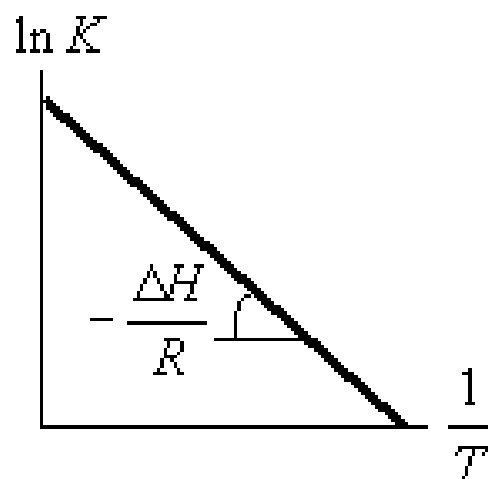
$$k_r = (k_B T / h) e^{- (\Delta G^\ddagger / RT)}$$

Уравнение Аррениуса:

$$k_r = k_0 e^{- (E_a / RT)} \quad E_a = \Delta H^\ddagger + RT$$

АНАЛИЗ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ЭФФЕКТОВ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

Зависимости $\ln K$ и $\ln k_r$ от T



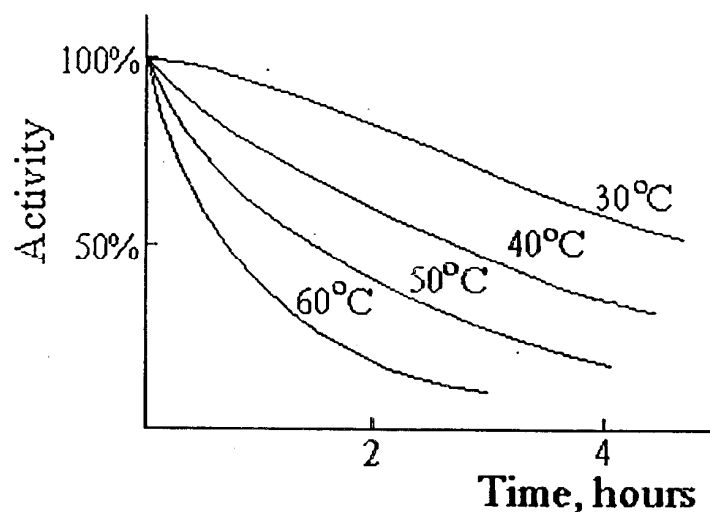
$$k(T) = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}$$

Верно ли указаны параметры,
находимые из данных линеаризаций?

АНАЛИЗ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ЭФФЕКТОВ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

Инактивация ферментов

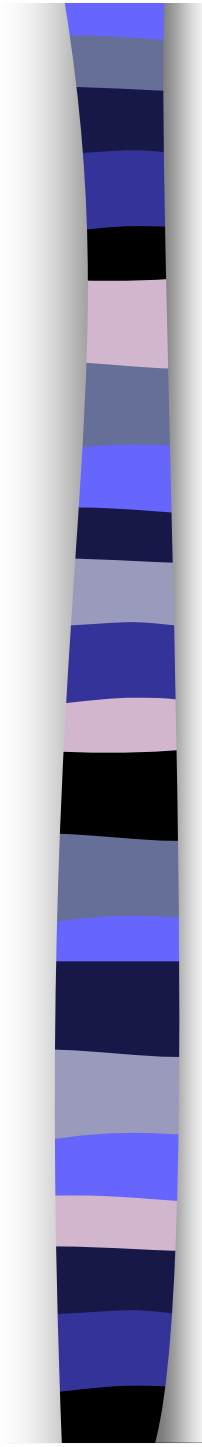
Исследование активности фермента при выдерживании в течение некоторого времени при фиксированной температуре



Инактивация может описываться кинетикой реакций различного порядка.

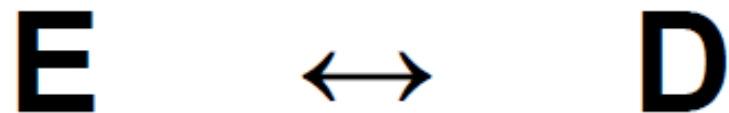
Уравнение для процесса инактивации первого порядка:

$$A(t) = A_0 e^{-k_{in}(T)t}$$

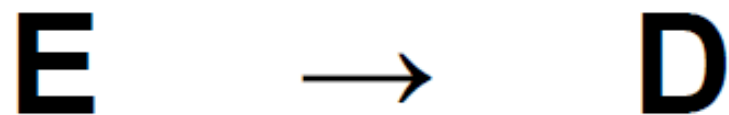


Денатурация белков (ферментов) мономолекулярный механизм

Обратимая



Необратимая



Примеры термоинактивации вариантов формиатдегидрогеназы

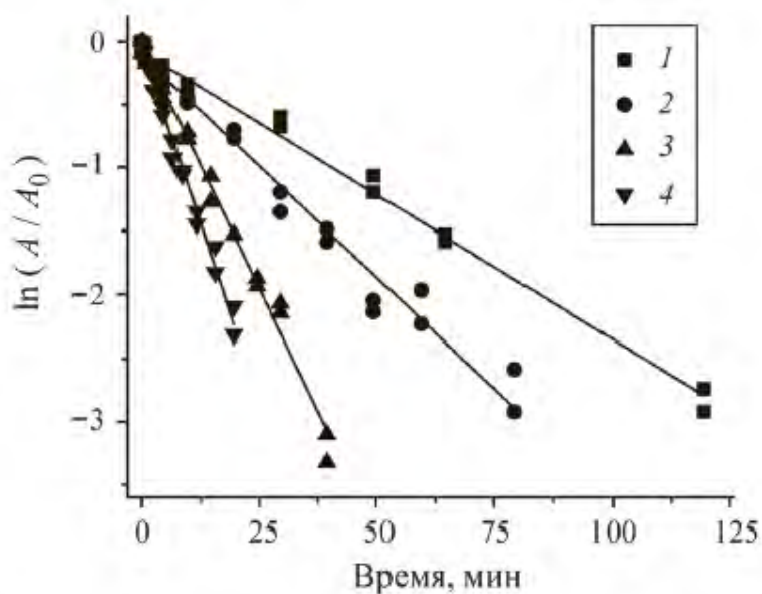


Рис. 4. Зависимость логарифма остаточной активности His₆-PseFDH от времени при разных значениях температуры. °C: 1 – 63, 2 – 64, 3 – 65, 4 – 66; 0.1 М натрий-фосфатный буфер (pH 7.0)

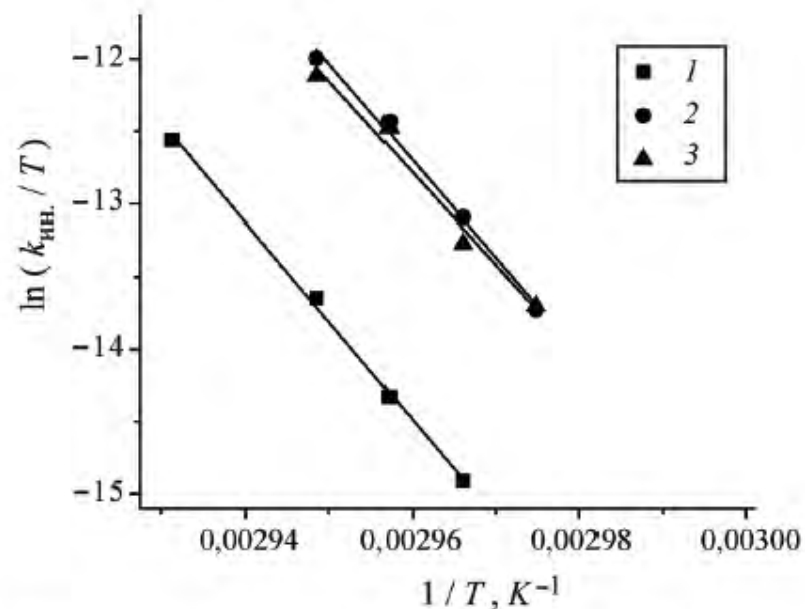
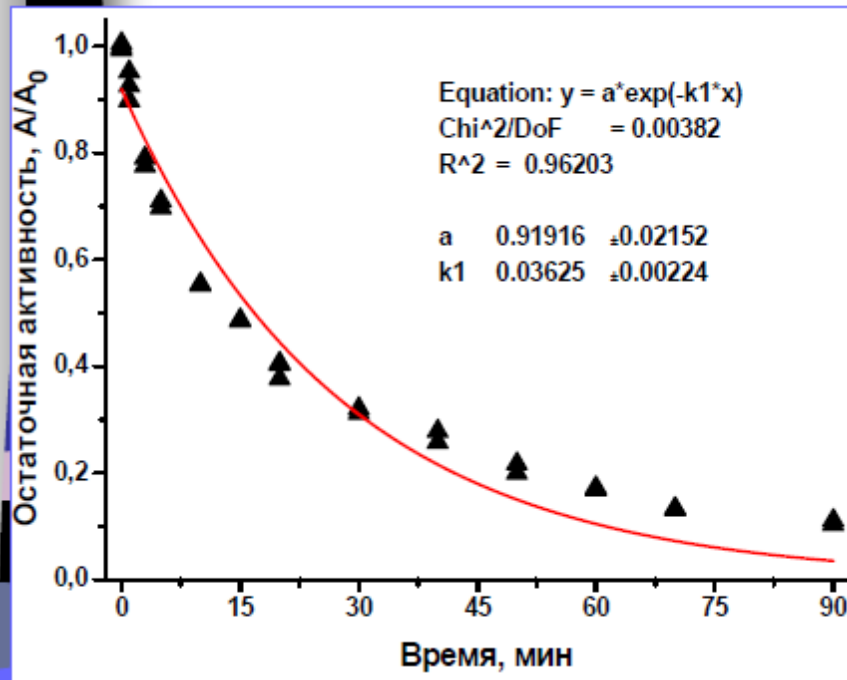
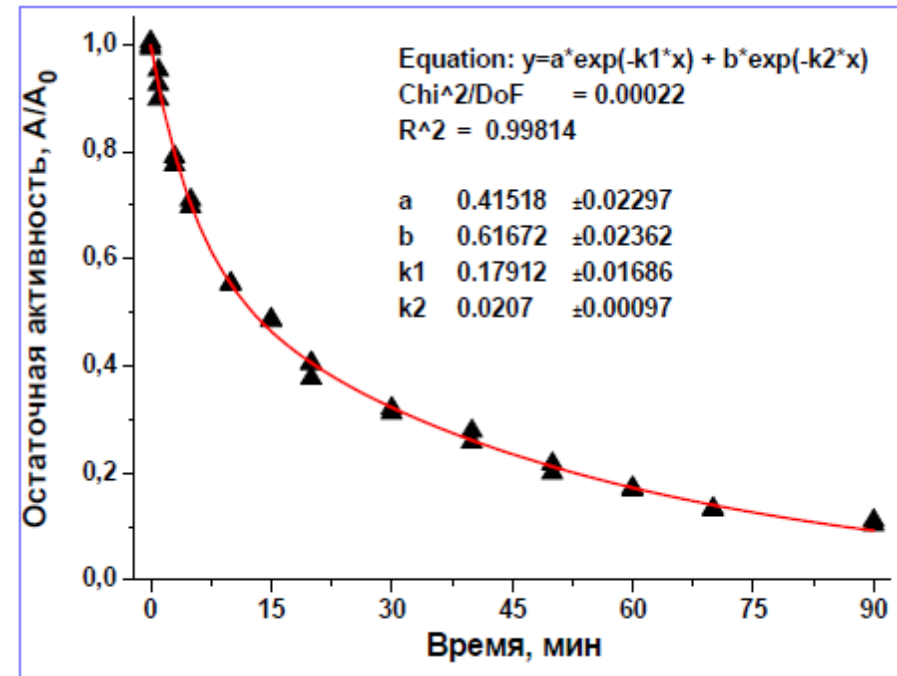


Рис. 5. Зависимость константы скорости термоинактивации His₆-PseFDH D221Q/SM4 (1), His₆-PseFDH D221Q (2) и His₆-PseFDH (3) от температуры в координатах $\ln(k_{ин.}/T) - 1/T$; 0.1 М фосфатный буфер (pH 7.0)

Температурная инактивация TvDAAO

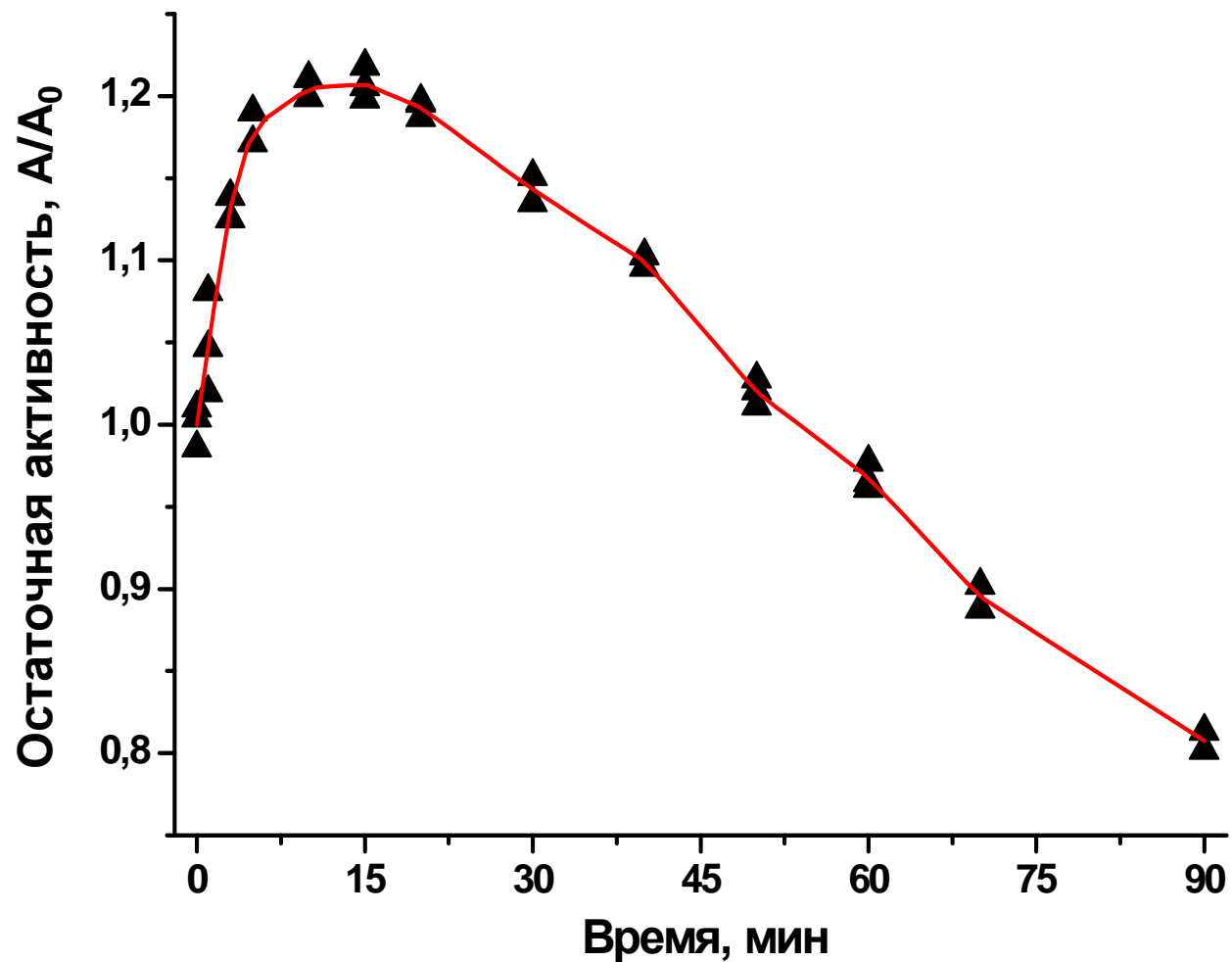


аппроксимация простой
экспоненциальной функцией



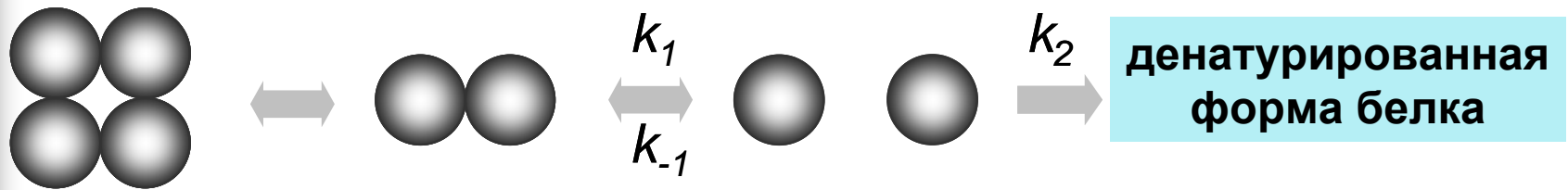
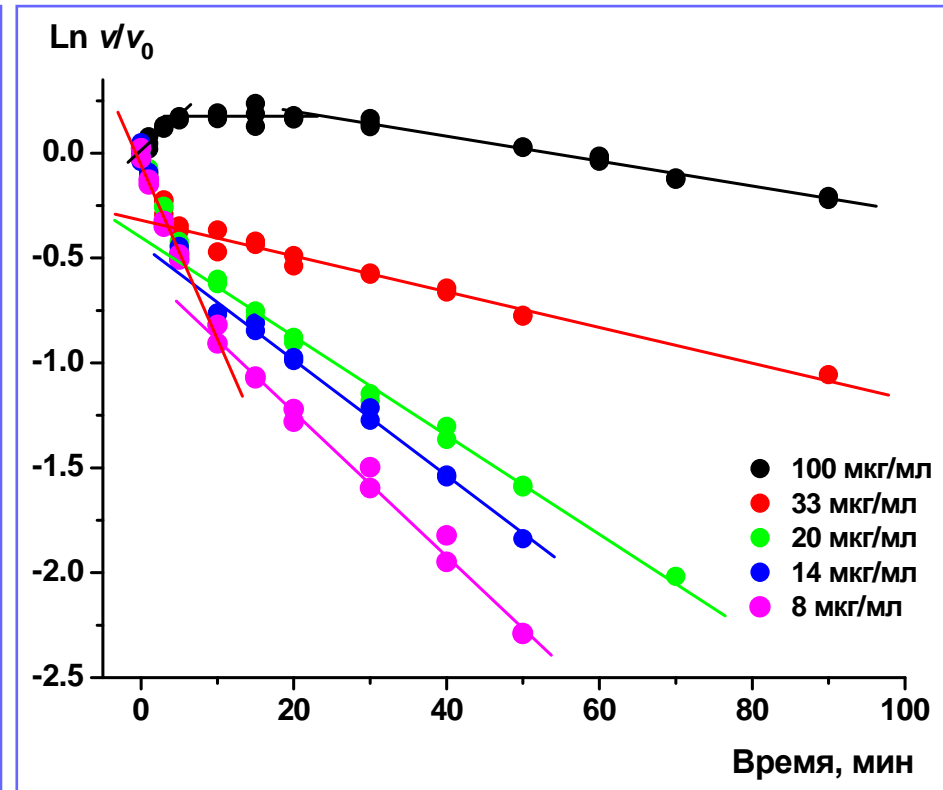
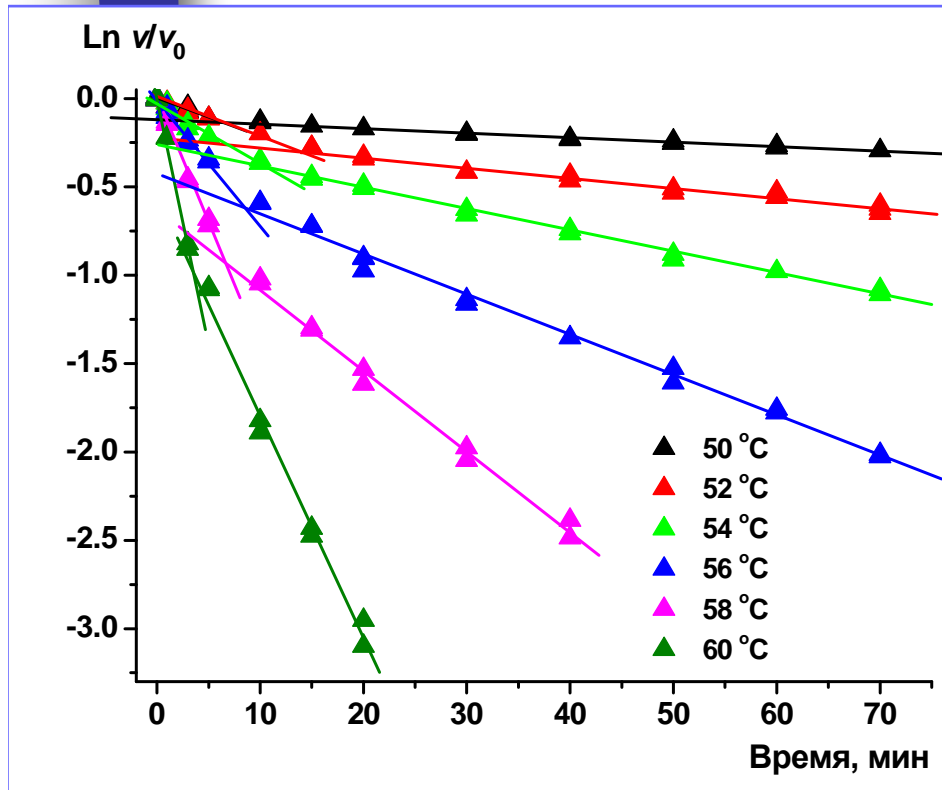
аппроксимация суммой двух
экспоненциальных функций

Температурная инактивация TvDAAO



Концентрация белка 100 мкг/мл, 54 °С, 50 мМкалий-фосфатный буфер, рН 8,0

Механизм термоинактивации*



*О.М.Полторах, Е.С.Чухрай. Итоги науки и техники. Биотехнология. 1986, 5, с.50-86

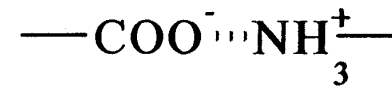
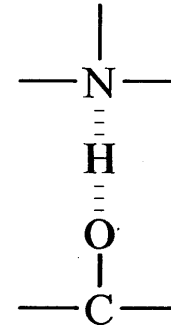
Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации TvDAAO

T, °C	$K_{\text{dis}} \cdot 10^7, \text{M}$	$k_1 \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	$k_2 \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$
50	0,19	2,86	2,28
52	1,27	3,67	3,13
54	1,34	9,20	5,56
56	6,00	11,6	7,07
58	9,27	21,5	10,8
60	14, 6	40,5	19,4

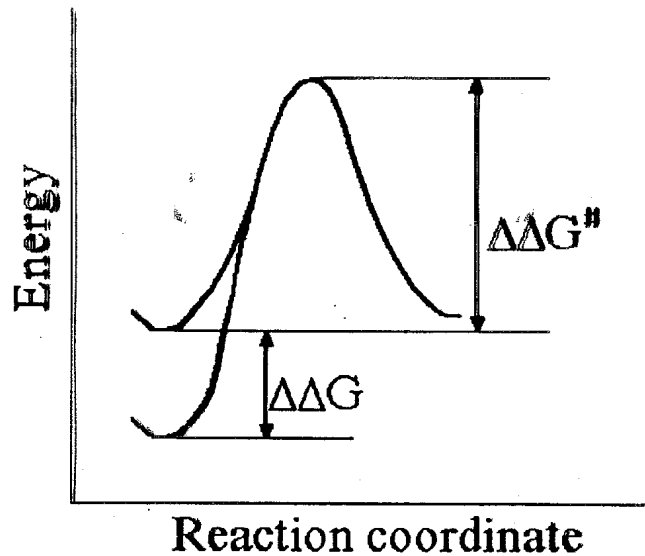
Концентрация рекомбинантной TvDAAO 20 мкг/мл,
50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 8,0

Стабилизация ферментов – уменьшение скорости инактивации

- Водородные связи
- Электростатические взаимодействия (солевые мостики)
- Дисульфидные связи



Стабилизация ферментов – уменьшение скорости инактивации

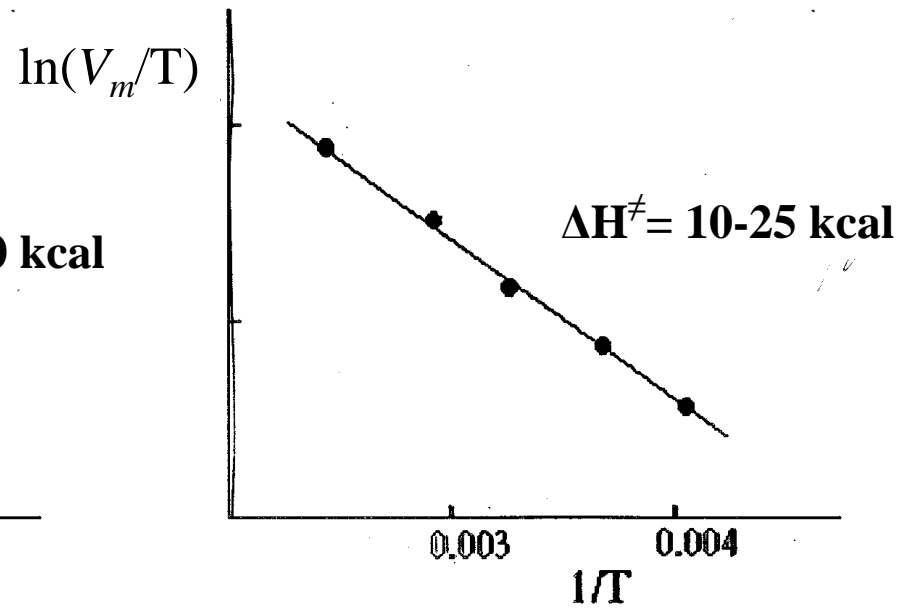
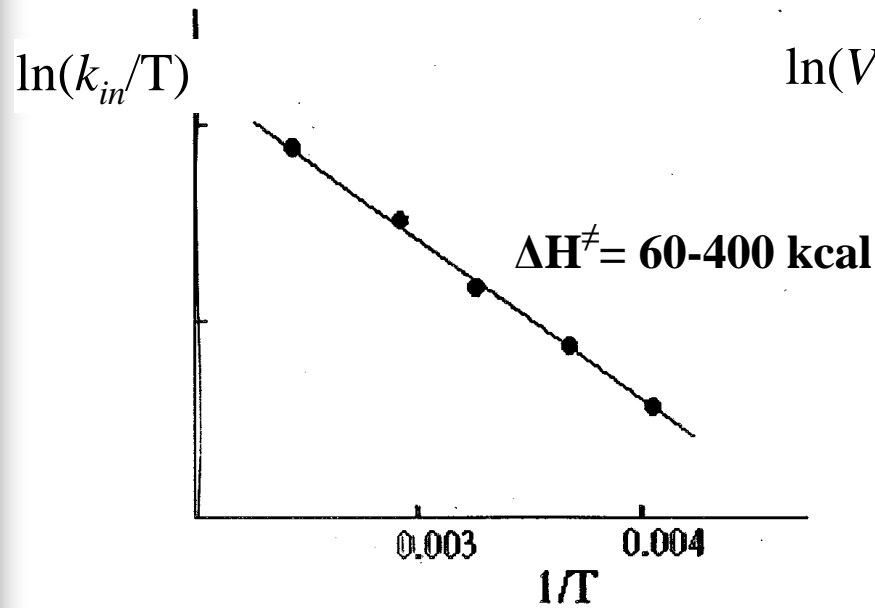


$$\frac{k_{in}^{(1)}}{k_{in}^{(2)}} = e^{\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

$$\Delta\Delta G^\ddagger = 3 - 6 \text{ kcal/mole}$$

- Эффект стабилизации
150 – 2.2*10⁴

Ферменты из термофильных организмов



- Высокая стабильность
- Высокая энергия активации
- Ферменты из термофилов обычно при комнатной температуре проявляют низкую активность