

# Температурные зависимости действия ферментов и инактивации ферментов





# Температурные зависимости и термоинактивация ферментов

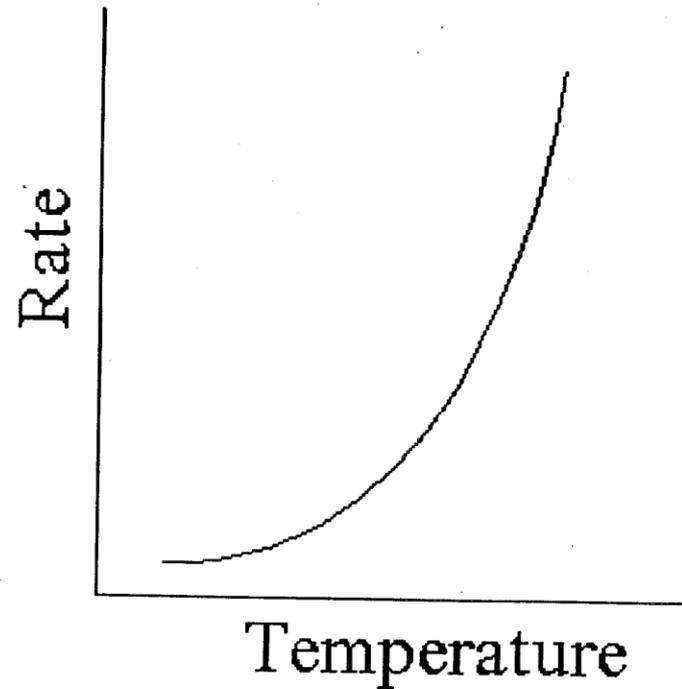
- Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры. Энергия и энтальпия активации
- Денатурация ферментов

# 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



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

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

**Теория абсолютных скоростей:**

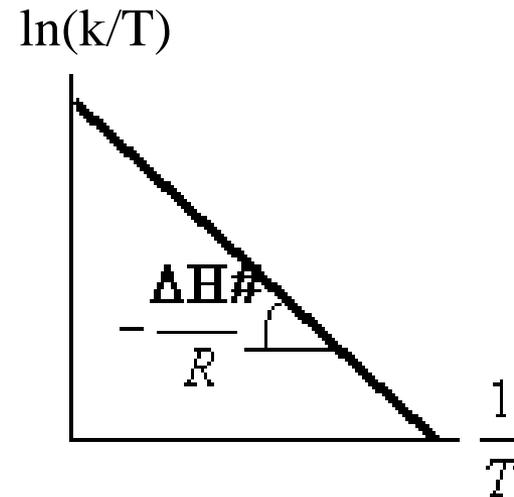
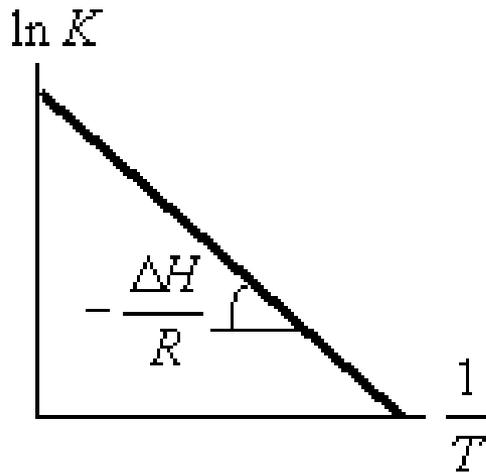
$$k_r = \left( \frac{k_B T}{h} \right) e^{- (\Delta G^\ddagger / RT)}$$

**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  $T$



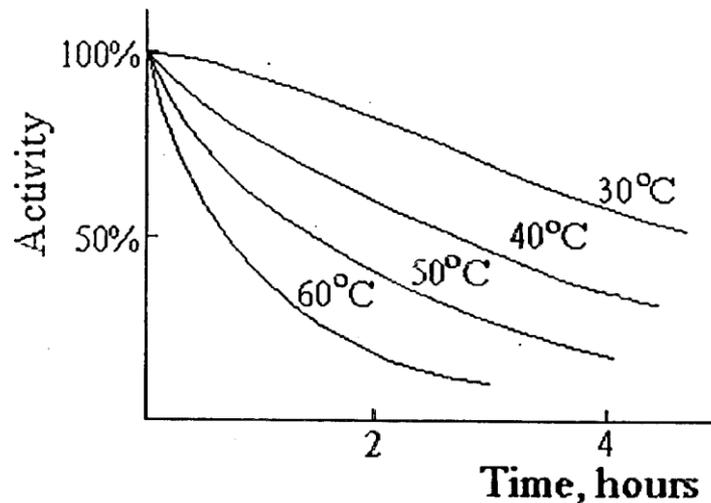
$$k(T) = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}$$

Верно ли указаны параметры,  
находимые из данных линеаризаций?

# АНАЛИЗ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ЭФФЕКТОВ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

## Инактивация ферментов

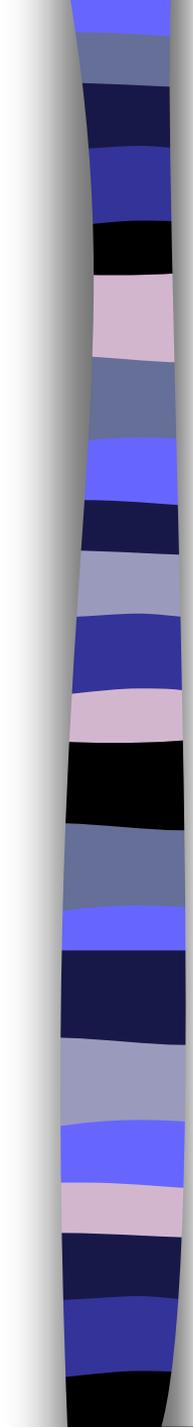
Исследование активности фермента  
при выдерживании в течение некоторого времени  
при фиксированной температуре



Инактивация может  
описываться кинетикой  
реакций различного  
порядка.

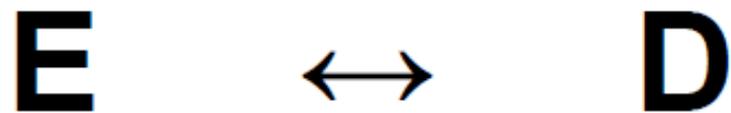
Уравнение для процесса  
инактивации первого  
порядка:

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

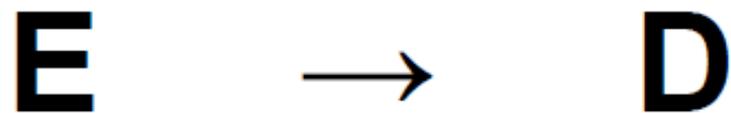


# Денатурация белков (ферментов) мономолекулярный механизм

**Обратимая**



**Необратимая**



# Примеры термоинактивации вариантов формиатдегидрогеназы

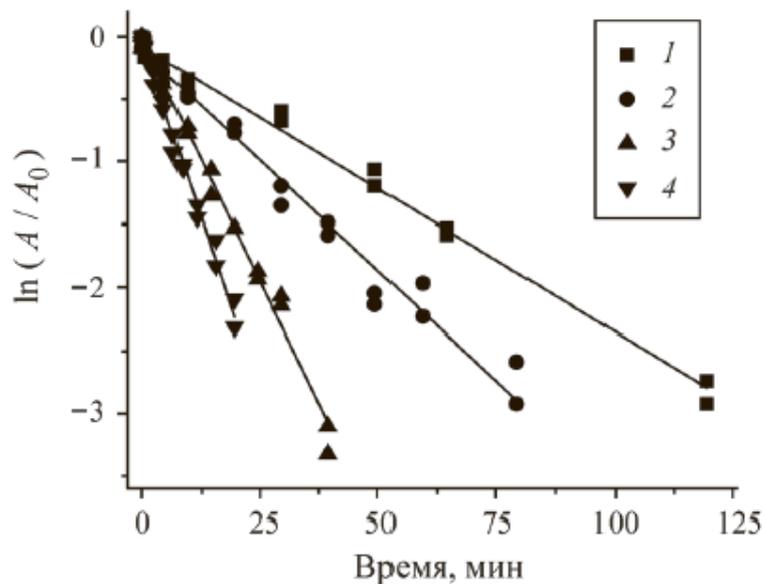


Рис. 4. Зависимость логарифма остаточной активности His<sub>6</sub>-PseFDH от времени при разных значениях температуры, °С: 1 – 63, 2 – 64, 3 – 65, 4 – 66; 0,1 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,0)

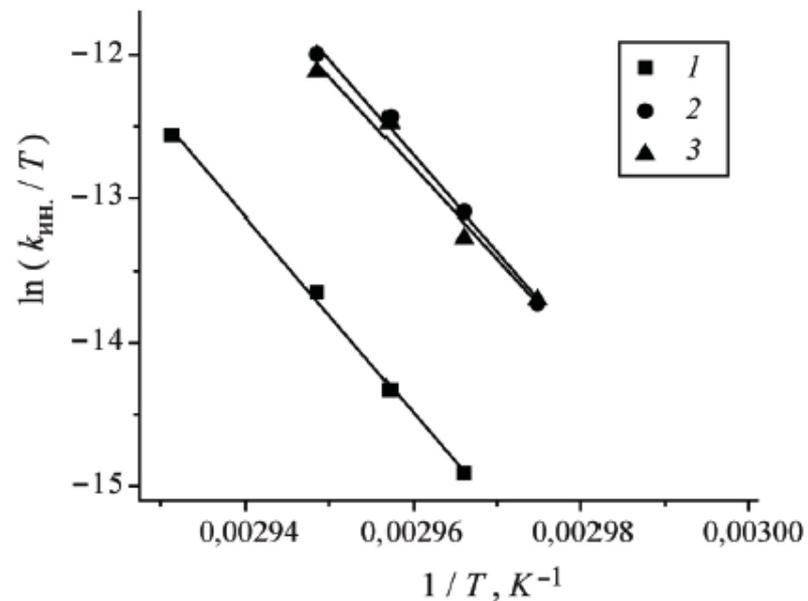
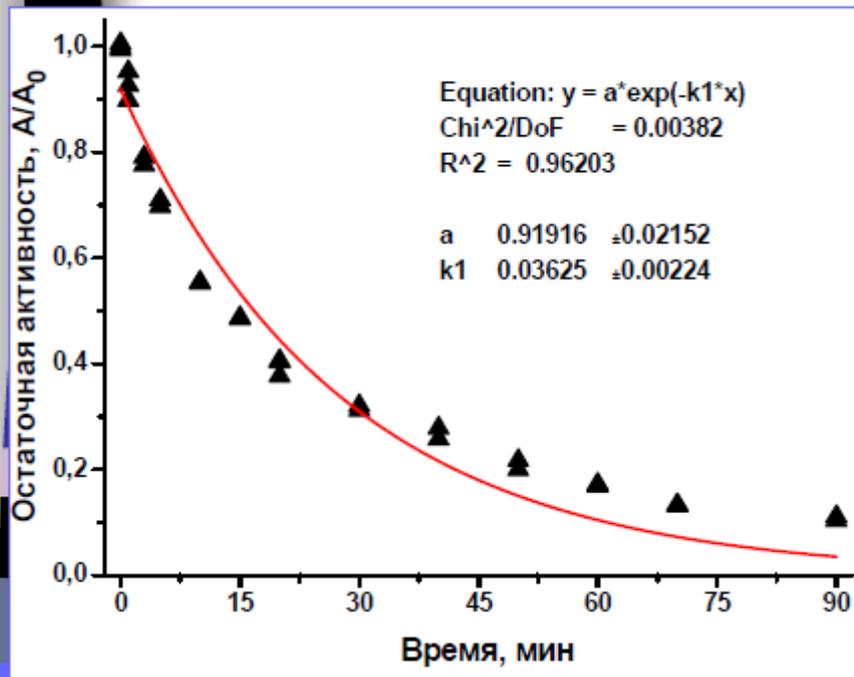
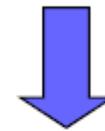
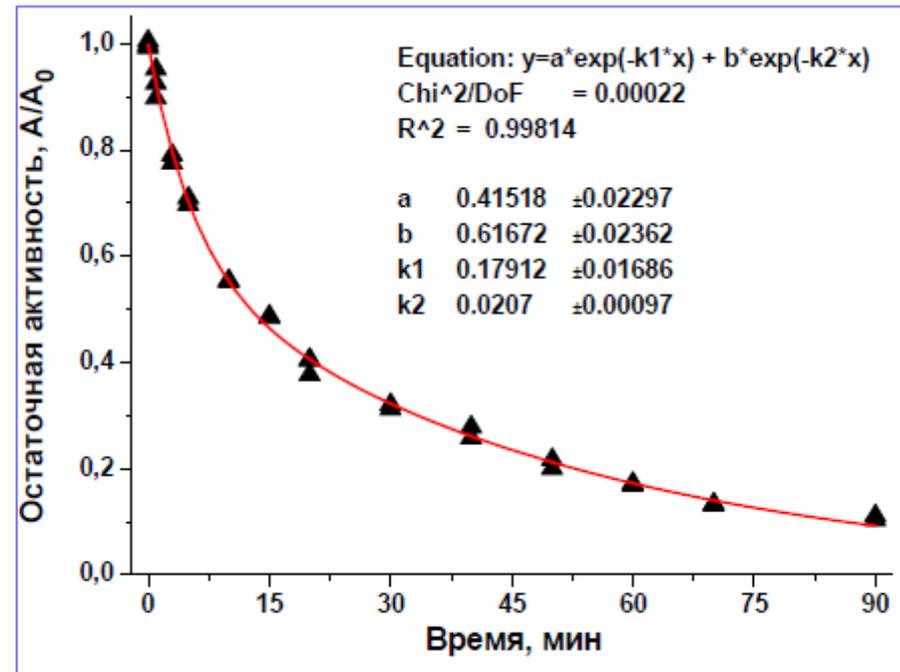


Рис. 5. Зависимость константы скорости термоинактивации His<sub>6</sub>-PseFDH D221Q/SM4 (1), His<sub>6</sub>-PseFDH D221Q (2) и His<sub>6</sub>-PseFDH (3) от температуры в координатах  $\ln(k_{ин.}/T) - 1/T$ ; 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,0)

# Температурная инактивация TvDAAO

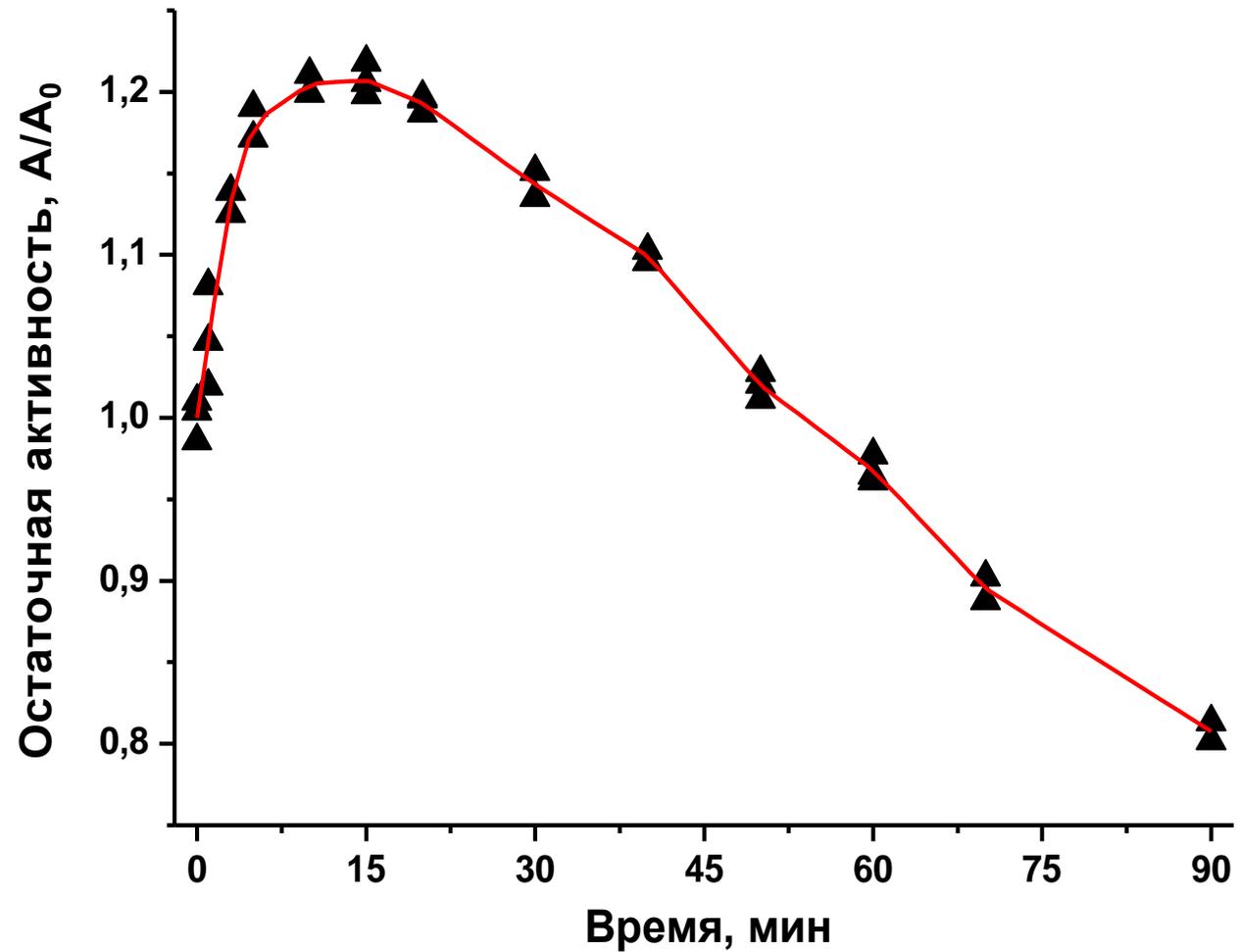


аппроксимация простой экспоненциальной функцией



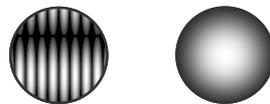
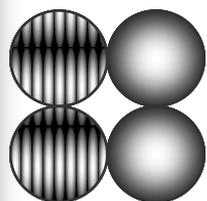
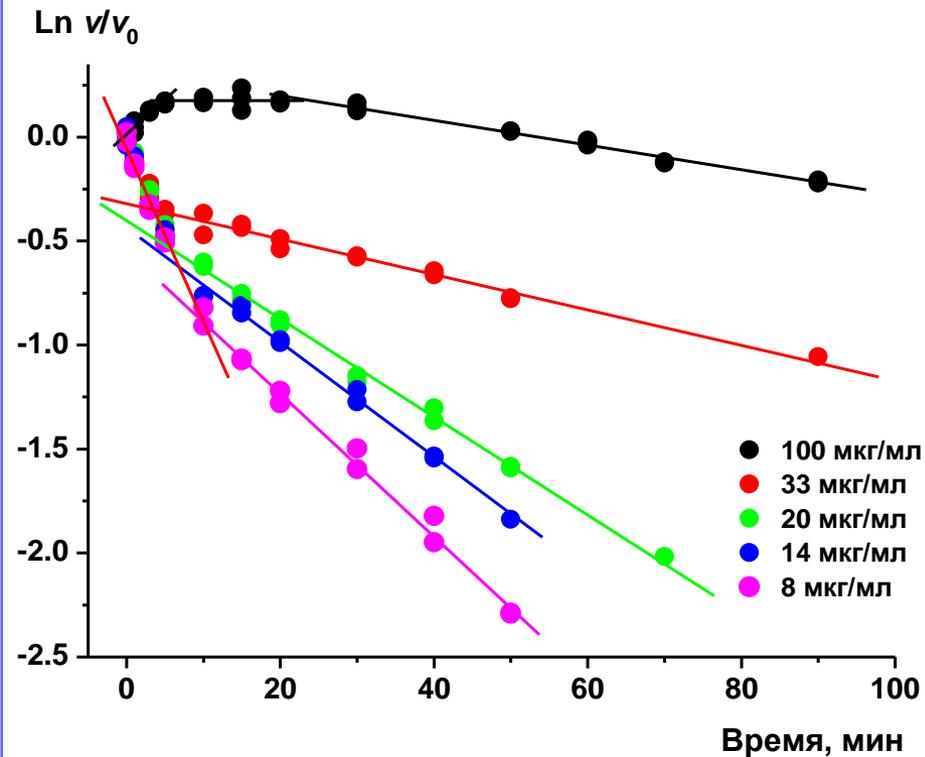
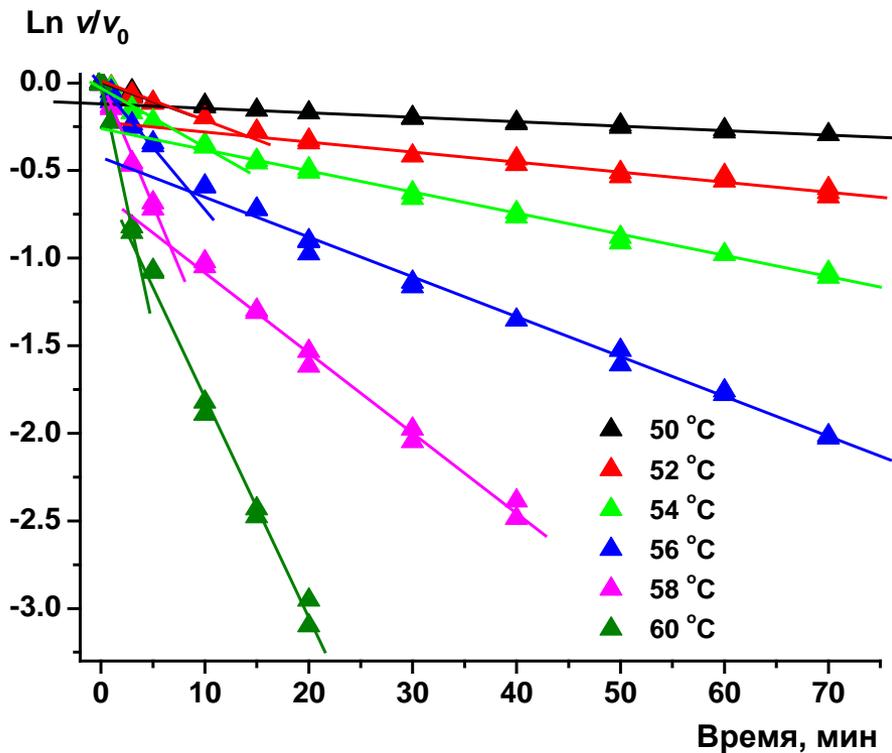
аппроксимация суммой двух экспоненциальных функций

# Температурная инактивация TvDAAO



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

# Механизм термоинактивации\*



денатурированная  
форма белка

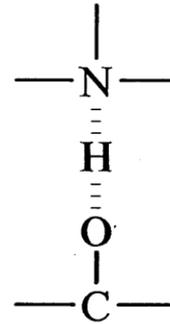
# Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации TvDAAO

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

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

# Стабилизация ферментов – уменьшение скорости инактивации

- Водородные связи



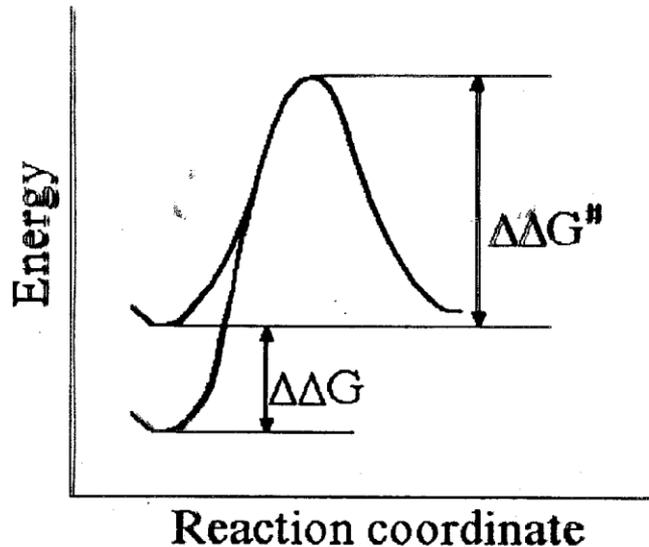
- Электростатические взаимодействия  
(солевые мостики)



- Дисульфидные связи



# Стабилизация ферментов – уменьшение скорости инактивации

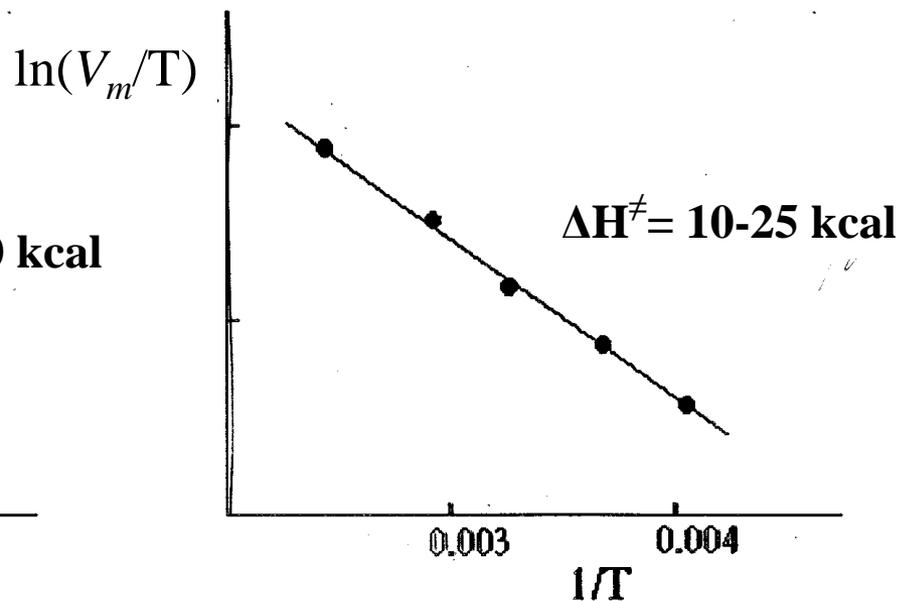
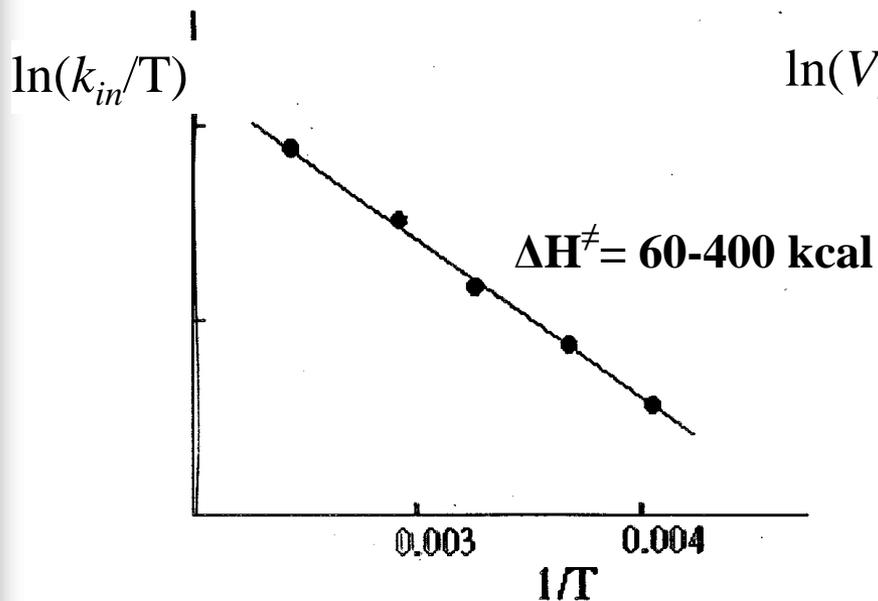


$$\frac{k_{in}^{(1)}}{k_{in}^{(2)}} = e^{\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

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

- Эффект стабилизации  
150 –  $2.2 \cdot 10^4$

# Ферменты из термофильных организмов



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