

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова
Химический факультет
Кафедра физической химии

**Влияние температуры на активность и стабильность
 β -галактозидазы из *Kluyveromyces Fragilis*.**

*Курсовая работа
по физической химии
студентки 4XX группы
XXXXXXXXXX X.X.*

*Научный руководитель:
к.х.н. XXXXXXXXX X.X.*

Москва XXXX.

Содержание.

I. Введение	3
II. Литературный обзор	4
II.1. β - галактозидазы	4
II.2. Термоинактивация олигомерных ферментов	6
III. Экспериментальная часть	15
III.1. Определение активности фермента.....	15
III.2. Определение константы Михаэлиса.....	16
III.3. Методика проведения термоинактивации.....	18
III.4. Расчет констант скоростей.....	21
III.5. Расчет числа стадий, не сопровождающихся потерей активности.....	22
IV. Обсуждение результатов	23
V. Выводы	26
VI. Литература	27

I. Введение.

β -Галактозидаза – один из немногих ферментов, нашедших практическое применение в производстве продуктов детского и питания. Он используется для изготовления безлактозных смесей для детского и диетического питания (превращает неусвояемый часто дисахарид лактозу в усвояемые моносахариды).

Гидролиз лактозы и дисахарида молока – промышленный процесс в пищевой промышленности, который интенсивно развивается в течение двух последних десятилетий и используется для получения безлактозных продуктов. Возможны два способа гидролиза лактозы: кислотный и ферментативный. При использовании кислот в качестве катализатора скорость процесса велика, однако температура намного выше, чем при использовании фермента (150° и $30-40^{\circ}$ соответственно). Есть и другие преимущества ферментативного гидролиза лактозы.

Гидролиз лактозы катализируют β -галактозидазы из различных источников: животных, растений, и микроорганизмов (бактерии, грибы, дрожжи). Однако, бактериальные ферменты небезопасны для применения в пищевой промышленности. Изоферменты из животных и растительных источников дороги и неактивны. Наиболее пригодны для практического применения грибные и дрожжевые β -галактозидазы.

Поэтому очень важной задачей является получение активных и стабильных биокатализаторов на основе β -галактозидазы. Решение этих задач невозможно без детального исследования структурных и кинетических аспектов термоинактивации фермента.

II. Литературный обзор.

II.1. β -галактозидазы.

β -Галактозидаза (другое название лактаза, 3.2.1.23 по классификации ферментов) – фермент, гидролитически отщепляющий концевые нередуцирующие остатки β -D-галактозы в β -галактозидах. Некоторые ферменты из этой группы гидролизуют также α -L-арабинозиды. Все β -галактозидазы относятся к трем семействам гидролаз: 1, 2 и 35. Ферменты из семейства 1 проявляют широкую субстратную специфичность и не регулируются металлами-активаторами. Изоферменты, относящиеся к семейству 2, проявляет высокую специфичность в отношении β -D-галактозидаз и в каталитическом центре содержат ионы двухвалентных металлов (магний, кальций, марганец). β -Галактозидазы семейства 35 являются кислыми глюкозидазами, помимо β -галактозидов они гидролизуют и α -L-арабинозиды, а также полимеры, содержащие галактозу. Одним из таких соединений является арабиногалактан (полимер арабинозы и галактозы). Известные в настоящее время β -галактозидазы имеют различную четвертичную структуру и могут значительно отличаться по молекулярным массам.

Этот фермент играет важную роль в процессе жизнедеятельности животных, растений и микроорганизмов. В организмах животных различают по крайней мере три типа β -галактозидаз, которые локализованы в различных органах и выполняют различные функции. Один из этих ферментов локализован на внутриклеточных мембранах и гидролизует лактозу в процессе пищеварения. Помимо лактазной активности фермент проявляет также phlorizin-hydrolase активность. Обе ферментативные активности связаны с одной полипептидной цепью, но каталитические центры различны. Второй фермент локализован в лизосомах. Этот фермент, работающий в кислой области pH, гидролизует концевые остатки β -галактозидов различных субстратов. Существует он в димерной и мономерной форме, молекулярная масса мономера 120-125 кД. Третья разновидность животной β -галактозидазы находится в cytosol. Этот растворимый фермент выделен из различных органов животных. Оптимум pH активности фермента колеблется от 5 до 7.5, он проявляет широкую субстратную

специфичность в отношении β -D-галактозидов, β -D-глюкозидов, α -L-арабинозидов.

Наиболее многочисленны и многообразны β -галактозидазы микроорганизмов. В соответствии с классификацией микроорганизмов ферменты также подразделяют на бактериальные, грибные и дрожжевые (хотя, если быть точным, дрожжи – это разновидность грибов).

Среди дрожжевых β -галактозидаз достаточно хорошо изучена глобулярная структура фермента из *Kluyveromyces lactis*. Этот фермент является гомотетрамером, состоящим из субъединиц, молекулярная масса которых 124 кД. Активными формами являются димеры и тетрамеры. Было высказано предположение, что можно выделить помимо мономера, димера и тетрамера также и тример с молекулярной массой около 385 кД.

Важную роль играет β -галактозидаза и в обменных процессах человеческого организма. Так, например недостаток лизосомной кислой β -галактозидазы приводит к прогрессирующему неврологическому заболеванию. Кроме того организм многих людей (иногда даже целых народов) не способен усваивать молочный сахар из-за дефицита β -галактозидазы. В связи с этим в последние десятилетия возникла острая потребность в безлактозных продуктах для диетического и детского питания, особенно для искусственно вскармливаемых детей. Эти продукты получают в результате гидролиза молочного сахара – лактозы, продуктами гидролиза являются легко усвояемые детским организмом глюкоза и галактоза. В то же время лактоза – сахар с малой сладостью и малой растворимостью, если сравнивать ее с продуктами гидролиза: (глюкозой и галактозой) Гидролиз этого сахара перспективен не только для применения в производстве безлактозных смесей для детского и диетического питания, но и мороженого и других охлажденных продуктов.

Известно, что бактериальные ферменты небезопасны для применения в пищевой промышленности. Изоферменты из животных и растительных источников дороги и неактивны. Наиболее пригодны для практического применения грибные и дрожжевые β -галактозидазы.

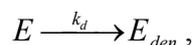
В последние годы появились работы, посвященные дрожжевой β -галактозидазе *Kluyveromyces fragilis* с точки зрения перспектив ее использования в промышленном процессе переработки молочной сыворотки, например работы

испанских биохимиков. Так, в работе[2] рассмотрены кинетические модели гидролиза лактозы этим ферментом, ингибирование его продуктами гидролиза в интервале температур 5-40⁰С. Использован препарат β-галактозидазы *Kluyveromyces fragilis* с содержанием белка около 20%. Помимо гидролиза лактозы исследовалась также реакция гидролиза β-галактозидной связи в 2-нитрофенил-β-D-галактопиранозиде (ONPG) – синтетическом субстрате β-галактозидазы. Показано, что оптимальной температурой является 40⁰, хотя фермент сохраняет свою активность при температуре 4⁰. pH оптимум каталитической активности данного фермента составляет 6.5 – 7.0. Кинетика реакции хорошо описывается в рамках уравнения Михаэлиса-Ментен. Реакция ингибируется лактозой и галактозой, тип ингибирования – конкурентный. Глюкоза не является ингибитором. В этой же работе исследована термостабильность β-галактозидазы *Kluyveromyces fragilis* при температурах 40, 45 и 50⁰С при pH 7.2. При температуре 40⁰ фермент теряет не более 10% своей активности после работы в течение 8 часов, при температуре 45⁰ активность катализатора уменьшается вдвое через 5 часов, а при 50⁰ – уже через полчаса. Кинетика термоинактивации в данной работе никак не обработана, хотя она хорошо описывается в рамках представлений о диссоциативной термоинактивации олигомерных ферментов [3].

II.2. Термоинактивация олигомерных ферментов.

В настоящее время имеется весьма обширный материал по кинетике термоинактивации ферментов в различных условиях. На основании совокупности применения результатов физических и кинетических методов можно указать по крайней мере на четыре кинетических типа инактивации ферментов [3].

I. Необратимая инактивация первого порядка:



где E и E_{den} соответственно каталитически активная и неактивная формы фермента,

а k_d – константа скорости денатурации первого порядка.

Из графика, построенного в координатах уравнения первого порядка, легко вычислить k_d:

$$k_d = \operatorname{tg}\alpha, \text{ где } \alpha\text{-угол, показанный на рис. 1,а.}$$

II. Инактивация по схеме последовательных превращений первого порядка:



В этом случае иногда учитывают одну или несколько «стабильных» и «нестабильных» промежуточных форм фермента. Если они имеют примерно одинаковую каталитическую активность, кинетические кривые приобретают вид, показанный на рис. 1,б.

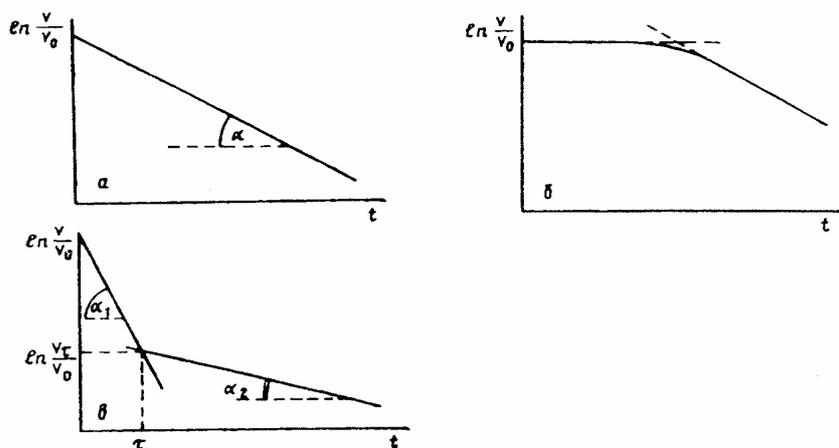
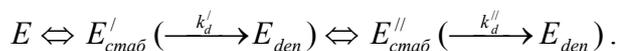


Рис. 1. Кинетические кривые термоинактивации ферментов, соответствующие различным механизмам:

а – необратимая инактивация первого порядка; б – инактивация по схеме последовательных превращений с активной промежуточной формой; в – необратимая инактивация двух последовательных стадий первого

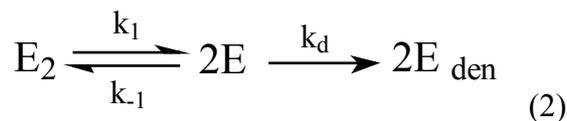
порядка или по механизму диссоциативного распада; $\frac{v}{v_0}$ - относительная активность, t – время.

III. Инактивация по механизму последовательно-параллельных реакций первого порядка по кинетической схеме:



В этом случае полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой также может иметь несколько линейных участков (рис. 1,в). Кинетический анализ ряда таких последовательно – параллельных механизмов проведен в работе [4].

IV. Диссоциативная инактивация (важнейшая для олигомерных ферментов) - процесс, при котором обратимые стадии диссоциации предшествуют кинетически необратимому изменению ее продуктов. Простейшим примером такого рода является распад димерного белка E_2 по кинетической схеме:



каталитически неактивны
активен

Здесь E - мономерный белок, способный к обратимой ренатурации, а E_{den} - продукт необратимого (в данных условиях) изменения E. Белок E_{den} уже не способен к ассоциации с образованием функционально активного белкового комплекса E₂, например, вследствие нарушения свойств контактного участка глобулы или существенных структурных изменений.

Несмотря на широкое распространение процессов диссоциативной инактивации ферментов, до последнего времени их кинетика оставалась практически неизученной. Это связано с двумя обстоятельствами [5]. Во-первых, с тем, что система дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dE_{den}}{dt} = k_d * E_1; \\ \frac{dE_1}{dt} = k_1 E_2 - k_d E_1 - 2k_{-1} E_1^2; \\ E_0 = E_2 + 2E_1 + 2E_{den}, \end{cases}$$

описывающая процесс диссоциативной инактивации, не имеет точного аналитического решения вследствие наличия нелинейности в виде квадратного члена $k_{-1} E_1^2$. И как следствие, кинетические кривые термоинактивации не имеют протяженных, строго линейных участков в координатах уравнения первого порядка, хотя иногда их можно представить как кривую с «изломом», фактически разделяющим две асимптоты к реальной кинетической кривой. Схематически это показано на рис. 1,в. Абсцисса точки пересечения асимптот первого и второго участка кривой дает характеристическое время τ . Во-вторых (и это весьма существенно), обратимые начальные стадии диссоциативной инактивации олигомерного белка удастся реально наблюдать только в небольшом температурном интервале (на 3-7 градусов выше T_{онт}) и в определенном интервале концентраций белка, лежащем вблизи численного значения константы диссоциации димерного белка. Вне этих пределов обычно удастся наблюдать только инактивацию по первому кинетическому порядку с величиной эффективной константы скорости, не имеющей определенного значения и

характеризующей только период полураспада исходного белка в данных условиях, но не какие-либо константы элементарных процессов.

В связи с этим можно выделить два критерия (кинетические особенности) диссоциативного механизма инактивации, которые делают маловероятной имитацию его другими схемами, если эксперименты проведены при различных начальных концентрациях белка $[E_0]$ и при различных температурах [3].

Наличие бимолекулярного члена в уравнениях скорости должно приводить к зависимости инактивационных кривых от общей концентрации фермента, вводимого в реакцию. Это характерно только для диссоциативных механизмов инактивации. Было показано, что характер кинетической кривой зависит от концентрации фермента и закономерно изменяется при вариации его начальной концентрации (рис. 2).

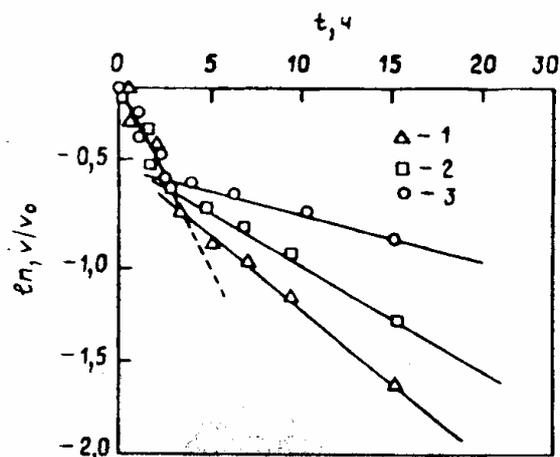
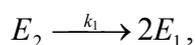


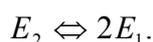
Рис. 2. Кинетика термоинактивации почечной ацилазы I при 55°C и pH 7,2.
 $[E_0]$ – 0,5 (1); 0,7 (2) и 1 (3) мг/мл.

Сложный характер кинетической кривой инактивации должен наблюдаться в сравнительно узком интервале концентраций. При $[E]_0 \gg K_{\text{дисс}}$ (где $K_{\text{дисс}} = ([E_1])^2/[E_2]$) равновесие сдвинуто в сторону димера и «излом» практически не наблюдается, хотя теоретически можно вычислить положение этой точки в различных условиях. Скорость реакции лимитируется медленной стадией появления в системе $E_{\text{ден}}$. С другой стороны, при $[E]_0 \ll K_{\text{дисс}}$ фермент находится практически полностью в мономерной форме, а лимитирующей стадией оказывается инактивация по первому порядку:



при которой «излом» на кинетической кривой вообще отсутствует. Появление «излома» можно ожидать лишь при концентрациях фермента, сопоставимых с $K_{\text{дисс}}$, когда реализуется проявление всех стадий механизма диссоциативной инактивации. Таким образом, зависимость кинетики инактивации от концентрации фермента является критерием диссоциативной инактивации.

Следующая группа признаков, отличающая процессы термоинактивации по диссоциативному механизму, связана с их специфической температурной зависимостью. Имеющиеся данные по энергиям активации диссоциации белков и необратимой инактивации свидетельствуют о том, что наиболее высокие энергии активации обычно характерны для константы k_d . Благодаря этому в низкотемпературной области инактивации фермента при $k_1 \gg k_d$, сравнительно небольшое изменение температуры может практически затормозить стадию необратимого изменения белка. Это приводит к наблюдаемости только обратимой инактивации за счет установления равновесия:



При этом кинетическая кривая инактивации приобретает вид кривой 1 на рис. 3. С повышением температуры на $2,5^{\circ}\text{C}$ степень диссоциации возрастает в два раза и соответственно увеличивается связанная с ней константа диссоциации. При $62,5^{\circ}\text{C}$ оба кинетических режима схемы (2) уже экспериментально неразличимы, а сами кинетические кривые термоинактивации спрямляются в координатах уравнения первого порядка, что дает возможность определить из экспериментальных результатов эффективные константы скорости термоинактивации. Но здесь следует иметь в виду, что тангенс угла наклона начального участка кинетической кривой 3 на рис. 3 характеризует только процесс диссоциации, а не денатурации, хотя в некоторых случаях наблюдается обратное явление и для установления характера кривой необходимы дополнительные исследования (гель-электрофорез) [5].

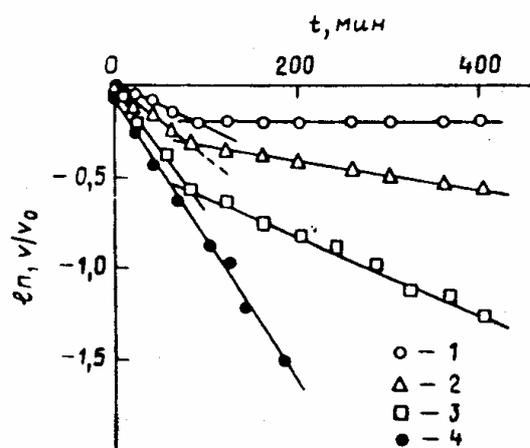


Рис. 3. Кинетика термоинактивации почечной ацилазы I при pH 7,2 и температурах: 55°C (1); 57,5°C (2); 60°C (3) и 62,5°C (4).

Таким образом, весьма характерная зависимость вида кинетических кривых диссоциативной термоинактивации фермента по двустадийному механизму при $[E]_0 = \text{const}$ от температуры объясняется наложением ряда факторов: различием температурных коэффициентов процессов диссоциации и денатурации и резким увеличением с ростом температуры величины $K_{\text{дисс}}$. Отсюда следует, что поиск путей стабилизации олигомерного белка сосредотачивается на задаче сохранения интактности его четвертичной структуры прежде всего путем подавления первичных обратимых стадий инактивации.

Положение точек излома и наклоны кривых в координатах кинетического уравнения первого порядка позволяют определить три элементарные константы кинетической схемы (2). Этими константами являются либо непосредственно константы скорости k_1 , k_{-1} и k_d , либо две константы скорости и одна константа равновесия: k_1 , $K_{\text{дисс}}$, k_d , где $K_{\text{дисс}} = k_1 / k_{-1}$ [5].

Был развит ряд приближений, позволяющих достаточно точно описать процесс инактивации, идентифицировать механизм и получить его кинетические характеристики. В работе [3] получено соотношение, позволяющее вычислить k_1 с высокой точностью и оценить k_{-1} по начальному ходу кинетической кривой инактивации. Для случая, когда в начальный момент времени весь белок находится в активной форме (E_2), оно имеет вид:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{v}{v_0} = -k_1 + \frac{4}{3} k_{-1} k_1^2 E_0 t^2 \quad (t < \tau).$$

Здесь v - скорость контрольной каталитической реакции (в условиях субстратного насыщения) в момент времени t (до точки излома, т.е. при $t < \tau$), а v_0 - ее значение в начальный момент времени, $[E]_0$ - начальная концентрация белка.

Однако практическое использование этого соотношения для процессов инактивации ферментов затруднено тем, что оно связано с оценкой нелинейности графика зависимости $\ln v$ от t , а это, как правило, осуществить невозможно. Поэтому в работах О.М. Полтарака и Е.С. Чухрай [3,5,7] по инактивации олигомерных ферментов используется более простое приближенное соотношение для того же случая обратимой диссоциации димерного белка. Оно имеет вид:

$$2\left(\frac{v}{v_0}\right) - \frac{1}{2}\left(\frac{v}{v_0}\right)^2 = \frac{3}{2} - k_1 t$$

Значение константы скорости диссоциации k_1 можно найти из зависимости функции, представленной левой частью этого уравнения от времени с погрешностью, обычно не превышающей 5-10%. Однако при этом не удастся найти k_{-1} . Поэтому для описания процесса диссоциативной термоинактивации приходится использовать параметры k_1 , $K_{\text{дисс}}$ и k_d .

Вычисление константы диссоциации $K_{\text{дисс}}$ производится достаточно просто, если использовать координаты точки «излома», так как в момент времени $t = \tau$ при $k_1 > k_d$ практически достигается квазиравновесное состояние диссоциации E_2 , которое сравнительно медленно смещается в сторону диссоциации за счет образования мономерного белка ($E_{\text{ден}}$), в условиях кинетического эксперимента, уже не способного к образованию активной димерной формы.

$$K_{\text{дисс}} = 4E_0 \frac{(v_0 - v_\tau)^2}{v_0 v_\tau},$$

где v_τ - скорость реакции (активность фермента) при времени излома τ . Это соотношение удастся использовать только при $k_d < k_1$, т.е. при не слишком высоких температурах.

Значение константы скорости инактивации k_d удобно определять при условии, когда процесс диссоциации практически закончился, при $t > \tau$. В этих условиях справедливы уравнения:

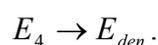
$$\frac{-d \ln E_2}{dt} = k_{эфф};$$

$$k_d = \frac{k_{эфф} (v_0 + v_\tau)}{2(v_0 - v_\tau)},$$

где $k_{эфф}$ – эффективная константа скорости, определяемая по наклону прямой при $t > \tau$ в координатах уравнения первого порядка $\left\{ \ln \frac{v}{v_0}; t \right\}$.

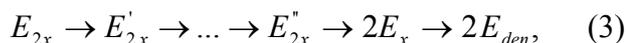
Тем самым можно считать завершенным кинетический анализ диссоциативной инактивации по схеме (2): все три параметра задачи могут быть определены экспериментально, если опытные данные получены для температурного интервала, отвечающего экспериментально наблюдаемому процессу диссоциации олигомера, и в области концентраций белка, соизмеримых с величиной $K_{дисс}$ [5].

Вполне естественно, что не все олигомеры обладают каталитической активностью. Так, например, авторы работы [6], исследовавшие процесс термоинактивации β -галактозидазы из *Penicillium canescens*, фермента, имеющего сложную четвертичную структуру, пришли к выводу, что каталитической активностью обладают димеры. Мономеры, тетрамеры и более крупные агрегаты неактивны. Использование электрофореза при исследовании β -галактозидазы из *Penicillium canescens* позволило выделить два активных тетрамера с массами 430 кДа и два активных димера, также с одинаковыми массами по 221 кДа [2]. В нативном ферменте содержится лишь один тетрамер и небольшие количества одного из димеров. Два других олигомера появляются в образце в процессе термоинактивации при 60⁰С. Проведенное исследование показало, что в зависимости от температуры реализуются различные механизмы термоинактивации β -галактозидазы из *Penicillium canescens* [2,7]. Так при температурах, превышающих 65⁰С, происходит необратимая термоинактивация четвертичной структуры – денатурация:



Значительно более информативными оказались исследования процессов термоинактивации при более низких температурах: 55-60⁰С. В данном температурном интервале инактивация β -галактозидазы из *Penicillium canescens* происходит по диссоциативному механизму, включающему образование

нескольких промежуточных форм фермента. Схематически этот процесс можно представить следующим образом:



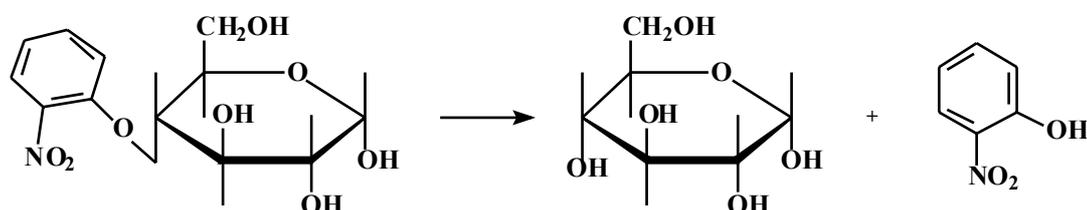
где E_{2x} – стабильный тетрамер, E_{2x}' и E_{2x}'' – лабильные тетрамеры, E_x – промежуточная активная форма (димер или мономер), E_{den} – неактивная денатурированная форма фермента. При повышении температуры ($60,5^{\circ}\text{C}$) отдельные стадии схемы (3) становятся кинетически неразличимыми, а сами кинетические кривые термоинактивации спрямляются в координатах уравнения первого порядка, что дает возможность определить из экспериментальных результатов эффективные константы скорости термоинактивации, не имеющие определенного значения и характеризующие только период полураспада исходного белка в данных условиях. Схема (3) процесса диссоциативной термоинактивации β -галактозидазы из *Penicillium canescens* включает образование промежуточных форм фермента, не сопровождающихся потерей активности, что приводит к появлению на экспериментальных кинетических кривых процесса индукционных участков.

Поскольку оба изофермента - β -галактозидаза из *Penicillium canescens* и β -галактозидаза из *Escherichia coli* – являются тетрамерами, имеют сходное строение активного центра, то термоинактивация β -галактозидазы из *E. coli* будет также происходить по сходному диссоциативному механизму.

III. Экспериментальная часть.

III.1. Определение активности фермента.

В работе исследованна β - галактозидаза (КФ 3.3.31.23) из *Escherichia coli* фирмы SIGMA. Препарат содержит 77 % белка. Активность фермента определяли по реакции гидролиза о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, произведенного фирмой СЕМАРОЛ, в трис-НСl буфере при рН 7,5 и температуре 20⁰С.



Продуктом реакции является о-нитрофенол, который определяли спектрофотометрически при $\lambda=420$ нм на фотоэлектрокалориметре КФК-2МП в кювете с толщиной 0,5 см.

На рис. 4 приведена кинетическая кривая накопления о-нитрофенола при проведении реакции гидролиза. За меру активности фермента принимали скорость реакции на начальном участке кинетической кривой.

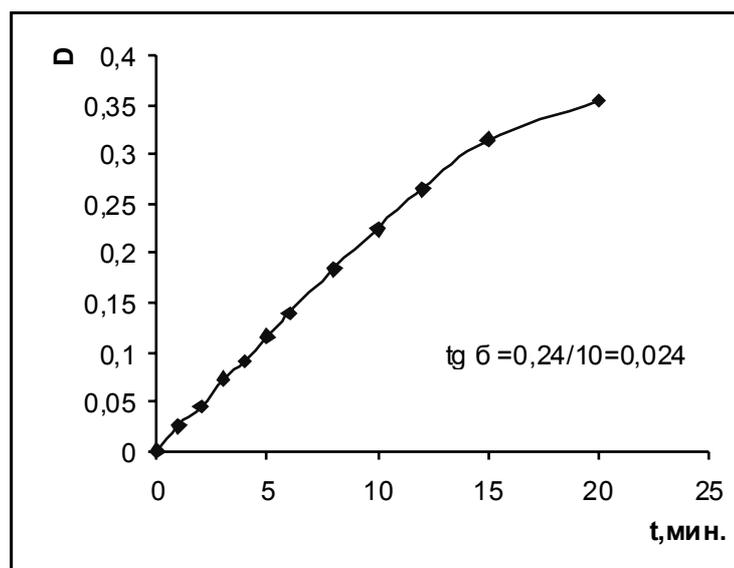


рис.4 Определение начальной скорости по линейному участку кинетической кривой.

III.2. Определение константы Михаэлиса.

Для определения параметра K_M использовали линеаризацию уравнения Михаэлиса-Ментен

$$V_0 = V_m \cdot [S]_0 / (K_m + [S]_0)$$

способом Лайнуивера-Берка, т.е. в координатах $(1/V_0, 1/[S]_0)$. Константу K_M можно определить по отрезку, отсекаемому прямой на оси абсцисс.

Для определения K_M готовили растворы фермента в 0,1 М буфере трис(гидроксиметил)аминометана pH=7,5 и определяли начальные скорости гидролиза о-нитрофенил-β-D-галактопиранозиды спектрофотометрическим методом при температуре 20°C и различных концентрациях субстрата.

Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Определение K_M

концентрация субстрата $M \cdot 10^{-4}$	$V \cdot 10^3$ о.е./мин	V мкмоль/мин	$(1/S) \cdot 10^4$	$1/V$ (мкмоль) $^{-1} \cdot 10^{-3}$
0.5	2	125.2	2	8
1.0	4	250.4	1	4
1.5	5	313	0.67	3.2
1.5	6	375.6	0.67	2.7
2.0	7	438.2	0.5	2.3
3.0	8	500.8	0.33	2
3.0	9	563.4	0.33	1.8
4.0	11	688.6	0.25	1.5
5.0	13	813.8	0.2	1.2
6.0	20	1252	0.17	0.8
10.0	28	1752.8	0.1	0.57

коэффициент для пересчета скорости из о.е./мин в мкмоль/мин равен 1.565

содержание фермента в кювете 0.025 мг

По результатам построен график (рис. 5) :

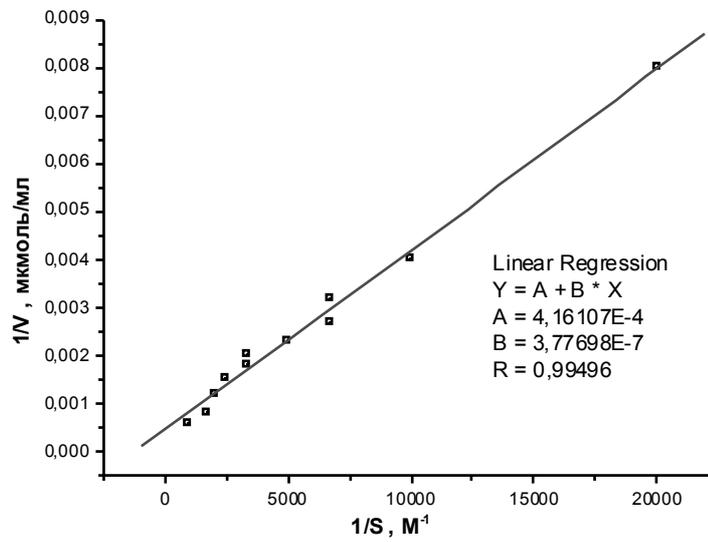


Рис. 5. К определению K_m

$$-1/K_m = 1101.69$$

$$K_m = 9.08 \cdot 10^{-4}$$

$$1/V_{\max} = 0.33 \cdot 10^{-3}$$

$$V_{\max} = 3030 \text{ мкмоль/мин}$$

III.3. Проведение термоинактивации.

Для изучения влияния температуры на стабильность β -галактозидазы из *Kluyveromyces Fragilis* готовили растворы фермента одинаковой концентрации в 0,1 М буфере трис(гидроксиметил)аминометана рН=7,5. Термоинактивацию проводили термостатированием при температурах 25-42⁰С, периодически отбирая пробы (0,05-0,2 мл) для определения активности. Активность определяли по начальной скорости гидролиза о-нитрофенил- β -D-галактопиранозиды спектрофотометрическим методом при нужной температуре и насыщающей концентрации субстрата, затем рассчитывали начальные скорости реакций. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Экспериментальные данные по термоинактивации (β - галактозидаза *Kluyveromyces Fragilis*)

Температура 25 ⁰ С Концентрация фермента 0.8 мг/мл	Время, мин	V*10 ³ о.е./мин	V/V ₀	LnV/V ₀
	0	13.2	1	-
	30	13.4	1.0152	-
	60	12.8	0.9697	-
	120	13.0	0.9848	-
	180	13.2	1	-
	240	12.9	0.9773	-
	300	13.3	1.0076	-
Температура 30 ⁰ С Концентрация фермента 1.0 мг/мл (1*10 ⁻⁵ М)	0	17.0	1	0
	60	17.2	1.0118	0.0117
	90	17.0	1	0
	120	16.8	0.9882	-0.0118
	150	16.1	0.9470	-0.544
	130	13.9	0.8176	-0.2013
	210	12.0	0.7059	-0.3484
	240	11.1	0.6529	-0.4263

	270	10.2	0.6000	-0.5108
	300	9.1	0.5353	-0.6249

Температура 35 °С Концентрация фермента 0.8 мг/мл	0	32.0	1	0
	15	32.0	1	0
	30	28.2	0.8813	-0.1264
	45	25.1	0.7844	-0.2429
	60	24.0	0.7500	-0.2877
	75	22.9	0.7156	-0.3346
	90	22.0	0.6875	-0.3747
	105	21.0	0.6563	-0.4212
	120	19.8	0.6188	-0.4800
	150	17.0	0.5313	-0.6325
	180	15.2	0.475	-0.7444

Температура 40 °С Концентрация фермента 0.4 мг/мл	0	7.1	1	0
	15	5.5	0.7746	-0.2553
	30	3.6	0.5070	-0.6792
	45	2.5	0.3521	-1.0438
	60	1.9	0.2676	-1.3182
	75	1.5	0.2113	-1.5546
	90	1.0	0.1408	-1.9600
	105	0.8	0.1127	-2.1832

Температура 42 °С Концентрация фермента 0.4 мг/мл	0	48.2	1	0
	15	32.0	0.6639	-0.4096
	30	19.1	0.3963	-0.9257
	45	11.2	0.2324	-1.4594
	60	8.2	0.1701	-1.7712

По данным таблицы 4 построены графики зависимости V/V_0 от t и $\ln(V/V_0)$ от t :

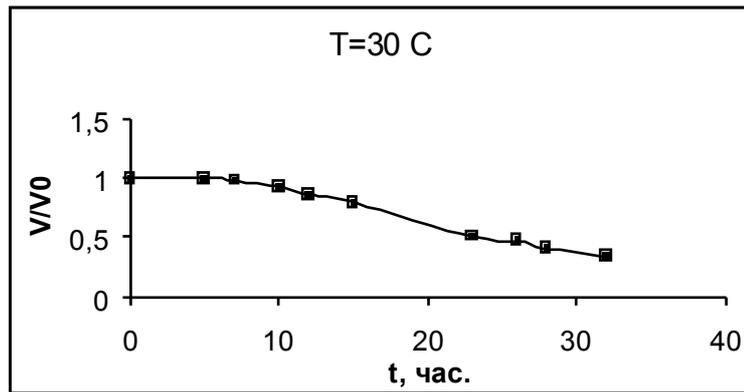


рис.6 График зависимости V/V_0 от t при 30^0C

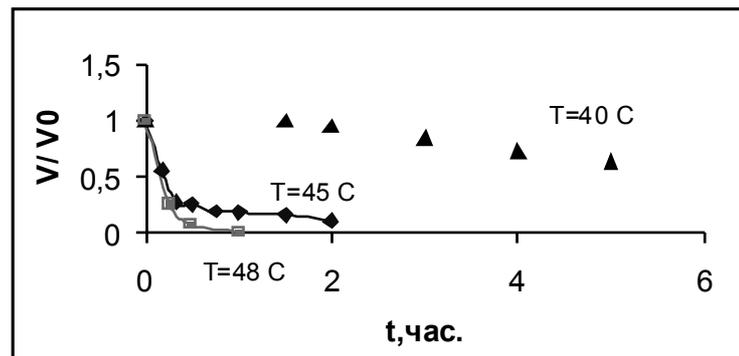


рис.7 График зависимости относительной скорости V/V_0 от времени при $40, 45$ и 48^0C

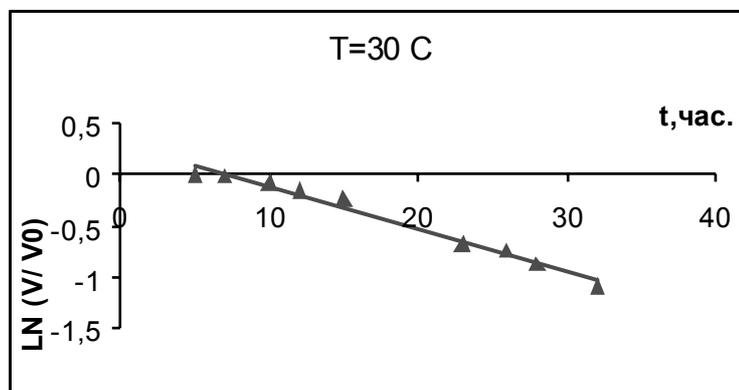


рис.8 График зависимости логарифма относительной скорости $\ln(V/V_0)$ от времени при 30^0C

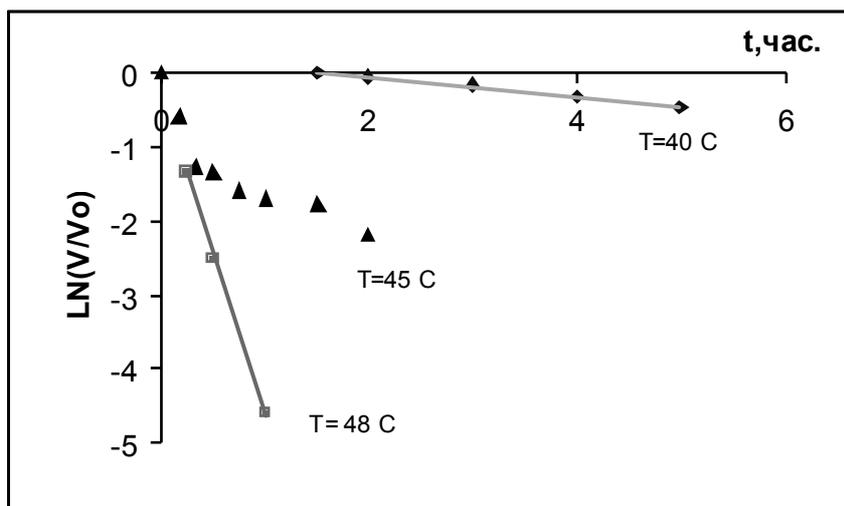


рис.9 График зависимости логарифма относительной скорости $\ln(V/V_0)$ от времени при 40 ,45 и 48⁰С

III.4. Расчет констант скоростей.

Для определения эффективной константы скорости денатурации $k_{ден.}$ и константы диссоциации $k_{дисс}$ строили кинетические кривые термоинактивации в координатах $\ln v/v_0$ от t , где v_0 – скорость ферментативной реакции при $t=0$ (рис. 9,10). Проводили касательные к линейным участкам кинетической кривой, по пересечению которых определяли точку излома при $t=\tau$. Затем по тангенсам углов наклона касательных определяли $k_{эфф}$ (рис. 10). Графически определяли значение $\ln v/v_0$ при $t=\tau$, из него вычисляли v_{τ}/v_0 , которую подставляли в формулы для расчета константы скорости денатурации и константы диссоциации:

$$k_{ден} = [k_{эфф}(1+V_{\tau}/V_0)]/[2(1-V_{\tau}/V_0)]$$

$$K_{дисс} = [4E_0 (1-V_{\tau}/V_0)]/(V_{\tau}/V_0)$$

Результаты представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3.

Температура ⁰ С	$\ln (V/V_0)$	время, сек	$k = \text{tga } c^{-1}$
30	0.499	9000	$5.5 \cdot 10^{-5}$

42	1.7712	3600	$4.9 \cdot 10^{-4}$
----	--------	------	---------------------

Таблица 4.

E_0 мг/мл	$\ln(V/V_0)$	t, сек	$k = tga c^{-1}$	V_r/V_0	Кдис М	к ден.	T °С
0.8	0.1264	900	$k_1=1.4 \cdot 10^{-4}$	0.7844	$1.9 \cdot 10^{-6}$	$2.1 \cdot 10^{-4}$	35
	0.1783	3600	$k_2=5 \cdot 10^{-5}$				
0.4	1.0438	2700	$k_1=3.9 \cdot 10^{-4}$	0.3521	$1.9 \cdot 10^{-5}$	$3.34 \cdot 10^{-4}$	40
	1.1394	3600	$k_2=3.2 \cdot 10^{-4}$				

$$K_{\text{дис}} = [4E_0 (1-V_r/V_0)]/(V_r/V_0)$$

$$k_{\text{ден}} = [k_{\text{эфф}}(1+V_r/V_0)]/[2(1-V_r/V_0)]$$

III.5. Расчет числа стадий, не сопровождающихся потерей активности.

Моделирование процесса инактивации на ЭВМ позволило предложить эмпирическую формулу для расчета числа стадий n:

$$n = (0,13+\delta) / (0,13-0,05\delta),$$

где δ – безразмерная величина, определяемая графически по отрезку, отсекаемому на оси v/v_0 касательной к кривой термоинактивации в точке перегиба. По графикам (рис. 7, 8) было определено, что

$$\delta = 0,254$$

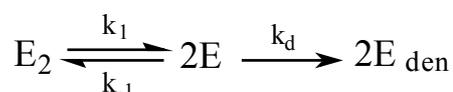
$$n = (0,13+0,254)/(0,13+0,05 \cdot 0,254) = 3,33$$

$$n \approx 3.$$

IV. Обсуждение результатов.

Кинетические параметры процесса термоинактивации.

Для определения кинетических параметров процесса экспериментальные кинетические кривые обрабатывались в координатах уравнения первого порядка. Полученные результаты приведены на рис. 8,9. Как видно из рис.9, кинетическая кривая в координатах $\ln V/V_0 - t$ при $T=35^{\circ}\text{C}$ и $T= 40^{\circ}\text{C}$ имеет точку излома. Эту зависимость обрабатывали в рамках кинетической схемы диссоциативной термоинактивации (см. литературный обзор):



Из тангенса угла наклона начального участка определяли константу скорости диссоциации димера (k_1), из тангенса угла наклона второго участка кинетической кривой определяли эффективную константу скорости инактивации ($k_{\text{эфф}}$). Из значения $k_{\text{эфф}}$ и координаты точки излома на кинетической кривой определяли константу скорости денатурации (k_d). В работах О.М.Полторака и Е.С.Чухрай было показано, что k_d и $k_{\text{эфф}}$ связаны соотношением:

$$\frac{-d \ln E_2}{dt} = k_{\text{эфф}};$$

$$k_d = \frac{k_{\text{эфф}}(v_0 + v_\tau)}{2(v_0 - v_\tau)},$$

Полученные экспериментальные результаты позволили также определить константу равновесия диссоциации димера. Для расчета использовали уравнение

$$K_{\text{дисс}} = 4E_0 \frac{(v_0 - v_\tau)^2}{v_0 v_\tau},$$

Результаты расчета приведены в таблице 5. Эффективная константа скорости инактивации при $T=30^\circ\text{C}$ составляет $5.5 \cdot 10^{-5}$, при повышении температуры она возрастает, составляя при 42°C $4.5 \cdot 10^{-4}$. При $T=35^\circ\text{C}$ и $T=40^\circ\text{C}$ кроме того определена k_d , составляющая $1.9 \cdot 10^{-6}$ и $1.9 \cdot 10^{-5}$ соответственно.

Таблица 5. Рассчитанные кинетические константы термоинактивации:

$T, ^\circ\text{C}$	$k_{\text{эфф1}}, \text{c}^{-1}$	$k_{\text{эфф2}}, \text{c}^{-1}$	$k_{\text{дисс}}, \text{M}$	$k_{\text{день}}, \text{c}^{-1}$
30	$5.5 \cdot 10^{-5}$			
35	$1.4 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1.9 \cdot 10^{-6}$	$2.1 \cdot 10^{-4}$
40	$3.9 \cdot 10^{-4}$	$3.2 \cdot 10^{-4}$	$1.9 \cdot 10^{-5}$	$3.3 \cdot 10^{-4}$
42	$4.5 \cdot 10^{-4}$			

Из кинетических кривых при температурах 30 и 35°C с начальным линейным участком определено число минимальных стадий процесса, предшествующее потере активности (рис.6,7). В точке перегиба кинетической кривой проводили касательную. Величина отрезка δ , отсекаемого от оси ординат связана с n (минимальное число стадий процесса без потери активности) следующим соотношением:

$$n = (0,13 + \delta) / (0,13 - 0,05\delta)$$

В условиях наших экспериментов n оказалась равной двум.

Константа Михаэлиса и максимальная скорость.

Схема Михаэлиса-Ментен применима для β - галактозидазы из *Kluyveromyces Fragilis* в среде трис-буфера. ($K_m=1 \cdot 10^{-3}$, $V_{max}=3030$ мкмоль/мин).
Подробно определение параметров уравнения Михаэлиса-Ментен описано в экспериментальной части.

Определение энергии активации.

Для определения энергии активации, используя полученные значения $k_{эфф}$ строили график в координатах уравнения Аррениуса $\ln k = f(1/T)$.

Таблица 6.

T °C	30	35	40	42
k	$5.5 \cdot 10^{-5}$	$1.4 \cdot 10^{-4}$	$3.9 \cdot 10^{-4}$	$4.9 \cdot 10^{-4}$
1/T	0.0333	0.02857	0.025	0.02381
ln k	-9.81	-8.874	-7.849	-7.62

Тангенс угла наклона этого графика позволил найти энергию активации, равную 120 кДж/моль.

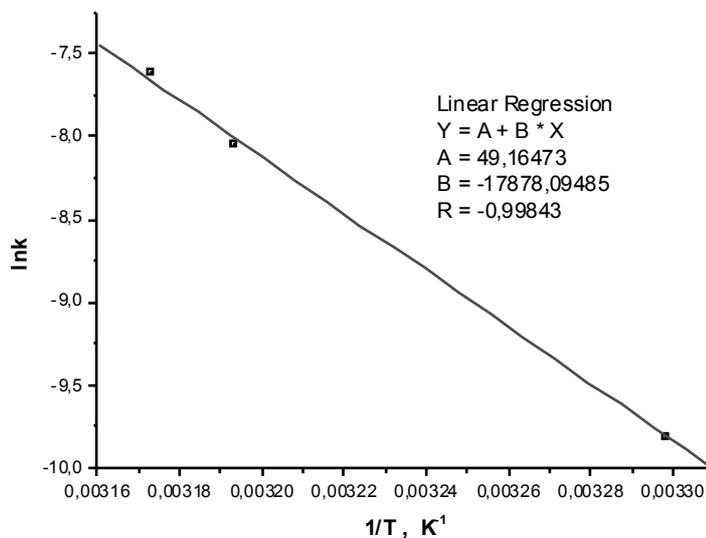


рис.10 К расчету энергии активации.

Проведенное исследование показало, что инактивация дрожжевой β -галактозидазы в условиях нашего эксперимента (трис-буфер, присутствие ионов магния, интервал температур 25-42⁰C, pH=7,5) происходит по диссоциативному механизму. В указанных условиях кинетически разделимы стадии диссоциации димера и стадии денатурации мономера.

V. Выводы.

1. Изучена термоинактивация β -галактозидазы из *Kluyveromyces Fragilis* при температурах 30, 35, 40 и 42⁰С в оптимуме рН стабильности и активности (рН=7,5). Показано, что в указанных условиях термоинактивация происходит по диссоциативному механизму.
2. Показано, что на кинетических кривых термоинактивации при 30 и 35⁰С имеется индукционный период. Обработка этих кинетических кривых позволяет определить число стадий (n), не сопровождающихся потерей активности (n=2).
3. При температуре 35 и 40⁰С кинетически различимы две стадии процесса: обратимая диссоциация и необратимая денатурация. Проведен расчет кинетических параметров: $k_{\text{дисс}}$, $k_{\text{ден}}$, $k_{\text{эфф}}^1$ и $k_{\text{эфф}}^2$.

VI. Список литературы.

1. Атякшева Л.Ф., Чухрай Е.С., Полторак О.М.// Журнал физической химии. 1997. Т.71. №5. С.926-930.
2. Полторак О.М., Чухрай Е.С.// Итоги науки и техники. Биотехнол. М., 1986. Т.5. С.50-86.
3. [A. Santos, M. Ladero, F. Garcia-Ochoa //Enzyme Microb. Technol. 1998. V. 22. P. 558-567.]
4. Варфоломеев С. Д., Березин И. В. Кинетические закономерности ферментативных реакций в нестационарных режимах. М., МГУ. 1979. С.79-84.
5. Полторак О.М., Чухрай Е.С., Торшин И.Ю.// Биохимия. 1998. Т.63. Вып.3. С.360-369.
6. Edvards R.A., Jacobson A.L., Huber R.E.// *Biochem.* 1990. V.29. P. 11001.*'
7. Ташлицкий В.Н., Шишкин А.А., Атякшева Л.Ф., Полторак О.М.// Журнал физической химии. 1991. Т.65. С.2568.