

Изучение термостабильности рекомбинантных формиатдегидрогеназ из сои *Glycine max*, экспрессированных в клетках *E.coli*

Алексеева А.А.¹, Тишков В.И.^{1,2}

студент 4 курса

¹Химический факультет МГУ им.М.В.Ломоносова, 119992 Москва

²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва

E-mail: nalexejeva@yandex.ru

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) является одним из наиболее широко распространенных ферментов в природе. ФДГ играет важную роль как в обеспечении энергией метилотрофных микроорганизмов, так и в ответе на стрессовые воздействия в растениях.

Этот фермент в большинстве случаев представляет собой гомодимер, состоящий из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит по одному кофермент-связывающему и одному каталитическому домену

В нашей лаборатории впервые удалось экспрессировать ФДГ из растений в клетках *E.coli* в активной и растворимой форме. Ранее все подобные эксперименты заканчивались образованием телец включения. Рекомбинантная ФДГ из сои *Glycine max* была выделена в гомогенном виде и были изучены ее основные свойства – кинетические параметры и термостабильность.

Изучение термостабильности ФДГ проводили путем анализа зависимости остаточной активности фермента от времени при рН 7,0 и различных значениях температуры и концентрации буфера. Значения температур варьировали в диапазоне 46 – 54 °С, а концентрацию фосфатного буфера – от 0,01 до 1,25 М. Было показано, что при всех исследованных условиях процесс термоинактивации протекает в соответствии с кинетикой реакций первого порядка по мономолекулярному механизму. Концентрация фосфатного буфера оказывает большое влияние на процесс термоинактивации рекомбинантной ФДГ. При переходе от относительно низких концентраций фосфата (0,01-0,02 М) к буферам высокой концентрации (1,0 – 1,25 М) происходит стабилизация фермента в 10 раз.

Для двух концентраций фосфатного буфера, при которых скорость инактивации фермента при одной температуре была максимальной и минимальной (0,1 и 1,0 М соответственно) были изучены зависимости наблюдаемых констант скорости инактивации от температуры. Данные по температурным зависимостям были обработаны в координатах $\ln(k_i/T) - 1/T$, К⁻¹ и представляли собой прямую с тангенсом угла наклона, равным $\Delta H^\ddagger/R$.

Мономолекулярный характер реакции позволяет использовать теорию активированного комплекса для расчета активационных параметров ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger процесса инактивации. Полученные значения ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger свидетельствует, что инактивация ФДГ при высоких температурах происходит вследствие разворачивания белковой глобулы.

Нами также было изучено влияние субстратов на скорость термоинактивации ФДГ из сои. Оказалось, что добавление субстратов в раствор стабилизирует фермент.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ 05-04-49073