Стабильность ферментов и белков [[[1]](#endnote-2)] вне клетки является важным вопросом в области биотехнологии. Важными элементами в решении этого вопроса является структурная (конформационная) и функциональная стабильность белковой молекулы. Эти оба типа стабильности важны, т.к влияют на способность ферментов катализировать химические реакции. К структурной (конформационной) стабильности фермента относится сохранение всех пространственных структур фермента, которые важны для его каталитических способностей. Под функциональной стабильностью понимается сохранение каталитической активности ферментов в процессе, т. е. при определенных, заданных условиях его использования. Было выдвинуто очень много теоретических схем для описания ферментативной активности и инактивационных процессов при разных условия среды. Но не подверждение экспериментально этих схем передало вопрос стабильности белков в руки белкового инженеринга, который путем прямых мутаций, дизайна среды или других стратегий пытается решить эту проблему.

Ферменты – глобулярные белки, содержащие [[[2]](#endnote-3)] как регулярные участки (α-спирали и β-листы), так и нерегулярные области типа полимерных петель. На Рис.1.1 приведена структура бактериальной люциферазы. Видно, что это весьма сложное молекулярное образование, которое удерживается в структурированном состоянии действием каких-то внутренних сил. Какова природа этих сил? Что заставляет большую совокупность атомов взаимодействовать друг с другом и формировать уникальную структуру? Очевидно [[[3]](#endnote-4)], что эти же силы и взаимодействия проявляю себя в элементарных актах катализа, определяя способность субстрата, входить в активный центр и претерпевать химические изменения.

Конформационная гибкость белков должна обеспечивать молекулярную связь между их стабильностью и каталитической активностью. Конформационная жесткость и гибкость белков определяются внутримолекулярными взаимодействиями. Ниже приведен ряд наиболее значимых по вкладу в стабильность белков взаимодействий.

* Ковалентные связи.

Основой белка является полимерная полипептидная цепь, в которой отдельные аминокислоты связаны ковалентной амидной связью. Характерные длины связей: С-С, N-H, O-H 0,1 нм; С=О, С=N. С=С 0,12 нм; С-С 0,15 нм; S-S.0,18 нм [[[4]](#endnote-5)]. Амидная связь в воде термодинамически неустойчива, и любой белок в водном растворе в состоянии равновесия должен был бы представлять собой смесь свободных аминокислот. Однако процесс гидролиза в нейтральных средах протекает исключительно медленно, что обеспечивает кинетическую стабильность белка.

* Электростатические взаимодействия.

Природа электростатических взаимодействий определяется кулоновским притяжением противоположно заряженных групп или атомов и отталкивание одноименно заряженных. Энергия электростатического взаимодействия заряженных частиц определяется законом Кулона

U (r) = -z1z2e2/ εr (1)

Энергия взаимодействия заряженных частиц может быть весьма значительна. Однако в водном растворе особенно в растворах электролитов кулоновское взаимодействие существенно ослабляется. Молекулы воды имеют большой дипольный момент и поэтому способны, взаимодействуя с заряженными частицами, частично компенсировать их взаимное влияние.

Из изложенного выше следует два важных для практики вывода:

1. в органических растворителях или в микрофазе, близкой по характеристикам к гидрофобному аполярному органическому растворителю, сила электростатического взаимодействия заряженных групп возрастает по сравнению с водой.
2. введение в систему дополнительных заряженных ионов приводит к ослаблению к ослаблению электростатического взаимодействия в силу экранирования зарядов введенными ионами.
* Водородная связь

Эта связь чрезвычайно важна в биохимических системах, в общем, и в ферментативном катализе в частности.

Исследование показало, что димеризация обусловлена дипольным характером связи О-Н. В свою очередь дипольный характер связи определяется разными электроотрицательностями атомов, образующих связь. Электроотрицательность характеризует способность атома поляризовать ковалентные связи. У кислорода электроотрицательность 3,5, а водорода 2,1. Это приводит к тому, что на атоме кислорода связи О-Н локализуется некоторый избыточный отрицательный заряд, на атоме водорода – некоторый избыточный положительный заряд.

Энергия водородной связи в димере алифатических кислот равна 28,4 ± 0,6 кДж/ моль.

Водородные связи формируют вторичную структуру белка. Образование фермент-субстратного комплексов и «узнавание» молекул субстрата активным центром происходит в большинстве случаев с участием водородных связей.

* Гидрофобные взаимодействия.

Структура диполь-дипольных взаимодействий и водородных связей между молекулами нарушается, если вода находится в контакте с неполярной группой, например с углеводородным радикалом. Отсутствие компенсирующих электростатических взаимодействий существенно повышает энергию системы. Система ищет пути стабилизации и находит их, вытесняя неполярные группы друг к другу, обеспечивая их ванн-дер-ваальсовыми взаимодействиями, ограничивая число неблагоприятных контактов с диполями воды. Система стремиться уменьшить число такого рода молекул. Это возможно за счет объединения неполярных молекул в комплекс, в результате поверхность взаимодействия станет меньше. Связи, объединяющие неполярные молекулы в водном растворе, получили название гидрофобных.

Гидрофобные взаимодействия играют важную роль в белковых системах. В глобулярных белках [[[5]](#endnote-6)] гидрофобные взаимодействия часто формируют ядро белковой молекулы. Важную роль гидрофобные взаимодействия выполняют при «узнавании» субстратов или ингибиторов активными центрами. Гидрофобные фрагменты субстрата взаимодействуют с гидрофобными участками активного центра, образуя специфические комплексы, ориентирующие реакционный центр субстрата относительно каталитических групп.

Рассмотренные выше молекулярные силы (электростатические, гидрофобные, водородные) характеризуются следующими особенностями.

1. Это слабые взаимодействия, обеспечивающие относительно небольшой выигрыш энергии (свободная энергия образования этих связей составляет 2-25 кДж/моль). Однако в любой белковой молекуле таких связей довольно много. Практически каждая аминокислота полипептидной цепи участвует в образовании одной или двух связей. Это и определяет высокую энергию внутрибелковых связей.

2. Взаимодействия с участием электростатических, водородных и гидрофобных связей протекают кинетически быстро. Скорости образования и распада связей определяются скоростями переориентацией диполей и соизмеримы со скоростями движения молекул. Данное свойство позволяет биологическим системам реализовывать многостадийные процессы с перемещением больших групп ядер, разыгрывая различные сценарии взаимодействий и осуществляя процессы по маршруту с наименьшими кинетическими и термодинамическими барьерами.

Общая инактивационая модель [1] для одноцепочечного белка или фермента включается в себя денатурацию (разворачивание) третичной структуры полипептида (N). Денатурированный белок (U) может повторно скрутиться до начального (неденатурированого) состояния или претерпеть некоторые дальнейшие изменения которые приведут к полной инактивации (I).

N ↔ U → I

Конформационная стабильность свернутого (нативного) белка описывается N ↔ U равновесием, которое можно обозначить, как Tm , которая обозначает температуру, при которой происходит денатурация 50% белка. В большинстве случаях, можно различать  энергию Гиббса (G) при денатурации белка, но для ее расчета, необходимы чтобы белок соответствовал одному из двух состояний, т.е. белок должен быть либо в полностью сложенном (нативном) состоянии, либо полностью в денатурированном (развернутом) состоянии, без существующих промежуточных форм. Биотехнологи, однако, как правило,заинтересованы в скорости перехода N → I состояния. Обычно скорость перехода N → I состояния описывается с помощью экспоненциального закона:

At / A0 = exp (-kt), где

 At и A0 активность фермента в момент времени t и 0 соответственно, k – константа скорость первого порядка.

 *Влияние огр. Растворителей на кинетику ферментативных реакций.*

 Вода является одной из самых важных молекул [[[6]](#endnote-7)] для зарождения жизни. Только в присутствии воды может существовать жизнь. Все органические молекулы, которые необходимы для жизни, и ферменты проявляют свою каталитическую активность в присутствии воды. Ферменты весьма специфические катализаторы, они обычно функционируют при определённых внешних условиях. Зачастую, это свойство ферментов- функционирование при определенных внешних условиях и в водных средах переходит в недостаток. Зачастую субстраты ферментативной реакции водно-нерастваримые, такие ферментативные реакции лучше всего проводить в присутствии органических растворителей или в органическом растворителе. Поэтому, замена воды [[[7]](#endnote-8)] на органические растворы обеспечит ферментативную реакцию огромным количеством преимуществ по сравнению с водной средой:

*Достоинства* [[[8]](#endnote-9)]

* Увеличение растворимости гидрофобных субстратов
* Катализ широкого круга химических реакций, которые не протекают в водной среде
* Термодинамическое равновесие способствует гидролизу.
* Исключение водой-зависимых вторичных реакций.
* Изменение субстратной-, а также стерео-специфичности
* Простой способ восстановление и повторного использования фермента без иммобилизации
* Разделение границы субстратов и продуктов реакции, повышение каталитических свойств
* Повышение термостобильности в почти безводной
органическом растворителе систем.
* Ликвидация микробного загрязнения

Несмотря на перечисленные преимущества [7] использования органических растворителей в ферментативных процесса,  ферменты почти повсеместно проявляют низкую каталитическую активность в присутствии органических растворителях, зачастую, величина каталитической активности на  четыре-пять порядков ниже, чем в водных растворах.

*Недостатки* [8]

* Инактивация фермента
* Трудности и высокая стоимость биокатализаторов в ковалентно модифицируемой системе
* Ограничение массообмена в случае гетерогенных систем или вязких растворителей
* Контролирование водной активности, которая необходима для процессов конденсации реакции.

Это не удивительно, ведь подавляющее большинство ферментов функционирует в водных системах. Тем не менее, не существует вопроса о том, что ферменты могут функционировать в отсутствие объемных молекул воды [[[9]](#endnote-10)].

Ясно, что, улучшение каталитической активности фермента в присутствии органических растворителей имеет решающее значение в крупномасштабных экономически жизнеспособных биотрансформациях. К счастью, за последние два десятилетия, проделано огромное количество работ, которые начали проливать свет на проблему влияния органических растворителей и о роли воды на структуру и функцию ферментов. Действительно, в настоящее время хорошо известно, с чем связана потеря каталитической активности фермента в присутствии органических растворителей.

 *Влияние органических растворителей на структуру фермента*

* Нарушение пространственной структуры белка

Нативная структура белка состоит из сложного баланса нековалентных взаимодействий, таких как водородный и ионных связей , связей Ван-дер-Ваальса и гидрофобных взаимодействий[[[10]](#endnote-11)]. Вода, необходимых настройки и поддержания всех этих взаимодействий и связей. Отсутствие воды и наличие органического растворителя может нарушить эти силы, что приведет к разворачивания (денатурации) белка[[[11]](#endnote-12)]. В частности, полярные растворители, которые могут проникать внутрь белкавыззываю гораздо более серьёзные изменения во вторичной и третичной структурах белка, чем неполярные растворители [[[12]](#endnote-13)]. Важно отметить, что присутствие воды не является абсолютно необходимым условие дня протекания ферментативной реакции, в некоторых случаях достаточно всего несколько десятков молекул воды на белке для запуска ферментативной реакции [[[13]](#endnote-14),[[14]](#endnote-15)]. При проникновении органических растворителей  в активный центр фермента, может произойти разрушительное воздействие на каталитические способности фермента. В частности, для ферментов с высоко полярными переходными состояниями, проникновения органических растворителей снижает общую величину полярности вблизи активного центра, тем самым дестабилизируя полярные переходные состояния [[[15]](#endnote-16)]. Полярные растворители могут проникнуть глубоко в глубь белка, в то время как неполярных растворителей не имеют возможности такой возможности, т.к не могут проникнуть через полярные внешней слой белка.

* + Снижение в пространственной динамике

В дополнение к поддержанию нативной или близкой к нативной конформации белка, динамику белков (конформационную гибкость) рассматриваются на равнее с изменениями в пространственной структуре белка [[[16]](#endnote-17)]. Теоретические [[[17]](#endnote-18)] и экспериментальные исследования показали, что существует корреляция между увеличением динамики белков и повышенным содержанием воды на поверхности белка. Однако, несмотря на высокую конформационную гибкость, которая важна для ферментативного катализа в водной среду, в органических растворителях, наиболее высокая каталитическая активностью часто наблюдалась в присутствии неполярных растворителях, которые ограничивают динамику белока. Этот парадокс может быть отчасти результатом ранее описанного явления, в котором полярные растворители могут проникнуть в 3D структуры белка, и привести в результате к структурным изменениям, которые сказываются на каталитической активности фермента. Однако, нельзя исключить влияния органических растворителей на термодинамическое равновесие наблюдаемой системы.

* + Изменение термодинамического равновесия реакционной среды

Будучи катализаторами, ферменты не изменяют термодинамики реакции. Однако, растворитель может повлиять на основное состояния реагентов и продуктов, что может привести к изменению исследуемой каталитической активности. Высокая способность субстратов растворятся  в органических растворителях (это одно из ранее перечисленных преимуществ) приводит к термодинамической стабилизации основным состояний субстратов. Это, в свою очередь, уменьшает регистрируемое значение каталитической активности фермента. Показано, что переходное состояние при катализе субтилизина  в присутствии органических растворителей коррелирует  с полярностью добавляемого органического растворителя: наибольшая стабилизация переходного состояния (и, следовательно, более высокая каталитической деятельности) происходит в более полярных растворителях [[[18]](#endnote-19)].

* + Оттеснение молекул воды с поверхности белка

Как было описано ранее, наличие небольшого количество молекул воды имеет решающее значение в сохранении структуры и функции белка. Растворителей может оттеснить молекулы воды с поверхности белка, полярные растворители способны эффективнее устранять связь белока с водой по сравнению с неполярными растворителями [[[19]](#endnote-20)]. На основании этого растущего знания о влиянии органических растворителей на фермент структуры, функций и динамика и стимул для улучшения функции фермента.

На основании этих знаний о влиянии органических растворителей на структуру, функцию и динамику фермента, был достигнут значительный интерес в разработке методов для активации ферментов  в органических растворителей. Эти подходы группируются свободно на две категории: (I) инженеринг катализаторов и среды и (II) инженеринг растворителей. Первое относится к прямой манипуляции фермента (белковой инженерии) или изменения микроокружения катализатора для увеличения их ферментативной деятельности в органических растворителях. Последнее относится к добавлению малых концентраций воды [[[20]](#endnote-21)] и увеличению или уменьшению гидрофобности растворителя [[[21]](#endnote-22)] и полярности [[[22]](#endnote-23)] для получения более активного фермента.

 Исследование вторичного структурного анализа различных белков
на ИК-Фурье (Фурье-ИК) спектроскопии [[[23]](#endnote-24)] показали, что сахара защищают от изменений α-спирали и β-листы. Действительно, сахара, такие как сахароза, трегалоза, лактоза, мальтоза и инулин, уже давно используются в качестве фармацевтических добавки для сухих белков и сейчас сахара являются  важнейшими инструментами для сохранения скоропортящихся
материалов или обеспечения этих материалы более удобными для транспорт [[[24]](#endnote-25)].
Природа признал уникальные лиопротекторные свойства трегалозы потому что сахар найден в высоких концентрациях во многих организмах, которые выживают в естественных условиях в присутствии низкого содержания воды, например, обычные сухие хлебопекарныедрожжи, кисты некоторых ракообразных, многие бактерии, такие как *Salinibater* резиновых и *Dactylococcopsis salina*, и других микроорганизмов [[[25]](#endnote-26)]. Способность трегалозы и других невосстановленных сахаров защищать живые организмов в естественной обезвоженной среде рассматривается как рациональная основа для использования сахаров и других низкомолекулярных наполнителей для защиты ферментов при размещении в неестественных сухих средах в присутствии органических растворителей.

*Энергия активации. Уравнение Аррениуса*.

Зависимость скорости реакции от температуры обычно описывают уравнением Аррениуса, которое в простейшем виде можно записать как

 (1)

Поскольку А слабо зависит от температуры [[[26]](#endnote-27)], все определяет второй сомножитель – экспоненциальный: с увеличением температуры этот сомножитель быстро увеличивается, причем тем быстрее, чем больше энергия активации *Е*а. Указанная зависимость скорости реакции от температуры называется уравнением Аррениуса, оно – одно из важнейших в химической кинетике. Для приблизительной оценки влияния температуры на скорость реакции иногда используют так называемое «правило Вант-Гоффа».

Скорость химической реакции при данной температуре определяется скоростью образования активированного комплекса, которая, в свою очередь, зависит от величины энергии активации. Во многих химических реакциях в структуру активированного комплекса могут входить вещества, не являющиеся реагентами по уравнению реакции; очевидно, что в этом случае изменяется и величина энергии активации процесса. В случае наличия нескольких переходных состояний реакция будет идти в основном по пути с наименьшим активационным барьером.

Катализ – явление изменения скорости химической реакции в присутствии веществ [[[27]](#endnote-28)], состояние и количество которых после реакции остаются неизменными.

Различают положительный и отрицательный катализ (соответственно увеличение и уменьшение скорости реакции), хотя часто под термином «катализ» подразумевают только положительный катализ; отрицательный же катализ называют ингибированием.

Вещество [[[28]](#endnote-29)], входящее в структуру активированного комплекса, но не являющееся реагентом, называется катализатором. Для всех катализаторов характерны такие общие свойства, как специфичность и селективность действия.

Специфичность катализатора заключается в его способности ускорять только одну реакцию или группу однотипных реакций и не влиять на скорость других реакций. Так, например, многие переходные металлы (платина, медь, никель, железо и т.д.) являются катализаторами для процессов гидрирования; оксид алюминия катализирует реакции гидратации и т.д.

Селективност*ь* катализатора – способность ускорять одну из возможных при данных условиях параллельных реакций. Благодаря этому можно, применяя различные катализаторы, из одних и тех же исходных веществ получать различные продукты. В следующей таблице катализаторы реакций приведены слева в скобках, а реакции, которые они ускоряют - правее:

Причиной увеличения скорости реакции при положительном катализе является уменьшение энергии активации при протекании реакции с участием катализатора (Рис. 1.3.1). На этом рисунке приведено сравнение энергетических профилей реакции с катализатором и без катализатора.[17] Катализатор снижает энергию активации и направляет реакцию по другому пути, как минимум, с образованием двух переходных состояний (соответствующих двум максимумам на энергетическом профиле реакции с катализатором). Если переходные состояния характеризуются более низкой энергией активации (ЕА,к) по сравнению с реакцией в отсутствии катализатора (ЕА), то альтернативная реакция протекает с более высокой скоростью, несмотря на образование большего числа промежуточных продуктов.



**А**

**В**

*ЕА,к*

*Е****#к***

Рис.1.3.1 **-** Сравнениеэнергетических профилей реакций без катализатора (сплошная линия) и с катализатором (пунктирная линия) [17]

Утверждение о том [16], что катализатор снижает энергию активации, строго говоря, не корректно, так как реакция в присутствии катализатора не идентична исходной реакции. Это совершенно иной путь реакции, имеющий более низкий активационный барьер.

Поскольку, согласно уравнению Аррениуса (1) [15], константа скорости химической реакции находится в экспоненциальной зависимости от величины энергии активации, уменьшение последней вызывает значительное увеличение константы скорости.

Необходимо отметить, что наличие катализатора не влияет на величину изменения термодинамического потенциала (*ΔG* или *ΔF*) в результате процесса и, следовательно, никакой катализатор не может сделать возможным самопроизвольное протекание термодинамически невозможного процесса (*ΔG* или *ΔF* которого больше нуля). Катализатор не изменяет величину константы равновесия для обратимых реакций; влияние катализатора в этом случае заключается только в ускорении достижения равновесного состояния, т.е. увеличения скоростей прямой и обратной реакций.

Если реакция подчиняется уравнению Аррениуса, логарифм ее скорости (измеренной, например, в начальный момент) должен линейно зависеть от абсолютной температуры, то есть график зависимости ln*v* от 1/*Т* должен быть прямолинейным. Наклон этой прямой равен энергии активации реакции. По такому графику можно предсказать [16], какова будет скорость реакции при данной температуре или же – при какой температуре реакция будет идти с заданной скоростью.

На Рис. 1.3.2 приведено сравнение энергетических профилей некаталитического и каталитического процессов. Энергия фермент-субстратного комплекса меньше энергии свободных субстратов (реагентов) на величину энергии адсорбции субстратов на ферменте (*Еад*с). При этом [17] энергия активации ферментативного процесса (*ЕА,,ф*) меньше энергии активации неферментативного процесса (*ЕА*).



* **В**

**ЕА,ф**

**В**

**А**

**Е#ф**

**Еадс**

Рис.1.3.2 **-** Сравнение энергетических профилей не каталитического (сплошная кривая) и ферментативного (пунктир) процессов [17]

Согласно общепринятым представлениям о механизме простейших ферментативных реакций, которые были предложены Михаэлисом и Метен, субстрат *S* и фермент *Е* находятся в равновесии с очень быстро образующимся фермент-субстратным комплексом *ЕS.* Этот комплекс сравнительно медленно распадается на продукт реакции *P* и свободный фермент *Е*. Таким образом, стадия распада фермент-субстратного комплекса на продукты реакции является лимитирующей.

 (2)

Здесь *k1* – константа скорости образования фермент-субстратного комплекса, *k2* – константа скорости обратного процесса, *k3* – константа скорости распада фермент-субстратного комплекса. При этом *k3<< k1, k-2*.

Скорость реакции в целом определяется скоростью распада фермент-субстратного комплекса [17] .

Увеличение температуры не только увеличивает величину энергии активации, но является одним из основных факторов, влияющих на стабильность белковых молекул. При воздействии температурой на бактериальную люциферазу происходит изменение в ее активности. Таким образом [16], нам было важно как присутствие в среде органических растворителей, таких как глицерин и сахароза, влияют на каталитические стадии и на процесс образования фермент-субстратного комплекса

Биолюминесценция – это хемилюминесцентная реакция, в которой химическая энергия превращается в световую. Бактериальная люцифераза - флавинзависимая монооксигеназа, катализирующая окисление ливинмононуклеотида и длинноцепочечного алифатического альдегида до соответствующей жирной кислоты с излучением кванта света. Все бактериальные люциферазы проявляют биолюминесцентную активность с альдегидами, длина цепи которых от восьми до шестнадцати углеродов. Существует предположение, что сродство альдегида к люциферазе обусловлено гидрофобными взаимодействиями между каждым участком алифатической цепи альдегида и гидрофобными группами фермента. Благодаря этому с увеличением длины углеродной цепи альдегид прочнее связывается с люциферазой.[[[29]](#endnote-30)] Это обеспечивает бóльшую эффективность превращения химической энергии в световую. Однако [29,[[30]](#endnote-31)], эту гипотезу нельзя считать всеобъемлющей, поскольку не для всех люцифераз соблюдается монотонная связь параметров биолюминесцентной реакции с длиной цепи альдегида. Специфичность люцифераз к альдегидам проявляется в том, что другие алифатические длинноцепочечные соединения (кетоны, кислоты, спирты) не обнаруживают с люциферазой биолюминесцентной активности, хотя не исключено, что они реагируют с ней без излучения.

 Люциферазы [[[31]](#endnote-32)] это общее название для любого фермента, который катализирует реакцию, которая приводит к испусканию света достаточной яркой интенсивностью. Все люциферазы катализируют окислительные процессы, в которых интермедиат (или продукт) переходит в электронно-возбужденном состоянии. Свет испускается при переходе из возбужденного состояния в основное.

 Эксперименты Роберта Бойля показали, что биолюминесцентные реакции требуют воздуха. Бойль, использую воздушный насос, показал, что удаление воздуха в камере со светящимися грибами приводило к прекращению биолюминесценции. Закачка воздуха в камеру привела в возобновлению биолюминесценции. Кислород используется бактериальной люциферазой, в флавин монооксигеназной реакции. В которой, молекулярный кислород, окисляет восстановленный флавин (FMNH2),который вступает в реакцию с альдегидом и в результате получается карбоновая кислота, окисленный флавин (FMN) и испускание кванта света в сине-зеленой области:

*FMN Н2 + RCHO + O2 FMN + RCOOH + Н2О + hν*  (1)

Реакция происходит с образование нескольких промежуточных продуктов реакции (интермедиатов), что приводит к образованию *C4a-hydroxyflavin* (флавин псевдобаза) в возбужденном состоянии. Излучение света, по-видимому, происходит при конфармационных изменениях возбужденного *C4a-hydroxyflavin.*[1]

 Большое количество работ [1,3] по механизму взаимодействия субстратов и продуктов биолюминесцентной реакции с молекулой люциферазы, а также по действию различных модификаторов на ее активность позволило получить некоторую информацию о функциональной топографии люциферазной молекулы. По структуре люциферазы из четырех основных видов светящихся бактерий (*Vibrio harveyi, Рhotobacterium leiognathi, Рhotobacterium fisheri, Рhotobacterium phosphoreum*) представляют собой αβ-гетеродимер с молекулярной массой около 80000 Да (рисунок 1.1 a,b). Все бактериальные люциферазы состоят из двух неидентичных субъединиц: альфа и бета, 40-44 кДа (килодальтон) и 35-40 кДа соответственно, с 30% гомологией как между α - и β-субъединицами, так и среди люцифераз из различных видов бактерий. Предполагается, что активный центр расположен преимущественно в α-субъединице. β-субъединица также необходима для люминесцентной реакции и отвечает за термостабильность фермента и его взаимодействие с восстановленным флавином.



а)



б)

Рисунок 1.1 - Стерео представление структуры бактериальной люциферазы a) *Рhotobacterium fisheri*: б) *Vibrio harveyi.*[1]

 В настоящее время определена кристаллическая структура люциферазы *V.harveyi,* замороженной при -160 ° С в метиловом эфире полиэтиленгликоля, с разрешением 2.4Ǻ и 1.5Ǻ. Молекула люциферазы имеет вид параллелепипеда с размерами 75х45х40. Обе субъединицы [1] складываются в однодоменный (α./β)8-бочонок. Такая структура люциферазы ранее была корректно предсказана на основе структуры luxF и трехмерной модели α-субъединицы бактериальной люциферазы. α- и β - субъединицы имеют идентичную топологию. Две субъединицы связаны большой соприкасающейся поверхностью, центр которой оккупирован интересной формой параллельного 4-спирального пучка. В центре пучка – парные псевдо оси вращения, связывающие α и β-субъединицы (рисунок 1.1). Спирали [2] α2 и α3 каждой субъединицы из спирального пучка с двумя α2 спиралями, упакованы очень плотно. Спиральные оси на 6.05Å в стороне от наиболее плотной точки, и имеют перекрестный угол 30º. Оси пучков α- и β-субъединиц связаны вращением на 80º и смещением на 34º.

 Гидрофобные остатки упакованы внутри полости в обеих субъединицах. Сквозь внутренние поверхности димера проходят различные внутрисубъединичные связи. Большинство таких контактов наблюдается в параллельном 4-х спиральном бочонке. В основном, это Ван-дер-Ваальсовые взаимодействия. 22 водородные связи соединяют субъединицы люциферазы. Интересная водородная связь наблюдается между Hisα.45 и Glu88. Эти остатки есть в α- и β- субъединицах всех бактериальных люцифераз. Мутация His45 в α-субъединице *V.harveyi* приводит к существенному снижению биолюминесцентной активности. Другая водородная связь наблюдается между Argα.85 и Thrβ80, имеющимися в составе всех люцифераз. Alα.74 и Alα.75 образуют дно на входе сильно выступающей маленькой полости и более глубокого пакета в центре β-бочонка α- субъединицы. Стены этой маленькой полости включают Hisα.44 на одной стороне и Сysα.106 на другой. Мутация Hisα.44 на Ala или Asp приводит к инактивации фермента. Предполагается, что в связывании флавинмононуклеотида FMN (одного из субстратов люциферазы) участвуют следующие аминокислотные остатки: Arg107 связывает фосфатную часть FMN, Trp194 и Trp250 связывают изоаллоксазиновое кольцо. Также большое значение в связывании флавина имеет Asp113. Тем не менее, однозначного представления о связывании фермента и флавина в настоящее время нет. Активный центр люциферазы высоко гидрофобен как на участке связывания изоаллоксазинового кольца, так и на участке связывания альдегида (второго субстрата люцифераз). Однако в рассматриваемых доменах гидрофобны меньше половины аминокислот. Следовательно, эти участки имеют сложную конформацию, из них невозможно построить α-спираль или β-структуру так, чтобы получилась длинная гидрофобная щель. Известно, что модификация вторичных ОН-групп рибитила, не оказывает влияния на связывание флавина и меняет характер связывания альдегида. По-видимому , сайты связывания альдегида и рибитила расположены рядом. Как показывает конформационный анализ, рибитил в белках предпочитает вытянутую структуру, как и альдегид, что позволяет им контактировать друг с другом на протяжении 4-5 атомов углеродной цепи.

 Модификация альдегида вблизи СНО-группы лишает его способности вступать в реакцию с люциферазой. Если учесть, что изоаллоксазиновое кольцо флавина спрятано в гидрофобный карман, то и альдегидная головка должна обладать значительной гибкостью, чтобы в этот карман попасть. Поэтому введение двойной связи между атомами С2 и С3, делающее этот участок жестким, не способствует биолюминесценции. Представляется наиболее вероятным, что СНО-группа располагается над атомами С10, N1, и С2. Геометрия группы и распределение зарядов вполне допускают указанное расположение атомов. Однако [[[32]](#endnote-33)], вышеописанное представление о взаимодействии флавина и альдегида в настоящее время подвергается сомнению. Существует множество работ, в которых представлена схема люминесцентной реакции, где альдегидная головка реагирует с С4а-атомом изоаллоксазинового кольца гидропероксифлавина.

Индивидуальные субъединицы люцифераз неактивны [[[33]](#endnote-34)], но могут рекомбинировать до активной люциферазы. Присутствие металла в молекуле люциферазы, простетических групп, неаминокислотных остатков не показано.

 Бактериальная люцифераза содержит SH-групп. На α-субъединице люциферазы *V.harveyi* существует высокоактивная SH-группа, расположенная в гидрофобном участке фермента. Важность нековалентных взаимодействий инактиватора с ферментом подтверждается тем [29], что длинноцепочечные альдегиды защищали фермент от инактивации, причем степень защиты увеличивалась с увеличением длины цепи. Насыщающие концентрации FMN полностью защищают люциферазу от инактивации иодоцетамидом. Это позволяет предположить, что реактивный сульфгидрил расположен в активном центре либо в непосредственной близости от него на α-субъединице в триптическом пептиде с последовательностью аминокислот phe-glu-ile-cis-arg. Однако [30], непосредственное участие реактивного сульфгидрила в каталитической функции не показано. Люцифераза *V.harveyi* имеет специфический связывающий сайт для фосфата, который связан с флавин-связывающим сайтом. Скорость оборота фермента сильно зависит от концентрации фосфата. Что касается сродства люциферазы к флавину, то не возникает сомнений, что наибольшим сродством люцифераза обладает к восстановленному FMN. Однако работами некоторых авторов показано, что молекула люциферазы имеет также и сайт связывания для окисленной формы флавина. Альдегид присоединяется вдоль всей алкильной цепи, и наиболее сильное взаимодействие (“заякоривание”) наблюдается при альдегидной группе. α106 мутантная люцифераза *V.harveyi* подвержена меньшему альдегидному ингибированию по сравнению с диким типом. Следовательно [32], молекулярный механизм альдегидного ингибирования включает *сys* в позиции α106.

 В ходе биолюминесцентной реакции бактерий формируется ряд долгоживущих интермедиатов. На первом этапе в результате реакции восстановленного FMNН2 c люциферазой формируется интермедиат I, время половины жизни которого составляет 20 с при 20 ° С. Вторая стадия [[[34]](#endnote-35)] - взаимодействие с молекулой кислорода, протекает очень быстро, в результате формируется стабильный интермедиат II со временем полужизни 35 мин при 2 ° С. Интермедиат II удалось выделить на колонке при -20 ° С. Флавин в составе интермедиата II спектрально отличается от FMNН2. Он имеет поглощение с пиком при 372 нм и флуоресценцию в районе 490 нм. Этот флавин не соответствует и полностью восстановленному FMN. В отсутствие альдегида [33] промежуточный ферментный комплекс (интермедиат II) претерпевает безызлучательный распад на FMN, H2O2 и люциферазу. В присутствии альдегида из интермедиата II образуется интермедиат IIа, который через ряд дополнительных этапов превращается в возбужденный эмиттер. Вопрос о природе эмиттера представляет особый интерес и до сих пор остается открытым

1. Fagain,C.O Enzyme stabilization—recent experimental progress / C.O Fagain // Enzyme and Microbial Technology – 2003. № 33 – Р 137-149. [↑](#endnote-ref-2)
2. Варфоломеев, С.Д Химическая энзимология [Текст]: учеб / С.Д Варфоломеев. – М.: Академия, 2005. – 480 с. [↑](#endnote-ref-3)
3. Байрамов, В.М Основы химической кинетики и катализа [Текст] : учеб. пособие / В.М Байрамов. – М.: Академия, 2003. – 256 с [↑](#endnote-ref-4)
4. 4 Кубасов, А.А Химическая кинетика и катализ [Текст]: учеб. пособие / А.А Кубасов. – М.: МГУ, 2004. – 144 с. [↑](#endnote-ref-5)
5. Ленинджер, А.Л Основы биохимии [Текст] : учеб / А.Л Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – 369 с. [↑](#endnote-ref-6)
6. Ogino, H Enzymes which are stable in the present of organic solvents / H. Ogino H. Ishikawa // Journal of Bioscience and Bioengineering – 2001. №2 – Р 109-116 [↑](#endnote-ref-7)
7. Serdakowski, A Enzyme activation for organic solvents made easy / A.L Serdakowski, J.S Dordick // TRENDS in Biotechology – 2007. № 1- Р 48-54 [↑](#endnote-ref-8)
8. Doukyu, N Organic solvent-tolerant enzymes / N. Doukyu, H. Ogino // Biochemical engineering journal – 2010. №48- Р 270-282 [↑](#endnote-ref-9)
9. Zaks, A Enzyme-catalyzed processes in organic solvents / A. Zaks, A.M. Klibanov // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A - 1985. №82 - 3192–3196 [↑](#endnote-ref-10)
10. Tanford, C. Physical Chemistry of Macromolecules. 1961 John Wiley [↑](#endnote-ref-11)
11. Singer, S.J The properties of proteins in nonaqueous solvents / S.J. Singer // Adv. Protein Chem – 1962. №17 - Р 1–68 [↑](#endnote-ref-12)
12. Wangikar, P.P Structure and function of subtilisin BPN’

solubilized in organic solvents / P.P Wangikar // J. Am. Chem. Soc – 1997. №119 – Р 70–76 [↑](#endnote-ref-13)
13. Zaks, A The effect of water on enzyme action

in organic medi / A. Zaks, A.M Klibanov // J. Biol. Chem – 1988. №263 - Р 8017–8021 [↑](#endnote-ref-14)
14. Rupley, J.A Protein hydration and function / J.A. Rupley, G Careri // Adv.Protein Chem – 1991. №41 - Р 37–172 [↑](#endnote-ref-15)
15. Michels, P.C. Dipole formation and solvent electrostriction

in subtilisin catalysis / P.C Michels // J. Am. Chem. Soc – 1997. №119 - Р 9331–9335 [↑](#endnote-ref-16)
16. Daniel, R.M The role of dynamics in enzyme activity / R.M Daniel //Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct – 2003. №32 - P 69–92 [↑](#endnote-ref-17)
17. Soares, C.M. Protein structure and dynamics in nonaqueous solvents: Insights from molecular dynamics simulation studie / C.M. Soares // Biophys. J – 2003. №84 - P 1628–1641 [↑](#endnote-ref-18)
18. Kim, J Intrinsic effects of solvent polarity on enzymatic activation energies / J. Kim // Biotechnol. Bioeng – 2000.№67 - Р 112–116 [↑](#endnote-ref-19)
19. Gorman, L.S Organic solvents strip water off

Enzymes / L.S. Gorman, J.S Dordick // Biotechnol. Bioeng – 1992. №39 – Р 392–397 [↑](#endnote-ref-20)
20. Serdakowski, A.L. Dramatic solvent and hydration effects on the transition state of soybean peroxidase / A.L Serdakowski // J. Am. Chem. Soc – 2006. №128 – Р 14272–14273 [↑](#endnote-ref-21)
21. Parida, S Substrate structure and solvent hydrophobicity control lipase catalysis and enantioselectivity in organic media / S. Parida, J.S. Dordick // J. Am. Chem. Soc. 113 – 1991. №113 – Р 2253–2259 [↑](#endnote-ref-22)
22. Guinn, R.M Activity and flexibility of alcohol dehydrogenase in organic solvents / R.M. Guinn // Biotechnol. Bioeng – 1991. №37 - P 303–308 [↑](#endnote-ref-23)
23. Prestrelski, S.J. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-speciﬁc stabilization. II. Structural studies using infrared spectroscopy / S.J. Prestrelski // Arch. Biochem. Biophys – 1993. №303 - Р 465–473 [↑](#endnote-ref-24)
24. Ash, M. and Ash, I. Textbook of Pharmaceutical Additives. (2nd edn), Synapse Information Resources Inc – 2002. [↑](#endnote-ref-25)
25. Crowe, J.H Preservation of mammalian cells – learning nature’s tricks / J.H. Crowe, L.M. Crowe // Nat. Biotechnol – 2000. №18 - Р 145–146 [↑](#endnote-ref-26)
26. Байрамов, В.М Основы химической кинетики и катализа [Текст] : учеб. пособие / В.М Байрамов. – М.: Академия, 2003. – 256 с. [↑](#endnote-ref-27)
27. Панченко, Г. М Химическая кинетика и катализ [Текст] : учеб пособие / Г. М. Панченков, В. П. Лебедев. — М.: Химия, 1985. - 592 с. [↑](#endnote-ref-28)
28. Ленинджер, А.Л Основы биохимии [Текст] : учеб / А.Л Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – 369 с. [↑](#endnote-ref-29)
29. Campbell, Z.T Crystal Structure of the Bacterial Luciferase/Flavin Complex Provides Insight into the Function of the β Subunit / Z.T. Campbell, A. Weichsel, W.R. Montfort, T.O. Baldwin // Biochemistry – 2009. № 48 – Р 6085–6094 [↑](#endnote-ref-30)
30. Dmitriev, L.F Bacterial luminescence: Luminescence mechanism with cyclic peroxide participation and dependence on reactive oxygen species (a hypothesis) / L.F. Dmitriev // Biochimie – 2000. № 82 – Р 237−244. [↑](#endnote-ref-31)
31. Inouye, S NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, Vibrio fischeri ATCC 7744, is a flavoprotein / S. Inouye // FEBS Letters – 1994. № 347 – Р 163-168 [↑](#endnote-ref-32)
32. Mehrabi, M Stabilization of ﬁreﬂy luciferase against thermal stress by osmolytes / M Mehrabia, S Hosseinkhania,, S Ghobadi // International Journal of Biological Macromolecules – 2008. № 43 – Р 187–191. [↑](#endnote-ref-33)
33. Ataei F, Luciferase protection against proteolytic degradation: A key for improving signal in nano-system biology / F. Ataei, S. Hosseinkhani, K. Khajeh // Journal of Biotechnology – 2009. № 144 – Р 83-88. [↑](#endnote-ref-34)
34. Manukhov, I.V Folding and refolding of thermolabile and thermostable bacterial luciferases: the role of DnaKJ heat-shock proteins / I.V. Manukhov, G.E. Eroshnikov, M.Y Vyssokikh // FEBS Letter – 1999. № 448 – Р 265-268. [↑](#endnote-ref-35)