

П. В. АФАНАСЬЕВ и Ю. Н. ИЛЬИНА

## О ТЕМПЕРАТУРНОМ ОПТИМУМЕ ДЕЙСТВИЯ ИНВЕРТАЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 IX 1950)

Ферментативное действие возрастает с повышением температуры до некоторых пределов, а затем падает. В энзимологии существует распространенное представление о причинах, обуславливающих указанный характер зависимости: обычно полагают, что реакции, катализируемые ферментами, ускоряются с повышением температуры согласно тем же законам, как и большинство химических реакций.

Но так как ферменты чрезвычайно легко подвергаются температурному инактивированию, то повышение температуры приводит к нарастанию степени их инактивирования, что замедляет ферментативный процесс. При некоторой температуре оба эти эффекта уравниваются, и в этот момент размер химического изменения субстрата оказывается наибольшим. При температурах выше оптимума реакция протекает быстрее, но фермент инактивируется еще быстрее <sup>(1)</sup>.

Мы полагаем, что такое понимание причин возникновения температурного оптимума действия ферментов совершенно неудовлетворительно. Нами уже указывалось, что температурный оптимум можно легко объяснить без предположения о тепловом инактивировании фермента <sup>(2)</sup>.

Кинетические особенности течения ферментативных процессов являются причиной возникновения такого рода зависимости. Так например, зависимость скорости гидролиза сахарозы инвертазой хорошо подчиняется уравнению <sup>(3)</sup>:

$$v = k_3 \frac{FS - \frac{k_1}{k_2} S^2}{\frac{k_3}{k_1} + 2S},$$

где  $v$  — скорость реакции,  $S$  — концентрация субстрата,  $F$  — концентрация фермента,  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  — константы скоростей промежуточных процессов.

Полагая, что константы зависят от температуры, т. е.  $k_3 = f_1(T)$ ,  $\frac{k_1}{k_2} = f_2(T)$  и  $\frac{k_3}{k_1} = f_3(T)$ , где  $T$  — температура, можно получить условие максимума скорости ферментативной реакции:

$$[f_1(T)f_2'(T) + f_2(T)f_1'(T)]2S^2 + [f_1(T)f_3(T)f_2'(T) + f_2(T)f_3(T)f_1'(T) - f_1(T)f_2(T)f_3'(T) - 2f_1'(T)F]S - [f_3(T)f_1'(T) - f_1(T)f_3'(T)]F = 0,$$

где  $f'(T) = \frac{df(T)}{dT}$ .

Протекание теплового инактивирования фермента по мономолекулярному закону позволяет дать зависимость концентрации активного фермента во времени:

$$(1 - x) = e^{-kt},$$

где  $(1 - x)$  — количество активного фермента,  $t$  — время и  $k$  — константа мономолекулярного процесса.

Наложение процесса инактивирования фермента на ферментативный процесс может быть учтено введением в кинетическое уравнение зависимости концентрации активного фермента от времени:

$$v = \frac{f_1(T)FSe^{-kt} - f_1(T)f_2(T)S^2}{f_3(T) + 2S}.$$

Если определить начальные скорости процесса, т. е. при  $t = 0$ , то множитель  $e^{-kt}$  будет равен 1 и, следовательно, в этом случае

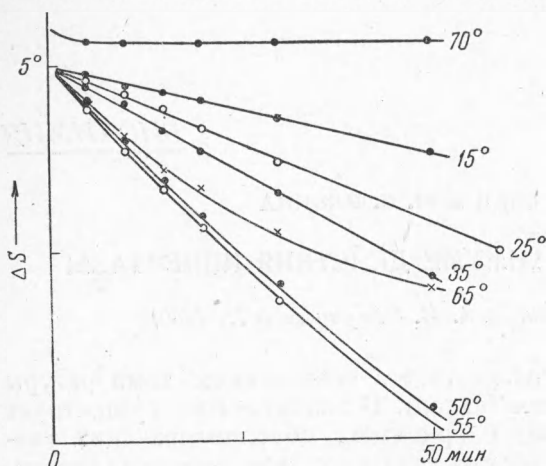


Рис. 1. Кинетика гидролиза сахарозы (5%) инвертазой (0,8 мл / 100 мл) при различных температурах

тепловое инактивирование не должно влиять на значение скорости ферментативной реакции.

Следовательно, при сопоставлении начальных скоростей ферментативной реакции с температурой должна получиться зависимость, не включающая влияния теплового инактивирования фермента.

Для проверки указанных соображений мы измерили кинетику действия инвертазы на сахарозу при различных температурах. Раствор инвертазы (препарат, полученный тщательным диализом автолизата пивных дрожжей после осаждения сопутствующих белков уксуснокислым свинцом) вводился в реакционную смесь в относительно небольшом количестве и с этого момента отсчитывалось время.

Теплоемкость вводимого раствора фермента могла понизить температуру смеси максимально на  $0,5^\circ$  (по правилу смешения). Это могло дать искажение скорости реакции, не превышающее  $5\%$ . Реакционная смесь содержала  $5\%$  сахарозы, рН 4,63 (ацетатный буфер). Полученные результаты приведены на рис. 1.

Графическим дифференцированием кинетических кривых рис. 1 получены начальные скорости ферментативной реакции при разных

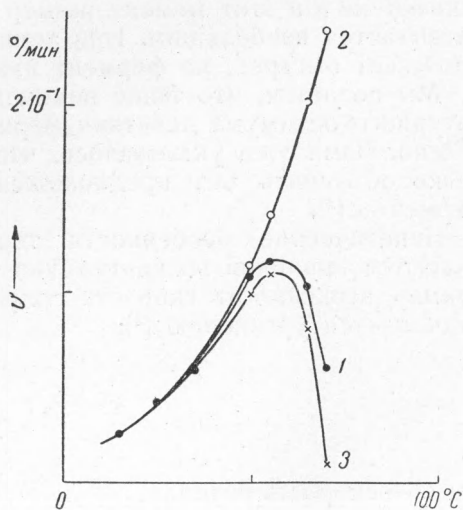


Рис. 2. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры. 1 — начальные скорости реакции; 2 — зависимость, экстраполированная на высокие температуры; 3 — средние скорости (за 25 мин.) реакции

температурах. На рис. 2 (кривая 1) показана зависимость начальной скорости от температуры. Получается типичная кривая зависимости с температурным оптимумом.

Если сопоставить размер превращения субстрата за 25 мин. с температурой, то получим кривую 3 рис. 2.

Таким образом, применение конечных превращений субстрата за определенное время (размер превращения субстрата) в качестве показателя скорости ферментативного процесса дает примерно ту же зависимость, только несколько искаженную.

На рис. 3 сопоставлены логарифмы начальных скоростей процесса с соответствующими обратными абсолютными температурами. Линейная зависимость наблюдается только при относительно низких температурах, при высоких же температурах наблюдается резкое отклонение от линейности.

Экстраполируя линейную зависимость на высокие температуры, можно вычислить скорости ферментативного процесса для высоких температур в предположении, что повышение температуры не вызывает тормозящего действия, а только активирующее. Это показано на кривой 2 рис. 2.

Совершенно очевидно, что расхождение кривых 1 и 2 рис. 2 столь велико, что не может быть объяснено тепловым инактивированием фермента в разумных размерах.

Из приведенных экспериментальных данных очевидно, что оптимальный характер зависимости скорости ферментативной реакции от температуры не определяется тепловым инактивированием фермента. Тепловое инактивирование фермента только искажает в той или иной мере оптимальный характер зависимости, диктуемый кинетическими особенностями ферментативного процесса.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР

Поступило  
25 IV 1950

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Дж. Холден, Энзимы, 1934; Э. Болдуин, Основы динамической биохимии, 1949. <sup>2</sup> П. В. Афанасьев и Ю. Н. Ильина, Изв. АН СССР, сер. биол., 4, 495 (1949). <sup>3</sup> П. В. Афанасьев, Биохимия, 14, 259 (1949).

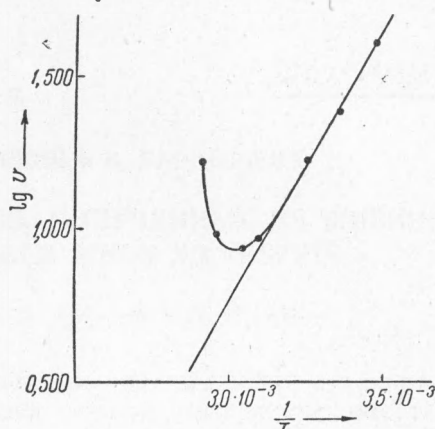


Рис. 3. Зависимость логарифма скорости реакции от обратной абсолютной температуры