

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ В.А. Кратасюк

« _____ » _____ 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

06.03.01.07 – Биофизика

Кинетические и температурные характеристики NADH:FMN-
оксидоредуктазы в вязких средах

Руководитель
Суковатая

подпись, дата

к.б.н., _____ доцент _____ И.Е.

Выпускник

подпись, дата

Е.С. Тыртышная

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Кинетические и температурные характеристики NADH:FMN-оксидоредуктазы в вязких средах» содержит: 30 страниц текстового документа, 10 иллюстраций, 30 литературных источников.

Цель работы: охарактеризовать кинетические и температурные характеристики моноферментной системы, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой в условиях вязкого микроокружения.

Актуальной проблемой в настоящее время является понимание функционирования ферментов внутри клетки. Для этого моделируются условия близкие к внутриклеточным путём добавления в реакционную среду органических растворителей для изменения её физико-химических свойств, в том числе и вязкости. Ранее было показано, что в условиях повышенной вязкости наблюдается увеличение каталитической активности при температуре 35°C для биферментной системы биолюминесцентных бактерий (NADH:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза). В данной работе исследовано влияние вязкости реакционной среды на кинетические и температурные характеристики NADH:FMN-оксидоредуктазы.

Результаты исследования показали, что на кинетические и температурные характеристики NADH:FMN-оксидоредуктазы оказывает влияние не только вязкость реакционной среды, но и природа используемого органического растворителя.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Разнообразие NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз.....	7
1.2 Реакция, катализируемая NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой и ее роль в биолюминесценции бактерий	7
1.3 Структура	9
1.4 Молекулярный краудинг	11
1.4.1 Влияние молекулярного краудинга на ферментативные реакции	13
1.5. Влияние температуры на активность ферментов	14
2. Материалы и методы	Ошибка! Закладка не определена.
2.1. Используемые реактивы и оборудование	Ошибка! Закладка не определена.
2.2. Методы	Ошибка! Закладка не определена.
5. Результаты и обсуждения	Ошибка! Закладка не определена.
5.1 Активность NADH:FMN-оксидоредуктазы при различных концентрациях органических растворителей.....	Ошибка! Закладка не определена.
5.2 Влияние водно-глицериновых и водно-сахарозных смесей на кинетические параметры NADH:FMN-оксидоредуктазы.....	Ошибка! Закладка не определена.
5.3 Активность NADH:FMN-оксидоредуктазы в зависимости от температуры и концентрации органических растворителей	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ.....	18

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	19
--------------------------------------	----

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в клетках содержится большое количество разнообразных биологических молекул: белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, которые могут занимать 5-40% от общего объема клетки. А значит, внутриклеточные условия, в которых функционируют ферменты, и условия *in vitro*, в которых проводятся исследования, отличаются.

Белки представляют собой сложные молекулы, которые часто могут быть нестабильными, находясь вне своей естественной среды, ферменты теряют каталитическую активность в неоптимальных для них условиях, таких как повышенная температура, изменение pH. Эффект исключенного объема, характерный для живых клеток, может поддерживать стабильность, структурную целостность, а следовательно, и активность ферментов. Кроме того, данный эффект может замедлять диффузию, как малых молекул, так и белков из-за высокой вязкости. А значит, полученные в результате исследований *in vitro* данные об активности ферментов, могут отличаться от того, что происходит в реальной клетке.

Большое количество исследований сейчас сосредоточено на изучении внутриклеточной активности ферментов. Для этого моделируются условия близкие к внутриклеточным путем добавления в реакционную среду различных органических растворителей.

NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза являются составляющими биферментной системы биолюминесцентных бактерий. Благодаря возможности преобразовывать энергию химических связей в световую данная система является уникальной и находит широкое практическое применение, включая аналитические методы, создание биосенсоров. NADH:FMN-оксидоредуктаза в этой системе постоянно обеспечивает второй фермент одним из субстратов, а именно восстановленным флавином FMNH₂.

Ранее было установлено, что в присутствии глицерина и сахарозы наблюдается увеличение каталитической активности при температуре 35°C для биферментной системы (NADH:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза) [1].

Цель исследования: охарактеризовать кинетические и температурные характеристики моноферментной системы, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой в условиях вязкого микроокружения.

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние вязкости среды на активность NADH:FMN-оксидоредуктазы
2. Определить механизм влияния вязкого микроокружения на кинетические характеристики NADH:FMN-оксидоредуктазы, на примере изменения величины K_m
3. Оценить вклад вязкости реакционной среды на температурную стабильность NADH:FMN-оксидоредуктазы

1 Обзор литературы

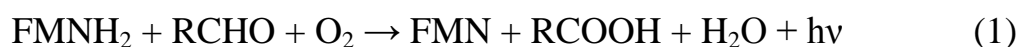
1.1 Разнообразие NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз

NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы представляют собой класс ферментов, производящих восстановленный флаavin с использованием NAD(P)H в качестве донора протона и связаны с различными биологическими функциями, такими как активация рибонуклеотидредуктазы, восстановление метгемоглобина, активация кислорода и т.д. Особый интерес представляет бактериальная биолюминесценция, где NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза обеспечивает люциферазу необходимым субстратом.

Различают несколько типов флавинредуктаз по их специфичности: FRP и FRD используют в качестве субстратов NADPH или NADH соответственно, FRG, в свою очередь, окисляет как NADPH, так и NADH. В клетках может присутствовать один из представленных типов фермента или даже все три, как, например, у бактерий вида *Vibrio harveyi* [2].

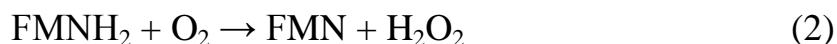
1.2 Реакция, катализируемая NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой и ее роль в биолюминесценции бактерий

Биолюминесценция бактерий обусловлена наличием у них специфического фермента – люциферазы, который катализирует реакцию окисления длинноцепочечного альдегида при участии восстановленного флавинмононуклеотида (FMNH₂). В результате каталитической реакции происходит образование промежуточных комплексов флавиновых производных с бактериальной люциферазой. Один из интермедиатов превращается в высоковозбужденный эмиттер, дезактивация которого сопровождается испусканием фотона.



Однако один из субстратов люциферазы, а именно восстановленный флавинмононуклеотид (FMNH₂) является нестабильным и подвергается

быстрому автокаталитическому окислению кислородом с образованием перекиси водорода [3].



Поэтому у биолюминесцентных бактерий имеется фермент, способствующий восстановлению окисленной формы FMN. В ходе окислительно-восстановительной реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой происходит образование FMNH₂ с одновременным окислением NADH.



В данной ферментативной реакции восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида (NADH) является донором водорода для флавина [4]. На первом этапе происходит перенос водорода, который складывается из переноса электрона и протона: $\text{H} = \text{e}^- + \text{H}^+$, в результате чего NADH переходит в NAD⁺. Из молекулы FMN, получившей протон и два электрона, образуется депротонированная форма восстановленного флавина FMNH⁻. Затем может образоваться FMNH₂ в результате переноса протона от подходящего донора [5]. Благодаря данной реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой, происходит постоянное обеспечение люциферазы одним из субстратов.

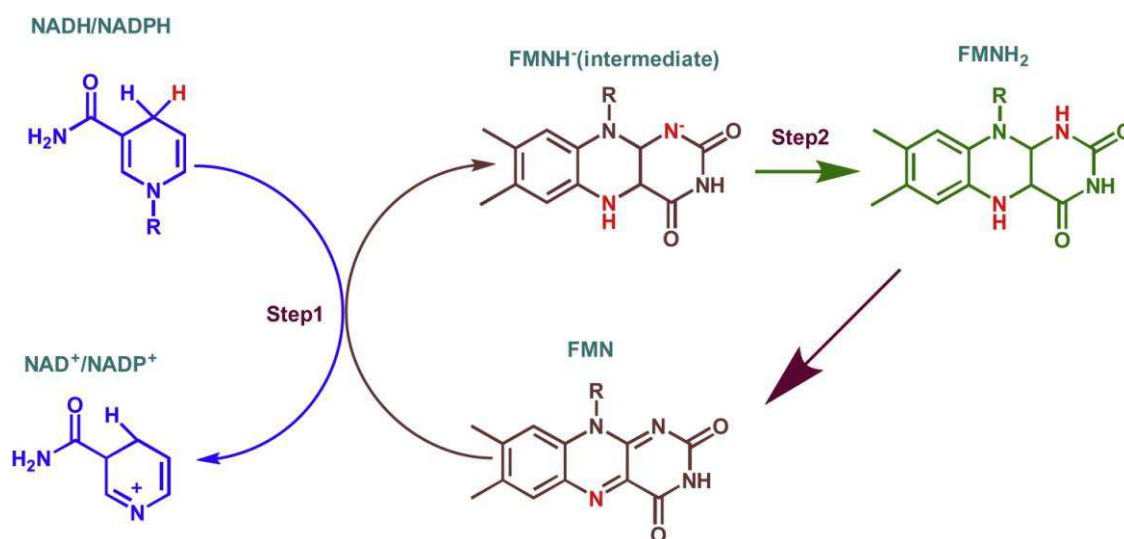


Рисунок 1 – Механизм реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой

Поскольку продукт реакции FMNH₂ склонен к быстрому автокаталитическому окислению, его попадание в активный центр люциферазы остается спорным вопросом. Возможна прямая передача восстановленного флавина от NADH:FMN-оксидоредуктазы к люциферазе в результате образования стабильного белкового комплекса между этими ферментами. Данный механизм позволяет избежать быстрого окисления FMNH₂. Однако образование комплекса редуктаза-люцифераза не было установлено, а значит, высвобожденный продукт может попадать в активный центр люциферазы в результате свободной диффузии [6].

1.3 Структура NADH:FMN-оксидоредуктазы

Одна из наиболее изученных на данный момент флавинредуктаз была обнаружена и выделена из бактерий *Vibrio harveyi*, позднее для нее была определена кристаллическая структура методом рентгеноструктурного анализа. Данный фермент представляет собой гомодимер, субъединицы которого формируют два активных центра, симметрично расположенных в области межсубъединичного пространства. Каждая из субъединиц включает два домена и связана с молекулой FMN. Первый домен состоит из четырех антипараллельных β-листов, окруженных α-спиралями с обеих сторон и является нуклеотидсвязывающим. Второй домен каждой из субъединиц охватывает больший домен другой субъединицы, обеспечивая тем самым их сцепление [7].

Молекула флавина связана с белком сетью водородных связей, кроме того, в активном центре фермента присутствуют гидрофобные взаимодействия. Бензоеидная часть изоаллоксазинового кольца флавина находится в гидрофобном кармане, образованном Phe 153 и Tyr 128 одной

субъединицы и Val 106 и Ile 110 другой субъединицы [7]. Данная флавинредуктаза из *Vibrio harveyi* является NADPH-специфичной, предполагается, что это обусловлено наличием в одной из ее гибких аминокислотных петель остатка Arg203, отвечающего за распознавание и связывание NADPH [8].

Из *Vibrio fischeri* была выделена флавинредуктаза, использующая в качестве донора протонов как NADPH, так и NADH. Кристаллическая структура данного фермента также была определена [9]. FRase I представляет собой флавопротеин, содержащий FMN в качестве простетической группы. Флаavin прочно связан с белковой молекулой сетью из 16 водородных связей. Так как молекула флавина расположена в области межсубъединичного пространства, взаимодействия осуществляются с остатками обеих субъединиц. Общая укладка FRase I / FRG-I *V. fischeri* аналогична укладке FRP *V. Harveyi*. Одним из основных отличий в структуре этих двух ферментов является отсутствие петли A201-L209, содержащей остаток Arg203 в последовательности FRG-I *V. Fischeri*, отвечающий за специфическое связывание с NADPH.

Каждая субъединица FRase I включает два домена. Основной домен состоит из пятицепочечного β -листа, окруженного семью α -спиралями. При этом β -лист включает в себя 4 антипаралельных β -цепи, взаимодействующих с пятой β -цепью С-конца другой субъединицы. Гибкий домен содержит две α -спирали.

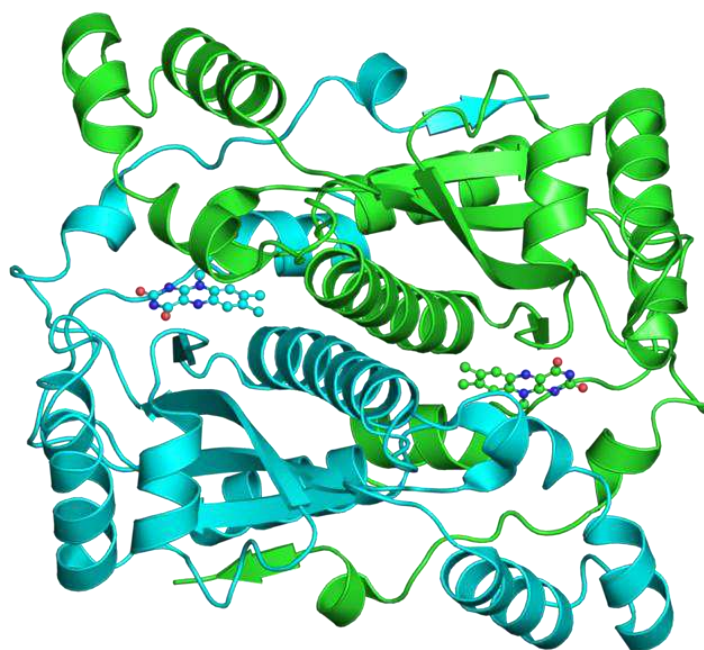


Рисунок 2 – Структура NADH:FMN-оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri*

1.4 Молекулярный краудинг

Внутриклеточное содержимое представляет собой смесь макромолекул (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов), которые занимают 5-40% от общего объема клетки. Большая часть этих макромолекул может и не взаимодействовать непосредственно друг с другом, но при этом занимать часть свободного пространства клетки. Общая макромолекулярная концентрация составляет 50-400 мг/мл, что значительно отличается от значений для условий *in vitro*, где общая макромолекулярная концентрация составляет 1–10 мг/мл. Таким образом, в клетках белки выполняют свои функции в условиях молекулярного краудинга, когда свободный объем, незанятый другими молекулами, существенно ограничен. Кроме того, макромолекулярное скопление уменьшает объем доступного растворителя.

Эффект исключенного объема оказывает значительное влияние на внутриклеточные процессы, что связано с изменением скоростей биохимических реакций, снижением диффузии. Диффузия макромолекул в цитоплазме может быть в 5-20 раз ниже, чем в солевых растворах. Эффект

исключенного объема изменяет конформационную стабильность и структурные свойства биологических макромолекул, влияет на процессы фолдинга белков, белок-белковые взаимодействия, связывание с малыми молекулами и т.д [10].

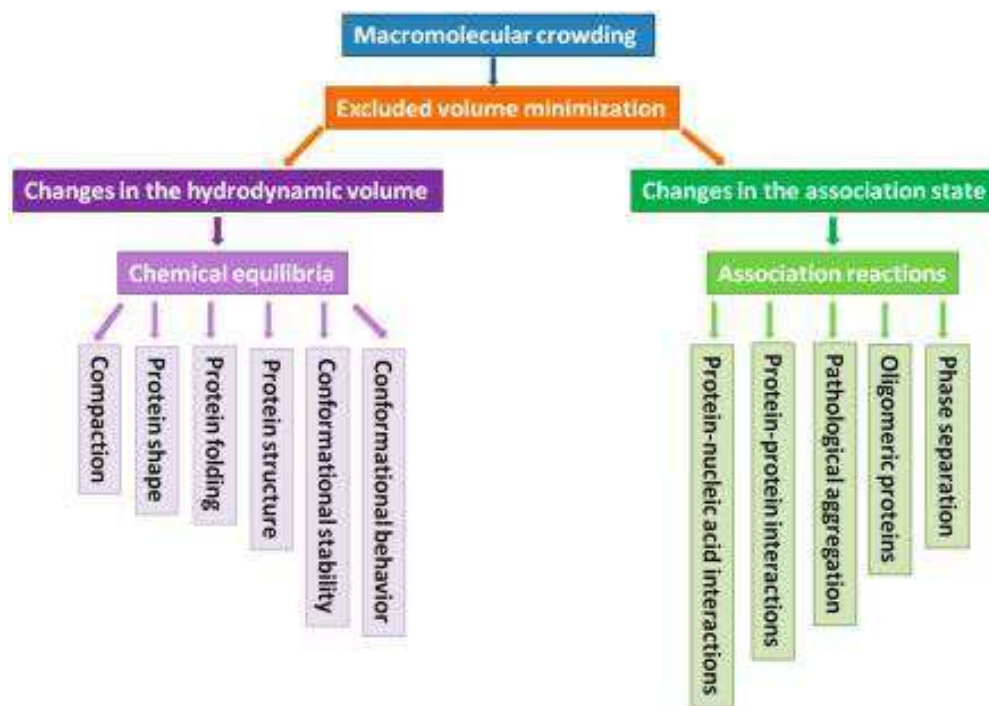


Рисунок 3 – Схема влияния молекулярного краудинга на белки

Изменение объема, занятого макромолекулами может тем или иным образом оказывать влияние на равновесие и кинетику разнообразных внутриклеточных реакций. Экспериментальные данные показывают, что эффект краудинга приводит к увеличению скоростей таких биохимических реакций, как ассоциация белков, их фолдинг, обратимую денатурацию, а также сдвигает положение равновесия в сторону ассоциации. В настоящее время широко изучается влияние макромолекулярного краудинга на функциональную активность белков. Для этого моделируются условия, приближенные к внутриклеточным за счет добавления в раствор краудинг-агентов.

Наиболее часто в качестве краудинг-агентов используются полиэтиленгликоль (ПЭГ), бычий сывороточный альбумин (БСА), фикоил, различные осмолиты и т.д. Важным моментом является то, что добавляемые краудинг-агенты должны быть нейтральными и не проявлять способности специфически взаимодействовать с изучаемыми белками, поскольку краудинг подразумевает стерическое отталкивание между изучаемыми макромолекулами. Кроме того, также должна учитываться химическая природа субстрата при анализе ферментативных реакций в подобных средах [11].

1.4.1 Влияние молекулярного краудинга на ферментативные реакции

Функциональная активность многих белков зависит от их олигомерного состояния, а в условиях краудинга олигомеризация и ассоциация усиливаются, влияя, соответственно, на функционирование белковых молекул. Известно, что глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, катализирующая реакцию окисления глюкозо-6-фосфата, активна в форме димера. Было показано, что добавление БСА и ПЭГ (полиэтиленгликоля) повышало каталитическую активность фермента, стабилизируя его активную димерную форму в условиях, способствующих его диссоциации и инактивации (инкубация при высоких температурах) [12]. Также присутствие различных концентраций трегалозы, сорбита, сахарозы и глицерина способствовало повышению термостабильности α -амилазы. Но стоит отметить, что такой эффект достигается только при добавлении определенных концентраций веществ [13]. Так, в одном из исследований K_M и k_{cat} гексокиназы (гомодимерного фермента) заметно снижались в присутствии высоких концентраций БСА в результате конформационных изменений и/или диффузии продукта из фермент-субстратного комплекса [14]. Аналогичная ситуация наблюдалась в эксперименте с лактатдегидрогеназой при высоких концентрациях декстрана.

Предполагается существование смешанного активационно-диффузионного контроля ферментативных реакций в условиях краудинга [15].

Таким образом, эффект краудинга оказывает противоположное влияние на ферменты: увеличивает их термодинамическую активность, но замедляет диффузию. Поэтому активность одних ферментов в присутствии краудинг агентов увеличивается [16], других – уменьшается [17], либо никак не изменяется. Кроме того, скорость реакции, катализируемой одним и тем же ферментом может как увеличиваться, так и уменьшаться в зависимости от концентрации добавляемых краудинг агентов [18].

Важными факторами, влияющими на диффузию, являются размер и концентрация краудинг агентов [19]. При увеличении концентрации увеличивается и вязкость раствора, что замедляет молекулярную диффузию, а значит, и образование фермент-субстратных комплексов и высвобождение продукта из активного центра, приводя к изменению кинетических параметров.

Краудинг может изменять активность воды, которая как растворитель имеет важное значение, облегчая полярные взаимодействия за счет образования водородных связей, как на поверхности, так и внутри макромолекулы, играя значительную роль в связывании фермента и субстрата. Одним из главных факторов в обеспечении стабильности отдельных областей белка являются водородные связи, образованные между полярными группами и водой [20, 21].

1.5. Влияние температуры на активность ферментов

Для описания температурной зависимости скоростей химических реакций применяется уравнение Аррениуса:

$$— \tag{4}$$

Согласно данному уравнению скорость реакции экспоненциально возрастает с увеличением температуры. Величина E_A – энергии активации – представляет собой минимальную энергию, которая необходима для протекания химической реакции [22]. Ферменты способны понижать энергию активации, [23] увеличивая тем самым скорость реакции.

Между логарифмом скорости k и обратной абсолютной температурой $1/T$ наблюдается линейная зависимость в том случае, если реакция подчиняется уравнению Аррениуса:

$$\ln k = -\frac{E_A}{RT} + \ln A \quad (5)$$

Таким образом, из экспериментально полученного графика зависимости $\ln k$ от $1/T$, который будет представлять собой прямую, можно найти значение E_A по тангенсу угла наклона этой прямой. Полученные значения затем можно использовать для расчёта констант скорости при определенной температуре при условии сохранения линейной зависимости вне температурного диапазона эксперимента [23, 24].

Однако в случае ферментативных реакций их скорость с ростом температуры не будет увеличиваться бесконечно, в определенный момент она достигнет своего максимума и при дальнейшем повышении температуры начнет снижаться. Поэтому уравнение Аррениуса применимо только для ограниченного диапазона температур, не превышающего оптимальной.

Снижение скорости реакции при температурах выше оптимальной объясняется процессами денатурации белка, в результате чего нарушается активный центр фермента, снижается сродство к субстрату [25]. Каталитическая активность фермента связана с конформационной гибкостью белковой молекулы и её стабильностью: чем выше гибкость структуры, тем выше активность, но ниже стабильность.

На стабильность белков влияет достаточно большое количество факторов: сила электростатических взаимодействий, плотность упаковки, количество дисульфидных связей, гидрофобность, конформационная жесткость и т.д. Всё перечисленное вносит вклад в термостабильность белковых молекул.

Одним из наиболее важных факторов определяющих термическую стабильность являются электростатические взаимодействия. В ряде исследований было показано увеличение количества заряженных аминокислот в последовательности термофильных белков по сравнению с мезофилами. На поверхности таких белков наблюдается повышенное количество солевых мостиков. Взаимодействие двух противоположно заряженных групп с образованием солевого мостика усиливает жесткость соединения между вторичными структурами, что приводит к снижению локальной гибкости и увеличению плотности упаковки, тем самым увеличивая термостабильность белка [26, 27, 29]. Кроме того, в белках более устойчивых к повышенным температурам наблюдаются более короткие области мобильных петель, что ограничивает флуктуации и приводит к большей их стабильности [28].

Изъято в связи с авторскими правами с 16 по 26 стр.

ВЫВОДЫ

В результате работы были сделаны следующие выводы:

1. Установлено, что на величину активности NADH:FMN-оксидоредуктазы оказывает наибольшее воздействие природа используемого вязкого агента, а не вязкость реакционной среды. При этом монотонное увеличение содержания водно-сахарозных растворов приводит к увеличению активности NADH:FMN-оксидоредуктазы.
2. Показано, что в присутствии 20% глицерина происходит увеличение величины константы Михаэлиса (K_m) по ФМН NADH:FMN-оксидоредуктазы по сравнению с буфером, в присутствии 20% сахарозы – её уменьшение, что может быть связано, что изменениями пространственной структуры фермента, вызванной присутствием в реакционной среде сахарозы.
3. В присутствии 20% глицерина и 40% сахарозы наблюдается повышение активности NADH:FMN-оксидоредуктазы при температурах выше 30 °С по сравнению с другими исследованными концентрациями вязких агентов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sutormin, O. S. Thermal stability of coupled enzyme system NADH: FMN-oxidoreductase-luciferase in solvents of different viscosity / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // *Luminescence*. –2012. – Т. 27. – №. 2. – С. 162-162.
2. Tu, S. C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases / S. C. **Tu** // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2008. – Т. 7. – №. 2. – С. 183-188.
3. Gibson, Q. H. The oxidation of reduced flavin mononucleotide by molecular oxygen / Q. H. Gibson, J. W. Hastings // *Biochemical Journal*. – 1962. – Т. 83. – №. 2. – С. 368.
4. Puget, K. Studies in bioluminescence: VII. Bacterial NADH: Flavin mononucleotide oxidoreductase / K. Puget, A. M. Michelson // *Biochimie*. – 1972. – Т. 54. – №. 9. – С. 1197-1204.
5. Li, F. L. Expression, biochemical characterization, and mutation of a water forming NADH: FMN oxidoreductase from *Lactobacillus rhamnosus* / F. L. Li, W. B. Su, Q. L. Tao, L. Y. Zhang, Y. W. Zhang // *Enzyme and microbial technology*. – 2020. – Т. 134. – С. 109464.
6. Brodl, E. Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence / E. Brodl, A. Winkler, P. Macheroux // *Computational and structural biotechnology journal*. – 2018. – Т. 16. – С. 551-564.
7. Tanner, J. J. Flavin reductase P: structure of a dimeric enzyme that reduces flavin / J. J. Tanner, B. Lei, S. C. Tu, K. L. Krause // *Biochemistry*. – 1996. – Т. 35. – №. 42. – С. 13531-13539.
8. Wang, H. *Vibrio harveyi* NADPHFMN oxidoreductase Arg203 as a critical residue for NADPH recognition and binding / H. Wang, B. Lei, S-C. Tu // *Biochemistry*. – 2000. – Т. 39. – №. 26. – С. 7813-7819.
9. Koike, H. 1.8 Å crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of a bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri*: overall structure, cofactor and substrate–analog binding, and comparison with related flavoproteins / H. Koike,

- H. Sasaki, T. Kobori, S. Zenno, K. Saigo, M. E. Murphy, M. Tanokura // *Journal of molecular biology*. – 1998. – Т. 280. – №. 2. – С. 259-273.
10. Kuznetsova, I. M. What macromolecular crowding can do to a protein / I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, V. N. Uversky // *International journal of molecular sciences*. – 2014. – Т. 15. – №. 12. – С. 23090-23140.
11. Чеботарева, Н. А. Влияние молекулярного краудинга на ферменты гликогенолиза / Н. А. Чеботарева // *Успехи биологической химии*. – 2007. – Т. 47. – С. 233-258.
12. Norris, M. G. What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase / M. G. S. Norris, N. Malys // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2011. – Т. 405. – №. 3. – С. 388-392.
13. Yadav, J. K. Macromolecular crowding enhances catalytic efficiency and stability of α -amylase / J. K. Yadav // *International Scholarly Research Notices*. – 2013. – Т. 2013.
14. Olsen, S. N. Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions / S. N. Olsen // *Thermochimica Acta*. – 2006. – Т. 448. – №. 1. – С. 12-18.
15. Balcells, C. Macromolecular crowding effect upon in vitro enzyme kinetics: mixed activation–diffusion control of the oxidation of NADH by pyruvate catalyzed by lactate dehydrogenase / C. Balcells, I. Pastor, E. S. Vilaseca, Madurga, M. Cascante, F. Mas // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Т. 118. – №. 15. – С. 4062-4068.
16. Dhar, A. Structure, function, and folding of phosphoglycerate kinase are strongly perturbed by macromolecular crowding / A. Dhar, A. Samiotakis, S. Ebbinghaus, L. Nienhaus, D. Homouz, M. Gruebele, M. S. Cheung // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Т. 107. – №. 41. – С. 17586-17591.

17. Homchaudhuri, L., Sarma N., Swaminathan R. Effect of crowding by dextrans and Ficolls on the rate of alkaline phosphatase-catalyzed hydrolysis: A size- dependent investigation / L. Homchaudhuri, N. Sarma, R. Swaminathan // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. – 2006. – T. 83. – №. 5. – С. 477-486.
18. Pozdnyakova, I. Non-linear effects of macromolecular crowding on enzymatic activity of multi-copper oxidase / I. Pozdnyakova, P. Wittung-Stafshede // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2010. – T. 1804. – №. 4. – С. 740-744.
19. Pastor, I. Diffusion of α -chymotrypsin in solution-crowded media. A fluorescence recovery after photobleaching study / I. Pastor, E. Vilaseca, S. Madurga, J. L. Garcés, M. Cascante, F. Mas // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – T. 114. – №. 11. – С. 4028-4034.
20. Schneider, S. H. Slowed diffusion and excluded volume both contribute to the effects of macromolecular crowding on alcohol dehydrogenase steady-state kinetics / S. H. Schneider, S. P. Lockwood, D. I. Hargreaves, D. J. Slade, M. A. LoConte, B. E. Logan, K. M. Slade // *Biochemistry*. – 2015. – T. 54. – №. 38. – С. 5898-5906.
21. Огурцов, А. Н. Молекулярная биофизика и ферментативный катализ // Х.: НТУ" ХПИ". – 2011.
22. Carvalho-Silva, V. H. Temperature dependence of rate processes beyond Arrhenius and Eyring: Activation and Transitivity / V. H. Carvalho-Silva, N. D. Coutinho, V. Aquilanti // *Frontiers in chemistry*. – 2019. – T. 7. – С. 380.
23. DeLong J. P. et al. The combined effects of reactant kinetics and enzyme stability explain the temperature dependence of metabolic rates / J. P. DeLong, J. P. Gibert, T. M. Luhring, G. Bachman, B. Reed, A. Neyer, K. L. Montooth // *Ecology and Evolution*. – 2017. – T. 7. – №. 11. – С. 3940-3950.
24. Wang, W. Non-Arrhenius protein aggregation / W. Wang, C. J. Roberts // *The AAPS journal*. – 2013. – T. 15. – №. 3. – С. 840-851.

25. Knies, J. L. Erroneous Arrhenius: modified Arrhenius model best explains the temperature dependence of ectotherm fitness / J. L. Knies, J. G. Kingsolver // *The American Naturalist*. – 2010. – Т. 176. – №. 2. – С. 227-233.
26. Lee, C. W. Protein thermal stability enhancement by designing salt bridges: a combined computational and experimental study / C. W. Lee, H. J. Wang, J. K. Hwang, C. P. Tseng, // *PloS one*. – 2014. – Т. 9. – №. 11. – С. e112751.
27. Miotto, M. Insights on protein thermal stability: a graph representation of molecular interactions / M. Miotto, P. P. Olimpieri, L. Di Rienzo, F. Ambrosetti, P. Corsi, R. Lepore, E. Milanetti // *Bioinformatics*. – 2019. – Т. 35. – №. 15. – С. 2569-2577.
28. Dominy, B. N. An electrostatic basis for the stability of thermophilic proteins / B. N. Dominy, H. Minoux, C. L. Brooks III // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2004. – Т. 57. – №. 1. – С. 128-141.
29. Суковатый, Л. А. Влияние осмолитов на биолюминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты / Л. А. Суковатый, А. Е. Лисица, В. А. Кратасюк, Е. В. Немцева // *Биофизика*. – 2020. – Т. 65. – №. 6. – С. 1135-1141.
30. Yadav, J. K. Thermal stability of α -amylase in aqueous cosolvent systems / J. K. Yadav, V. Prakash // *Journal of biosciences*. – 2009. – Т. 34. – №. 3. – С. 377-387.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк В.А. Кратасюк

« 19 » июня 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

06.03.01.07 – Биофизика

Кинетические и температурные характеристики NADH:FMN-
оксидоредуктазы в вязких средах

Руководитель



подпись, дата

к.б.н., доцент И.Е. Суковатая

Выпускник



подпись, дата

Е.С. Тыртышная

Красноярск 2021