



УДК 577.15.022 + 577.158.429

**ИЗУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
В НЕСТАЦИОНАРНОМ РЕЖИМЕ ПРОТОЧНОГО РЕАКТОРА
ИДЕАЛЬНОГО ПЕРЕМЕШИВАНИЯ**

*Родионов Ю. В., Валеев Н. Н., Киселева З. Л.,
Березин П. В.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии химического факультета;*

Казанский химико-технологический институт им. С. М. Кирова

Предложен метод определения кинетических параметров реакций, катализируемых иммобилизованными ферментами, позволяющий из одного эксперимента проводить расчеты константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции. Методика основана на непрерывной регистрации концентрации продукта реакции при стационарном режиме работы проточного реактора идеального перемешивания. Предлагаемая методика использована для изучения кинетических параметров двухсубстратной реакции, катализируемой NAD-зависимой формиаатдегидрогеназой, иммобилизованной на пористом стекле.

Кинетические параметры ферментативных реакций могут существенно изменяться при иммобилизации катализатора вследствие его химической модификации и под влиянием носителя. Более того, влияние носителя (диффузионные затруднения, локальные изменения свойств растворителя вблизи поверхности матрицы) может приводить к значительным усложнениям кинетических уравнений [1—4]. В то же время определение активности иммобилизованных ферментов из-за гетерогенности среды методически существенно сложнее, особенно при использовании спектрофотометрических методов. В настоящее время определение активности иммобилизованных ферментов спектрофотометрическими методами, как правило, проводят с помощью систем, в которых реакционный объем отделен от измерительной кюветы пористым фильтром, не пропускающим в измерительную кювету рассеивающие свет частицы носителя [5—7]. В зависимости от задач, стоящих перед исследователем, а также особенностей носителя могут быть использованы реакторы колонного типа и реакторы идеального перемешивания [2, с. 81]. В данной работе описана методика, основанная на использовании проточного реактора идеального перемешивания в нестационарном режиме.

Схема установки, приведенная на рис. 1, включает в себя реактор с магнитной мешалкой, перистальтический насос и проточный спектрофотометр, соединенный с цифровым вольтметром. Система может быть использована для регистрации изменения оптической плотности как при проточном режиме работы реактора, так и в условиях периодического действия.

Теория предлагаемого метода. Если в реактор, содержащий постоянный объем реакционной смеси V , подается с объемной скоростью U раствор

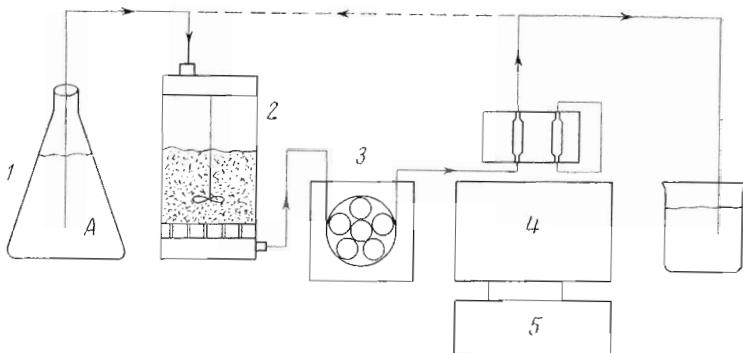


Рис. 1. Схема установки для определения кинетических параметров иммобилизованной форматдегидрогеназы: 1 — сосуд А, содержащий субстраты; 2 — реактор; 3 — насос; 4 — проточный спектрофотометр Unicord III; 5 — цифровой вольтметр. Пунктиром показано соединение реактора при его работе в периодическом режиме

субстрата с концентрацией $[S]_0$, дифференциальные уравнения, описывающие изменения во времени концентрации субстрата и продукта Р в реакторе [2, 8], имеют вид

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{U}{W} ([S]_0 - [S]) - v, \quad (1)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{U}{W} [P] + v, \quad (2)$$

где v — скорость реакции.

Для ферментативных реакций, описываемых уравнением Михаэлиса — Ментен, уравнения (1) — (2) принимают форму

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{U}{W} ([S]_0 - [S]) - \frac{V_{\text{эфф}} [S]}{K_{m(\text{эфф})} + [S]}, \quad (3)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{U}{W} [P] + \frac{V_{\text{эфф}} [S]}{K_{m(\text{эфф})} + [S]}. \quad (4)$$

Решение уравнений (3) — (4) в общем виде [2] не позволяет получить соотношений, удобных для определения эффективных значений констант Михаэлиса ($K_{m(\text{эфф})}$) и максимальной скорости реакции ($V_{\text{эфф}}$).

Сущность предлагаемой нами методики заключается в использовании уравнений (1) — (2) для преобразования экспериментальной зависимости $[P]$ от времени в зависимость скорости реакции v от концентрации субстрата, которая может быть проанализирована с помощью обычных методов, применяемых в ферментативной кинетике [9]. С этой целью запишем уравнение (4) в следующем виде:

$$\left(\frac{d[P]}{dt} + \frac{U}{W} [P] \right) = \frac{V_{\text{эфф}} [S]}{K_{m(\text{эфф})} + [S]}. \quad (5)$$

Поскольку величина $\left(\frac{d[P]}{dt} + \frac{U}{W} [P] \right)$ равна скорости ферментативной реакции, уравнение (5) аналогично уравнению Михаэлиса — Ментен и, следовательно, может быть линеаризовано стандартными методами, например в координатах $\left(\frac{d[P]}{dt} + \frac{U}{W} [P] \right)^{-1}$ от $[S]^{-1}$, аналогичных координатам Лайнуивера — Берка:

$$\left(\frac{d[P]}{dt} + \frac{U}{W} [P] \right)^{-1} = \frac{1}{V_{\text{эфф}}} + \frac{K_{m(\text{эфф})}}{V_{\text{эфф}}} \cdot \frac{1}{[S]}. \quad (6)$$

Если на выходе из реактора регистрируется как [P], так и [S], то экспериментальные зависимости [P] от t и [S] от t могут быть представлены в виде линейной зависимости типа (6), а величины K_m (эфф) и $V_{эфф}$ рассчитаны из отрезков, отсекаемых графиком $\left(\frac{d[P]}{dt} + \frac{U}{W} [P]\right)^{-1}$ от $[S]^{-1}$ на осях ординат и абсцисс. Для построения данного графика (помимо экспериментальных зависимостей [P] и [S] от времени) необходимо определить также величину $d[P]/dt$. Этот параметр можно получить из зависимости [P] от времени, проводя анализ графически или используя метод наименьших квадратов.

Данный метод применим и тогда, когда на выходе из реактора экспериментально определяется только концентрация продукта. В этом случае для каждого момента времени необходимо рассчитать концентрацию субстрата, используя интегральную форму уравнения (1). Для начальных условий [P] = [S] = 0 при $t = 0$ интегральная форма уравнения (1) имеет вид

$$[S] = [S]_0 \left(1 - e^{-\frac{U}{W} t}\right) - [P]. \quad (7)$$

С учетом (7) уравнение (6) может быть линеаризовано в координатах $\left(\frac{d[P]}{dt} + \frac{U}{W} \cdot [P]\right)^{-1}$ от $\{[S]_0 \left(1 - e^{-\frac{U}{W} t}\right) - [P]\}^{-1}$.

Определение кинетических параметров реакции, катализируемой иммобилизованной форматдегидрогеназой. С помощью предлагаемой методики были изучены кинетические свойства иммобилизованной форматдегидрогеназы (КФ 1.2.1.2), катализирующей окисление муравьиной кислоты до CO_2 при сопряженном восстановлении NAD до NADH. Выделение и изучение свойств растворимого фермента описаны нами ранее [10]. Для получения иммобилизованной форматдегидрогеназы было использовано пористое стекло (см. «Экспериментальную часть»).

Константы Михаэлиса для препаратов иммобилизованного фермента определяли двумя методами: обычным, из зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата при периодическом режиме работы реактора идеального перемешивания, и с помощью описанной выше методики, используя проточный реактор идеального перемешивания в нестационарном режиме. В первом случае реактор заполняли раствором, содержащим насыщающую концентрацию одного субстрата и необходимую концентрацию второго субстрата; величина начальной скорости рассчитывалась из тангенса угла наклона начального участка зависимости концентрации NADH от времени. Во втором случае реактор перед началом эксперимента заполняли раствором, содержащим лишь тот субстрат, концентрация которого поддерживалась насыщающей, а сосуд А (рис. 1), из которого раствор подавался в реактор, — смесью обоих субстратов. Подбор концентрации второго субстрата в сосуде А осуществлялся таким образом, чтобы за время эксперимента его концентрация в реакторе изменялась от 0 до величины, в 3—5 раз превосходящей значение константы Михаэлиса для данного субстрата. Наблюдаемую в экспериментах зависимость концентрации продукта от времени анализировали с помощью уравнений (6) — (7).

На рис. 2 представлены результаты одного из экспериментов, в котором варьировалась концентрация NAD при насыщающей концентрации формата. Кривая 1 представляет собой зависимость концентрации продукта от времени, а кривая 2 — зависимость концентрации NAD от времени, рассчитанную из уравнения (7). Концентрация NAD в сосуде А составляла $2,8 \cdot 10^{-4}$ М, концентрация формата в реакторе и сосуде А — 0,3 М. Скорость подачи раствора 2,8 мл/мин, объем реактора 30 мл. Активность иммобилизованного препарата форматдегидрогеназы 0,34 мкмоль/мин.

Измерения проводили при 25°, в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7, 0,01 М EDTA.

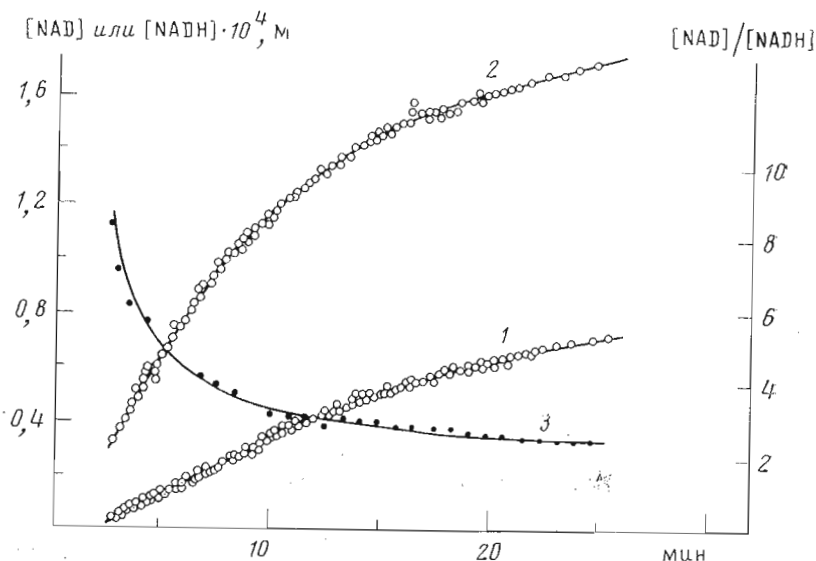


Рис. 2. Зависимость концентрации NADH (1) и NAD (2) и отношения $[NAD]/[NADH]$ (3) от времени при варьировании концентрации NAD

Для расчета величины $d[P]/dt$, необходимой при анализе данных на основании уравнения (6), для каждого момента времени проводилась прямая методом наименьших квадратов через 7 или 11 последовательных точек. Полученное из тангенса угла наклона прямой значение скорости изменения концентрации продукта от времени относили к средней точке из данной серии и к нему прибавляли величину скорости выноса NADH из реактора, равную $\frac{U}{W} [P]$. Таким образом, для n точек экспериментальной кривой, описывающей зависимость концентрации продукта от времени, получали $n - 6$ (при проведении прямой через 7 точек) и $n - 10$ (при проведении прямой через 11 точек) значений скорости реакций.

На рис. 3 показана зависимость скорости реакции от концентрации NAD в двойных обратных координатах. Рассчитанная из данного графика величина константы Михаэлиса для NAD составила $0,77 \cdot 10^{-4}$ М. Величина константы Михаэлиса, определенная из зависимости скорости реакции от концентрации NAD при периодическом режиме работы реактора (рис. 4 и 5), равнялась $1 \cdot 10^{-4}$ М. Полученные значения констант Михаэлиса согласуются друг с другом в пределах ошибки эксперимента, а также с величиной константы Михаэлиса, определенной для растворимого фермента в аналогичных условиях ($0,7 \cdot 10^{-4}$ М при 25° , pH 7,0).

Основным недостатком используемой методики является неравномерное распределение точек на графике $\left(\frac{d[P]}{dt} + \frac{U}{W} [P]\right)^{-1}$ от $[S]^{-1}$ вследствие экспоненциальной зависимости концентрации субстрата от времени. Чтобы устранить данный недостаток, можно изменять в ходе одного эксперимента концентрацию субстрата в сосуде А, из которого он подается в реактор. Допустим, что в момент времени t_1 концентрация субстрата на входе в реактор была изменена с $[S]_0$ до $[S]_1$. Тогда с учетом новых начальных условий уравнение (7) принимает следующую форму:

$$[S] = [S]_0 \left(1 - e^{-\frac{U}{W} t}\right) - [P] \quad \text{для } t < t_1,$$

$$[S] = [S]_1 + \left\{ [S]_0 \left(1 - e^{-\frac{U}{W} t}\right) - [P]_1 - [S]_1 \right\} e^{-\frac{U}{W} (t-t_1)} - [P] + [P]_1 \quad (8)$$

для $t > t_1$, где $[P]_1 = [P]$ при $t = t_1$.

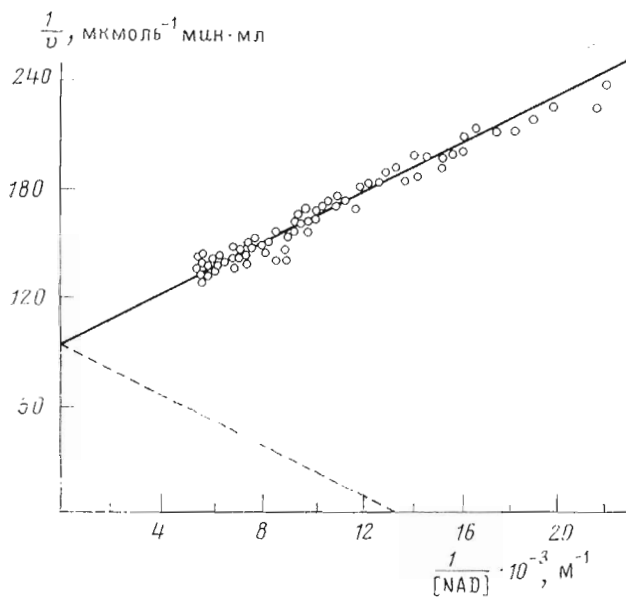


Рис. 3

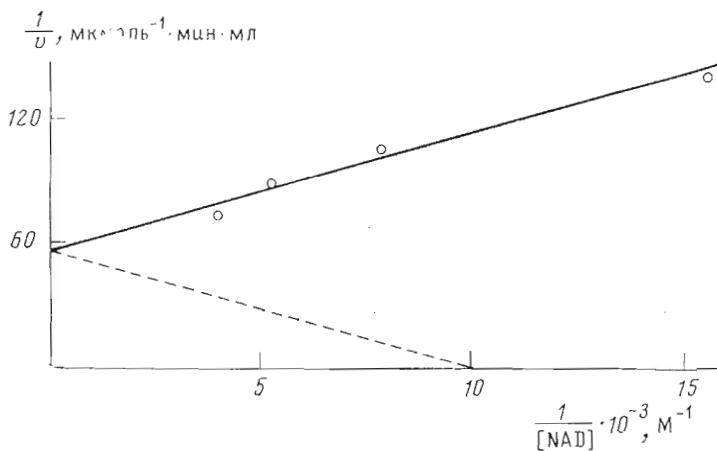


Рис. 4

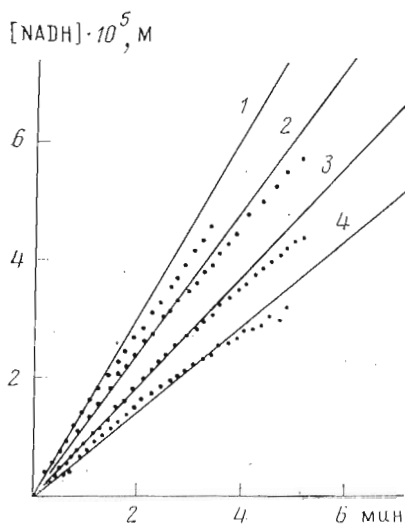


Рис. 5

Рис. 3. Зависимость в двойных обратных координатах скорости реакции, рассчитанной по формуле $v = d[P]/dt + \frac{U}{W} \cdot [P]$, от концентрации NAD для кривых, приведенных на рис. 2

Рис. 4. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации NAD в двойных обратных координатах для данных, представленных на рис. 5

Рис. 5. Зависимость концентрации NADH от времени при работе реактора в периодическом режиме. Концентрация формиата 0,3 М. Концентрации NAD (М): 1 — $2,5 \cdot 10^{-4}$; 2 — $1,8 \cdot 10^{-4}$; 3 — $1,1 \cdot 10^{-4}$; 4 — $0,65 \cdot 10^{-4}$ (фосфатный буфер pH 7,0; 0,01 М EDTA, 25°)

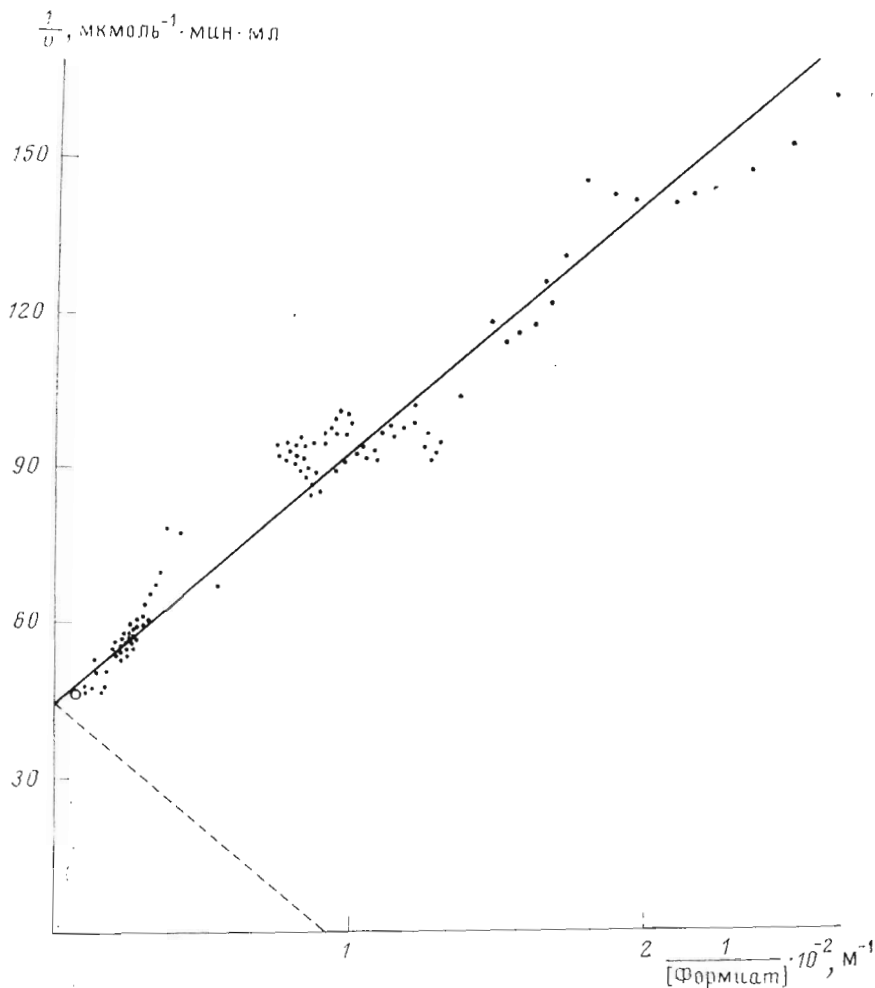


Рис. 6. Зависимость скорости реакции, рассчитанной по формуле $v = d[P]/dt + \frac{U}{W} [P]$, от концентрации формиата в двойных обратных координатах

Как следует из уравнения (8), изменение концентрации субстрата в реакторе происходит не по одной экспоненте, а по двум, что приводит к более равномерному распределению точек на графике $\left(\frac{d[P]}{dt} + \frac{U}{W} [P]\right)^{-1}$ от $[S]^{-1}$.

На рис. 6 представлена (в рамках уравнений (6) и (8)) зависимость скорости реакции от концентрации формиата при насыщающих концентрациях NAD. Варьирование концентрации формиата проводилось в две стадии: на первой концентрация формиата в сосуде А была 0,02 М, на второй — 0,1 М. Активность препаратов формиатдегидрогеназы составляла 0,67 мкмоль/мин, объем реактора — 30 мл, скорость подачи раствора в реактор 2,8 мл/мин (0,05 М фосфатный буфер, рН 7,0; 0,01 М EDTA, 25°). Две области, в которых точки лежат с наибольшей плотностью, соответствуют значениям концентрации формиата в реакторе, приближающимся к стационарным значениям, — в одном случае при концентрации в сосуде А, равной 0,02 М, в другом — 0,1 М.

Значение константы Михаэлиса для формиата, рассчитанное для данного графика, практически полностью совпадает с величиной, полученной в аналогичных условиях для растворимого фермента ($1 \cdot 10^{-2}$ М).

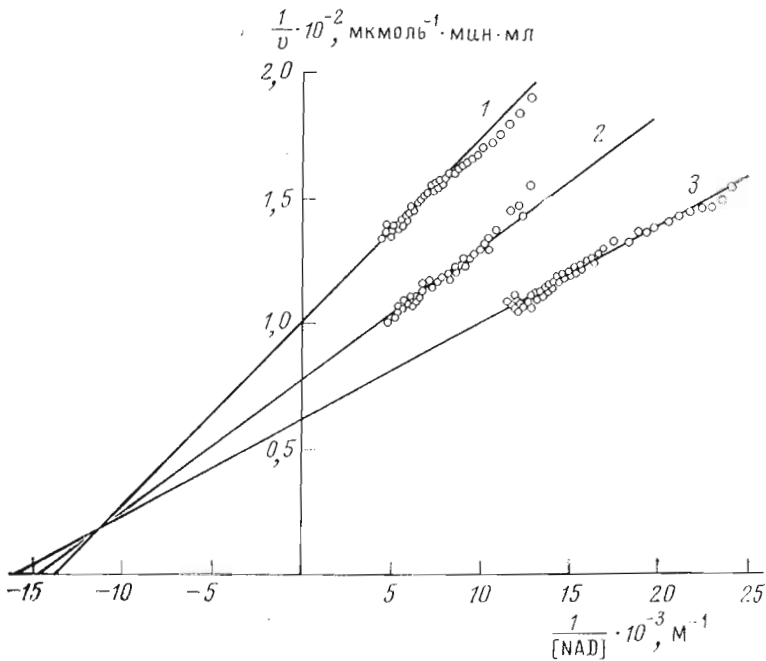


Рис. 7

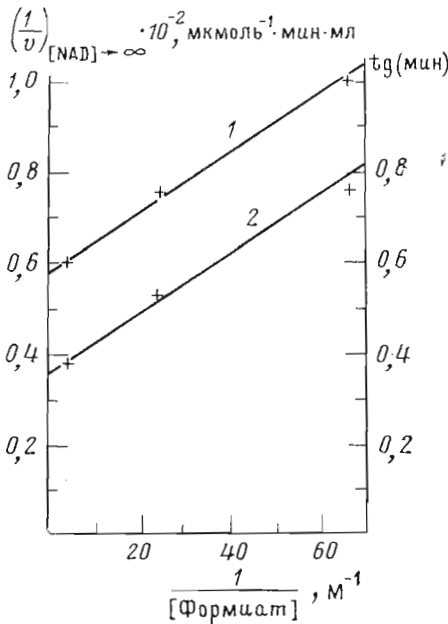


Рис. 8

Рис. 7. Зависимость скорости реакции от концентрации NAD в двойных обратных координатах. Концентрация формиата (М): 1 — 0,015; 2 — 0,04; 3 — 0,3. Объем реактора 50 мл, скорость подачи растворов 3,2 мл/мин, активность иммобилизованной формиатдегидрогеназы 0,8 мкмоль/мин (фосфатный буфер, рН 7,0; 0,01 М EDTA, 25°)

Рис. 8. Зависимость тангенсов угла наклона (1) и отрезков (2), отсекаемых на оси ординат, первичных графиков (рис. 7) от концентрации формиата

Описанная методика была применена также для изучения концентрационной зависимости скорости реакции при ненасыщающих концентрациях обоих субстратов. Для этого была поставлена серия из трех экспериментов, в каждом из которых варьировалась концентрация NAD. Поскольку скорость подачи формиата в реактор (минимальная величина $1,2 \cdot 10^{-4}$ М/мин) во всех экспериментах была существенно выше скорости ферментативной реакции (максимальная величина $2 \cdot 10^{-6}$ М/мин), концентрацию формиата в каждом эксперименте считали постоянной и равной начальной.

На рис. 7 и 8 приведены результаты, полученные из данной серии опытов. В двойных обратных координатах зависимости скорости реакции от концентрации NAD при нескольких фиксированных концентрациях формиата представляют собой прямые, пересекающиеся в точке, лежащей в левом верхнем квадранте. Наблюдаемая зависимость описывается уравнением

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_n}{[N]} + \frac{K_f}{[F]} + \frac{K_{nt}}{[N] \cdot [F]} \right),$$

где [N] и [F] — концентрации NAD и формиата; K_n и K_f — константы Михаэлиса соответствующих субстратов.

Значение смешанной константы (K_{nt}), рассчитанное из вторичных графиков (рис. 8), оказалось равным $1,1 \cdot 10^{-6} \text{ M}^2$, что в пределах экспериментальной ошибки совпадает со значением, полученным при тех же условиях для растворимого фермента ($(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-6} \text{ M}^2$).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что иммобилизация формиатдегидрогеназы на пористом стекле не приводит к изменениям кинетических параметров фермента, за исключением величины удельной активности. Последнее, вероятно, связано с инактивацией части фермента в результате иммобилизации.

Одним из возможных практических применений формиатдегидрогеназы является создание на ее основе системы регенерации NADH. С этой точки зрения формиатдегидрогеназа имеет ряд преимуществ по сравнению с другими ферментными системами, поскольку конечный продукт реакции, катализируемой формиатдегидрогеназой, — CO_2 , что делает реакцию необратимой и позволяет достигать практически любой глубины превращения NAD в NADH. Полученные значения кинетических констант для формиатдегидрогеназы, иммобилизованной на пористом стекле, дают возможность проводить теоретические расчеты глубины превращения NAD в NADH в реакторах идеального перемешивания, а также являются отправными точками для изучения реакции в реакторах колоночного типа, где протекание реакции может существенно осложняться диффузионными эффектами.

Использованная нами методика может быть эффективно применена при изучении других иммобилизованных ферментов. В отличие от близкого по своему характеру интегрального метода, применяемого при изучении растворимых ферментов [11], данный метод позволяет при соответствующем подборе условий (скорость подачи раствора в реактор, объем реактора, активность препаратов иммобилизованного фермента) избежать накопления высоких концентраций продукта реакции. Это особенно важно при изучении реакций, ингибирующихся продуктами. Второе важное преимущество заключается в том, что данный метод особенно полезен при изучении двухсубстратных реакций. Так, для реакции, катализируемой формиатдегидрогеназой, интегральный метод не мог быть применен из-за высокой величины константы Михаэлиса для формиата, поскольку варьирование концентрации формиата в области $\sim 10^{-2} \text{ M}$ за счет протекания реакции практически не может быть достигнуто и, кроме того, требует поддержания в системе исключительно высоких концентраций NAD (выше 10^{-2} M).

Экспериментальная часть

Препараты формиатдегидрогеназы были получены из метилотрофных бактерий *Bacterium sp. 1* по методике, включающей фракционирование сульфатом аммония и хроматографию на DEAE-целлюлозе [10]. Содержание формиатдегидрогеназы в препаратах, по данным аналитического электрофореза и скоростного аналитического ультрацентрифугирования,

составляло 90% от общего количества белка. Удельная активность препаратов была равна 6,5 мкмоль/мг белка.

Иммобилизацию фермента проводили на аминированном стекле (CPG) фирмы Electronucleonics (США) согласно методике, описанной в работе [12]. Диаметр пор носителя 1377 Å, объем пор 0,92 см³/г носителя, поверхность — 17,5 м²/г. Перед проведением иммобилизации стекло ишкубировали в 1% растворе глутарового альдегида при рН 7,0 в течение 3 ч при непрерывном перемешивании и тщательно отмывали дистиллированной водой на стеклянном фильтре. Затем 0,5 г активированного стекла вносили в 20 мл раствора фермента (2 мг/мл) в фосфатном буфере, рН 7,0, содержащем 0,01 М EDTA. Когда активность формиатдегидрогеназы в растворе достигала некоторого постоянного уровня, стекло промывали вышеуказанным буфером, содержащим 1 М NaCl. Количество фермента, связанного с носителем, рассчитывали по разности величин активности фермента в растворе до иммобилизации и после с учетом активности в промывных водах. В работе были использованы препараты иммобилизованной формиатдегидрогеназы, содержащие максимальное количество связанного фермента (20 мг/г носителя). Концентрацию NADH на выходе из реактора определяли по величине оптической плотности при 341 нм с помощью проточного спектрофотометра Uvicord III (ЛКВ, Швеция), соединенного с цифровым вольтметром. Показания вольтметра регистрировались через каждые 10 или 15 с после начала эксперимента.

Величину активности препаратов иммобилизованной формиатдегидрогеназы рассчитывали из начального участка кривой, описывающей зависимость концентрации NADH от времени при работе реактора в периодическом режиме при концентрациях NAD 1,5 · 10⁻³ М и формиата 0,3 М. Анализ экспериментальной зависимости [P] от *t* проводили по уравнениям (6) и (8). Для расчета зависимости величины *d* [P]/*dt* от времени использовали микрокомпьютер ККС-324 Г (при расчете тангенса угла наклона по 7 точкам кривой [P] от *t*) или ЭВМ «Наири» (при проведении расчетов по 11 точкам).

Авторы глубоко признательны д-ру хим. наук К. Мартинеку за помощь, оказанную при написании работы, а также д-ру хим. наук Б. И. Курганову за полезное обсуждение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Клибанов А. М., Мартинек К. (1975) Успехи химии, 44, 17—47.
2. Иммобилизованные ферменты (1976) (под ред. Березина И. В., Антонова В. К., Мартинек К.), т. 2, с. 18—83, Изд-во МГУ.
3. Полторак О. М., Пряхин А. Н., Шайтан И. В., Митрофанова А. Н., Чухрай Е. С. (1975) Вестн. Моск. ун-та. Сер. «Химия», № 5, 544—550.
4. Hamilton B. K., Gardner C. R., Colton C. K. (1974) Immobilized Enzymes in Food and Microbiology, pp. 205—224, N. Y.—London.
5. Widmer F., Dixon J. E., Kaplan N. O. (1973) Anal. Biochem., 55, 282—287.
6. Ford J. R., Lambert A. H., Cohen W., Chambers R. P. (1972) Biotechnol. and Bioeng. Symposium No. 3, 267—284.
7. Ngo T. T., Bunting P. S., Laidler K. J. (1975) Can. J. Biochem., 53, 11—14.
8. Скибда И. П., Майзус З. В., Эммануэль Н. М. (1969) Успехи химии, 38, 3—40.
9. Яковлев В. А. (1965) Кинетика ферментативного катализа, с. 42, «Наука», М.
10. Родионов Ю. В., Авилова Т. В., Захарова Е. В., Платоненкова Л. С., Егоров А. М. (1974) Тезисы первой республиканской конференции молодых химиков Эстонии, Таллин.
11. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) Практический курс ферментативной кинетики, с. 166, Изд-во МГУ.
12. Weetall H. H., Hawcswala N. B. (1972) Enzyme Engineering (Wingard L. B., ed.), pp. 245, Intersci. Publ., N. Y.

Поступила в редакцию
31.III.1977

**A STUDY OF IMMOBILIZED FORMATE DEHYDROGENASE
UNDER UNSTATIONARY CONDITIONS IN THE FLOW REACTOR
OF IDEAL MIXING**

RODIONOV Ya. V., VALEEV N. N., KISELEVA Z. L., BEREZIN I. V.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow;
S. M. Kirov Chemical Technology Institute, Kazan*

A method for measuring the kinetic parameters of the reactions catalyzed by immobilized enzymes has been suggested which provides the K_m and V_{max} values from a single run. The procedure involves continuous registration of the product concentrations using the flow reactor of ideal mixing operated under unstationary conditions. The method was applied to study the kinetic parameters in the two-substrate reaction catalyzed by NAD dependent formate dehydrogenase immobilized on the porous glass.
