



УДК 541.64 + 577.15.022

**ПОВЫШЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ПРИ КОВАЛЕНТНОМ ПРИСОЕДИНЕНИИ К ВОДОРАСТВОРИМОМУ
СОПОЛИМЕРУ 4-ВИНИЛПИРИДИНА И АКРОЛЕИНА**

*Диков М. М., Осипов А. П., Егоров А. М., Березин И. В.,
Кири Ю. Э., Лебедева Т. С., Кабанов В. А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Исследовано взаимодействие водорастворимого кватернизованного сополимера 4-винилпиридина и акролеина с формиаатдегидрогеназой из граммотрицательных мезофильных бактерий штамм 1. Методом седиментационного анализа показано, что фермент и полимер образуют водорастворимый комплекс с весовым соотношением приблизительно 2 : 1. Найдено, что при образовании комплекса сохраняется высокая каталитическая активность фермента, а его стабильность при 37° возрастает в 100—350 раз. Максимальный эффект стабилизации полимером наблюдается в присутствии субстрата. Проведено сравнение стабилизирующего действия кватернизованного поли-4-винилпиридина и кватернизованного сополимера 4-винилпиридина с акролеином на фермент. Отмечается существенная роль электростатических фермент-полимерных взаимодействий в процессе стабилизации формиаатдегидрогеназы полимером. Изучено влияние сополимера 4-винилпиридина с акролеином на кинетические свойства фермента.

Одной из важнейших задач химической энзимологии является разработка научных принципов стабилизации ферментов. Успешное решение этой проблемы позволит получить стабильные ферментные препараты, которые могут найти широкое применение в медицине, химической технологии, пищевой промышленности, для аналитических целей и т. д. [1, 2].

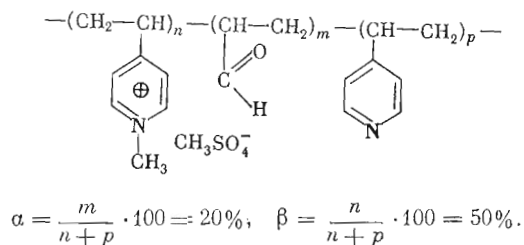
В последнее время благодаря развитию способов иммобилизации ферментов на носителях удалось создать препараты, обладающие более высокой стабильностью по сравнению с нативными ферментами [2]. Один из общих предложенных недавно подходов к решению проблемы стабильности основан на дополнительной фиксации уникальных конформаций макромолекул путем многоточечного связывания их с комплементарной поверхностью носителя [3]. Повышение жесткости белковой глобулы в результате многоточечного присоединения фермента к носителю затрудняет ее разворачивание, т. е. осуществление начальной и существенной стадии денатурации. Этот подход удалось осуществить при многоточечном связывании ферментов (химотрипсин, трипсин) с поверхностью *водонерастворимых* носителей. Однако в случае ферментов, имеющих сложную четвертичную структуру, проявление каталитической активности, по всей вероятности, включает в себя стадии конформационных перестроек. Поэтому в более широком плане проблема стабилизации ферментов при много-

Сокращения: СВПА — кватернизованный сополимер 4-винилпиридина и акролеина; ПВП — частично кватернизованный поли-4-винилпиридин.

точечном присоединении к носителю связана с вопросом о сохранении динамических свойств молекул белка после иммобилизации.

В некоторых случаях, например при проведении процессов, в которых участвуют водонерастворимые субстраты, необходимо использовать водонерастворимые стабильные ферментные препараты. К настоящему времени опубликован ряд работ по иммобилизации ферментов на водорастворимых полимерных матрицах [4—9] с применением, в частности, сополимеров, содержащих альдегидные и аминогруппы, или полимеров, активированных глутаровым диальдегидом. Описаны водорастворимые комплексы ферментов с полиэлектролитами и изучено влияние полиэлектролитов на стабильность и кинетические свойства ряда ферментов [10—17]. Для целей стабилизации ферментов применяли также полимеры на основе винилпирролидона, не содержащие реакционноспособных групп [18, 19]. Анализ литературы свидетельствует о том, что в большинстве случаев стабильность модифицированных ферментов лишь в несколько раз превышает стабильность нативных препаратов. Возможно, что взаимодействие, реализующееся в такого рода растворимых комплексах, не позволяет сделать структуру ферментной глобулы достаточно жесткой. Кроме того, в противоположность нерастворимым носителям цепи полимеров в растворе обладают конформационной подвижностью и в определенных условиях могут сами разворачиваться, например при повышении температуры. Тем не менее несомненно, что поиск водорастворимых полимеров для целей стабилизации ферментов также следует проводить, исходя из принципа многоочечного взаимодействия фермента с носителем. Как неоднократно указывалось, различные свойства ферментов, в том числе и стабильность, весьма чувствительны к микроокружению белковой молекулы [20, 21]. Можно надеяться, что применение для иммобилизации ферментов синтетических водорастворимых полимеров, для которых в широких пределах можно варьировать заряд, степень гидрофобности, жесткость и размеры макромолекул при правильном их подборе, позволит существенным образом влиять на микроокружение, а следовательно, и на стабильность.

Основываясь на принципе многоочечного взаимодействия носителя с ферментом и учитывая возможное влияние микроокружения, мы попытались использовать для стабилизации NAD-зависимой формилдегидрогеназы кватернизованный сополимер 4-винилпиридина и акролеина [22]:



Альдегидные группы СВПА могут ковалентно связываться с ферментом в результате реакции с его аминогруппами. При этом на поверхность белковой молекулы накладывается нечто вроде скобок, которые должны сделать его структуру более жесткой. Кроме того, полимер-носитель представляет собой заряженный полиэлектролит. Можно ожидать, что электростатические взаимодействия при подходящих условиях будут дополнительно стабилизировать фермент. Наконец, СВПА обладает способностью связывать ионы тяжелых металлов [23]. Поэтому, если фермент содержит в своем составе чувствительные к окислению и влияющие на его стабильность SH-группы, носитель сможет оказывать защитное действие, иммобилизуя примесные количества ионов тяжелых металлов и предотвращая их участие в катализе реакции окисления.

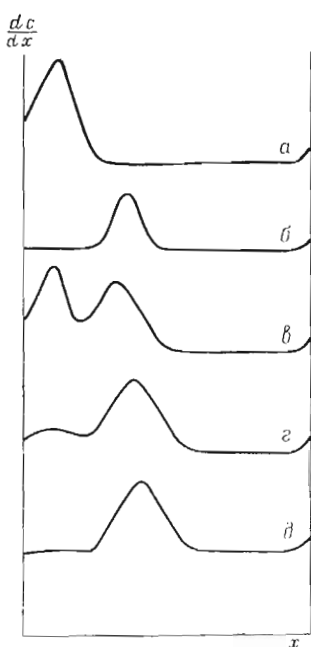


Рис. 1. Седиментограммы СВПА (а) и форматдегидрогеназы (б) и их смесей при различных весовых соотношениях фермент—СВПА: 2 : 5 (в); 1 : 1 (г); 2 : 1 (д). Условия опыта: время центрифугирования 60 мин, скорость вращения ротора 56000 об/мин, температура 20°, 0,05 М фосфатный буфер, рН 7,5

Первый пик на седиментограмме соответствует свободному сополимеру. При сопоставлении седиментограмм а и в (концентрация СВПА в обоих случаях одинакова) видно, что при добавлении фермента к раствору полимера пик, соответствующий свободному СВПА, уменьшается. Это свидетельствует о том, что часть полимера дополнительно связывается, образуя комплекс с белком. Коэффициент седиментации комплекса (при весовом соотношении СВПА — фермент в растворе 2 : 1), равный 5,15 S, превышает значение коэффициента, характеризующего нативный фермент (4,85S). Информация о составе комплекса может быть получена при центрифугировании смесей с различным весовым соотношением фермент — полимер. При весовом соотношении фермент — полимер ≈ 2 площадь пика свободного полимера мала; при избытке полимера только часть его связывается с ферментом. Приближенная оценка мольного состава комплекса на основе данных седиментационного анализа, если принять молекулярный вес полимера $\approx 40 \cdot 10^3$ (кватернизованный сополимер), соответствует связыванию в среднем одной молекулой белка одной макромолекулы полимера. (В дальнейшем, кроме специально оговоренных случаев, все исследования проводились в растворах при весовом соотношении фермент—СВПА 2 : 1, когда свободный полимер в растворе практически отсутствует.)

Результаты изучения инактивации нативной форматдегидрогеназы и ее комплекса с сополимером при 37° свидетельствуют о том, что кинетика инактивации фермента (рис. 2, 1, 2) не подчиняется уравнению первого порядка, однако процесс является мономолекулярным, так как ход кривых не зависит от начальной концентрации фермента. Поэтому для харак-

NAD-зависимая форматдегидрогеназа из грамотрицательных метилотрофных бактерий штамм 1 катализирует окисление формиата до углекислого газа [24, 25]. Фермент имеет молекулярный вес $\sim 80\,000$ и состоит из двух идентичных субъединиц. По аналогии со структурой других дегидрогеназ следует предположить, что в состав каждой субъединицы входят два домена: связывающий кофактор и связывающий субстрат [26]. Учитывая сложность архитектуры дегидрогеназ, не приходится удивляться, что после иммобилизации на твердых носителях они обычно сохраняют лишь 5—20% первоначальной активности [2]. В случае форматдегидрогеназы ранее было показано [24], что основным процессом, обуславливающим ее инактивацию, является окисление двух SH-групп. Стабилизирующее действие оказывает добавление в инкубационную смесь сульфгидрильных реагентов, этилендиаминтетрауксусной кислоты, связывающей ионы тяжелых металлов и в меньшей степени субстрата и кофактора.

Для определения возможности комплексобразования СВПА и фермента и состава комплекса был использован метод седиментационного анализа. Седиментограммы СВПА, форматдегидрогеназы и их смесей при различных весовых соотношениях после предварительной инкубации в течение 20 ч (рис. 1) показывают, что при избытке сополимера система характеризуется бимодальным распределением седиментирующих веществ.

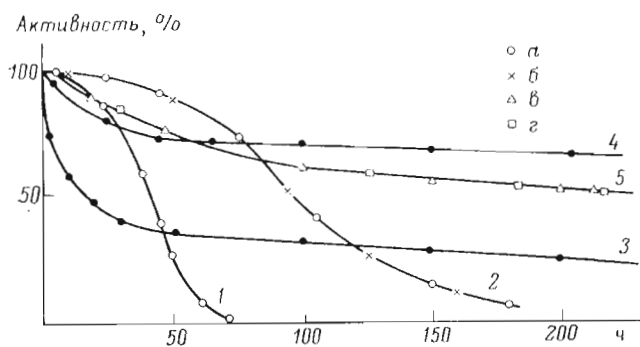


Рис. 2

Рис. 2. Кинетические кривые мономолекулярной термоинактивации нативной и модифицированной форматдегидрогеназы: 1 — нативный фермент, 2 — в присутствии 0,3 М формата (а) или ацетата натрия (б), 3 — в комплексе с СВПА, 4 — в комплексе с СВПА в присутствии 0,03 М формата, 5 — в комплексе с СВПА (а) (весовое соотношение фермент — ПВП 2 : 1) или в комплексе с СВПА (а) при pH 5,8. Условия опыта: температура инкубации 37°, 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,5, концентрация фермента $1,5 \cdot 10^{-6}$ М

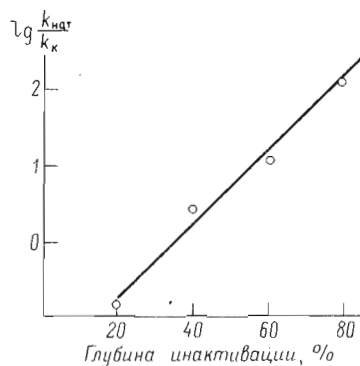


Рис. 3

Рис. 3. Логарифм отношения кажущихся значений констант скорости первого порядка, наблюдаемых для мономолекулярной инактивации нативной форматдегидрогеназы ($k_{\text{нат}}$) и фермента в комплексе с СВПА ($k_{\text{к}}$) в зависимости от глубины превращения. Условия опыта те же, что на рис. 2.

Характеристики процессов инактивации можно использовать кажущуюся константу скорости первого порядка процесса инактивации, измеренную на определенной глубине превращения [27]. Присутствие полимера оказывает значительное влияние на характер инактивации (рис. 2, 1 и 3). Вначале, когда нативный фермент еще практически сохраняет активность, присутствие в системе СВПА приводит к ее быстрой частичной потере. В то же время на стадиях, когда нативная форматдегидрогеназа быстро теряет активность, в присутствии СВПА наблюдается лишь медленная инактивация, описываемая уравнением первого порядка. Можно предположить, что сополимер влияет на стадию инактивации фермента, которая, как считают, связана с окислением двух SH-групп, находящихся в активном центре форматдегидрогеназы [24].

Сравнение кажущихся констант скоростей первого порядка, измеренных для мономолекулярного процесса инактивации комплекса и нативного фермента (рис. 3), показывает, что комплекс фермента с полимером обладает существенно большей стабильностью по сравнению с нативным ферментом. Наблюдаемый эффект стабилизации зависит от глубины инактивации. Так, скорость инактивации комплекса примерно в 120 раз меньше, чем для исходного фермента, на глубине превращения 80%.

Образующийся комплекс полимер — фермент обладает высокой устойчивостью, как было показано рядом экспериментов. Установлено, что при разбавлении, а также в растворах с высокой ионной силой активность фермента, модифицированного полимером, не восстанавливается.

Форматдегидрогеназу и СВПА оказывается невозможным разделить на сефадексе G-200, сефарозе 4В и других сефадексах. При электрофорезе в полиакриламидном геле смеси фермента и СВПА в весовом соотношении 2 : 1 белок в гель не входит, а при электрофорезе смесей, содержащих избыток фермента, полоса, соответствующая белку при окраске амидо-черным, имеет меньшую интенсивность, чем в контроле, содержащем такое же количество белка.

Поскольку СВПА имеет свободные альдегидные группы, способные взаимодействовать с аминогруппами форматдегидрогеназы, было про-

**Остаточная ферментативная активность комплекса
формиадегидрогеназы с СВПА через 12 ч инкубации
и константы инактивации второй стадии при различных
значениях рН**

рН	Остаточная активность, %	$k_{ин} \cdot 10^3,$ мин ⁻¹	рН	Остаточная активность, %	$k_{ин} \cdot 10^3,$ мин ⁻¹
5,80	94	1,5	7,90	55	3,5
6,32	85	1,8	8,55	34	—
6,77	75	2,0	9,05	26	—
7,50	62	2,4			

ведено сравнение действия СВПА и формальдегида на фермент. Оказалось, что кинетика начального падения активности фермента в обоих случаях одинакова. Кроме того, было показано, что при обработке фермента формальдегидом число модифицированных аминогрупп коррелирует с падением активности.

Известно, что формиадегидрогеназа имеет две существенные для активности сульфгидрильные группы [24], которые также могут взаимодействовать с альдегидными группами носителя. Однако титрованием SH-групп фермента дитионитробензойной кислотой до и после обработки полимером было установлено, что эти SH-группы белка полимером не модифицируются, поскольку кинетика титрования в обоих случаях одинакова.

Таким образом, можно полагать, что СВПА и формиадегидрогеназа образуют ковалентный комплекс весового состава 2 : 1 за счет взаимодействия альдегидных групп полимера и аминогрупп фермента.

Для выяснения природы стабилизирующего влияния полимера на фермент проведено изучение инактивации и процесса образования комплекса в области рН от 5,8 до 9, а также влияния аналога СВПА — частично кватернизованного поливинилпиридина, в котором отсутствуют альдегидные группы, способные образовывать ковалентные связи с ферментом.

Как уже отмечалось, в присутствии полимера процесс инактивации можно разбить на две стадии. На первой происходит относительно быстрая потеря активности, обусловленная взаимодействием полимера с ферментом. Вторая стадия хорошо описывается уравнением первого порядка и отражает собственно процесс инактивации комплекса. Данные по рН-зависимости остаточной активности фермента после 12 ч инкубации с СВПА (время, в течение которого активность нативного фермента практически сохраняется постоянной) и константы первого порядка инактивации комплекса, определенной для второй медленной стадии процесса (таблица), свидетельствуют о том, что остаточная ферментативная активность сильно зависит от рН и монотонно убывает при увеличении рН от 5,8 до 9. В то же время константа инактивации $k_{ин}$ в этой области рН меняется мало. Стабильность нативной формиадегидрогеназы также незначительно зависит от рН в исследуемом диапазоне. Поскольку известно, что скорость реакции между альдегидными и аминогруппами возрастает с увеличением рН до 8—9 [28], можно полагать, что полученные при разных значениях рН комплексы различаются количеством ковалентных связей между ферментом и полимером. (Возможно также, что при различных значениях рН полимер образует связи с разными группами фермента.) Отсюда можно сделать вывод, что образование ковалентных связей в полимер-ферментном комплексе незначительно влияет на изменение стабильности фермента.

Чтобы выяснить роль электростатических факторов, было проведено сравнение стабилизирующего действия СВПА и полимера без альдегидных групп и частично кватернизованного бутилбромидом ПВП, способного образовывать ионные комплексы с белками. Из рис. 2 (кривая 5) следует, что действие ПВП при рН 7,5 в точности совпадает с действием СВПА

при рН 5,8, т. е. в области рН, далекой от оптимума образования ковалентных связей (скорость инактивации нативной формиатдегидрогеназы при рН 5,8 и 7,5 различается незначительно). В обоих случаях отсутствует стадия, связанная с быстрой потерей активности при образовании ковалентного комплекса. В то же время стабильность чисто ионных комплексов имеет тот же порядок, что и для комплексов, образованных с участием ковалентных взаимодействий. Это дает основание предполагать, что главная роль в стабилизации принадлежит электростатическим фермент-полимерным взаимодействиям.

Что касается возможной роли СВПА как комплексообразующего агента, связывающего в водном растворе ионы тяжелых металлов, которые, как предполагается, катализируют окисление важных для активности SH-групп, то полученные результаты пока не позволяют сделать конкретных выводов. В настоящий момент эти исследования проводятся.

Как отмечалось выше, образование комплекса фермента с полимером сопровождается некоторым падением активности фермента. Вероятно, СВПА, сорбируясь на белковых молекулах, блокирует важные для катализа функциональные группы фермента или неблагоприятным образом изменяет нативную конформацию. Можно было предположить, что указанные факторы в какой-то мере удастся исключить, если сорбировать на носителе фермент, находящийся в «рабочем» состоянии, т. е. получить комплекс формиатдегидрогеназы и сополимера в присутствии субстрата или кофактора.

Действительно, при концентрации формиата натрия 0,03 М ингибирующее действие СВПА снимается, $k_{ин}$ при этом уменьшается до $6,6 \cdot 10^{-6} \text{ мин}^{-1}$ (рис. 2, 4). Скорость инактивации в присутствии субстрата и полимера на 80%-ной глубине инактивации приблизительно в 350 раз меньше по сравнению с нативным ферментом. Отметим, что анионы, не взаимодействующие специфически с ферментом, такие, как ClO_4^- , CH_3COO^- , Cl^- , в той же концентрации (0,03 М) не оказывают защитного действия на фермент при образовании комплекса формиатдегидрогеназы с СВПА.

Интересно, что NAD и NADH не оказывают столь же сильного защитного влияния при связывании фермента с СВПА и мало влияют на стабильность фермента в комплексе (NAD стабилизирует нативный фермент примерно в 2 раза). Этот факт указывает на то, что домен, связывающий субстрат, подвержен действию СВПА в большей степени, чем домен, связывающий кофактор. Последнее предположение подтверждают также данные по определению кинетических параметров ферментативной реакции в присутствии СВПА. Как видно из рис. 4 и 5, наблюдается смешанный тип ингибирования формиатом, тогда как ингибирование NAD носит неконкурентный характер.

Как указывалось выше, СВПА представляет собой достаточно сильно заряженный полиэлектролит. Известно, что полиэлектролиты способны сильно воздействовать на свойства ферментов за счет влияния электростатического поля полиэлектролита на константы ионизации ионогенных групп ферментов и на распределение реагентов в сфере действия молекулы полиэлектролита. Представленные на рис. 6 рН-зависимости активности для нативной формиатдегидрогеназы и комплекса фермент — СВПА показывают, что кривая рН-зависимости для комплекса сдвигается на 0,5 единицы рН в кислую область.

Таким образом, предложенный метод модификации формиатдегидрогеназы водорастворимым СВПА позволяет достаточно просто получить высокоактивные стабильные ферментные препараты. Одним из достоинств полимер-ферментных комплексов такого типа является то, что благодаря присутствию на полимерной цепи свободных альдегидных групп, не вступивших в реакцию с ферментом, комплексы могут быть в свою очередь иммобилизованы на различного типа макропористых твердых подложках, содержащих свободные аминогруппы (например, на аминиламинирован-

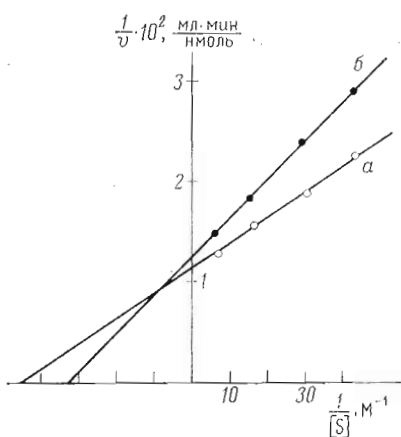


Рис. 4

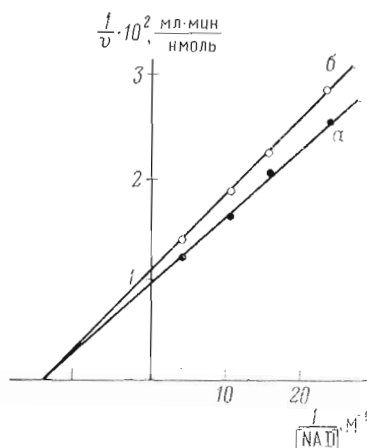


Рис. 5

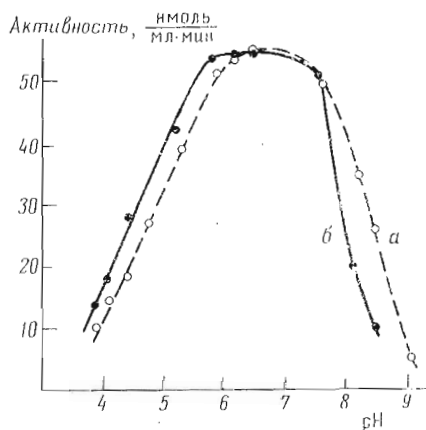


Рис. 6

Рис. 4. Зависимость обратных величин начальной скорости окисления формата от его концентрации: *a* — нативный фермент, *b* — соотношение фермент — СВПА 2 : 1. Условия опыта те же, что на рис. 2, концентрация NAD 1 мг/мл

Рис. 5. Зависимость обратных величин начальной скорости окисления формата от концентрации NAD: *a* — нативный фермент, *b* — соотношение фермент — СВПА 2 : 1. Условия опыта те же, что на рис. 2; концентрация формата 0,3 М

Рис. 6. Зависимость от pH активности нативной форматдегидрогеназы (*a*) и комплекса фермент — СВПА (*b*). Условия опыта: температура 37°, 0,05 М фосфатный или боратный буфер, концентрация фермента $1,5 \cdot 10^{-6}$ М

ных силохромах). Кроме того, наличие кватернизованных пиридиновых колец, несущих положительный заряд, позволяет проводить адсорбционную иммобилизацию ферментных комплексов на твердых носителях, имеющих отрицательный заряд.

Экспериментальная часть

Форматдегидрогеназа была выделена из граммотрицательных метилотрофных бактерий штамм 1 согласно методике [24], включавшей фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию. Полученный препарат был гомогенным по данным аналитического электрофореза и скоростной седиментации. При исследовании стабильности фермента и его комплексов с полимерами белок обессоливали на колонке ($0,9 \times 30$ см) с сефадексом G-50, освобождаясь от EDTA, добавляемого при хранении фермента [24].

Сополимер, содержащий альдегидные группы (СВПА), синтезировали радикальной полимеризацией 4-винилпиридина с акролеином в диметилформамиде в присутствии азобисизобутиронитрила. Полученный полимер выделяли осаждением при добавлении раствора к диэтиловому эфиру. Сополимер фракционировали на 5 фракций из метанольного раствора этилацетатом. Удельная вязкость (η) используемой фракции сополимера

в 92% этаноле составляет 0,18 дл/г. Молекулярный вес (M) этой фракции, вычисленный по формуле $[\eta] = 1,2 \cdot 10^{-4} M^{0,73}$, предложенной для сополимера 4-винилпиридина [29], составил $\sim 40 \cdot 10^3$. Содержание альдегидных групп в сополимере определяли из спектров ПМР оксимированных сополимеров с $CD_3 - SO - CD_3$. Водорастворимый сополимер синтезировали путем кватернизации сополимера 4-винилпиридина с акролеином соответствующим количеством диметилсульфата. Степень кватернизации определяли из ПМР-спектров сополимера в $CD_3 - CD_2 - OH$. Использовали также водорастворимый сополимер на основе поли-4-винилпиридина ($M 30 \cdot 10^3$), частично кватернизованный бутилбромидом на 30% [30].

NAD (Reanal, Венгрия) использовали без дальнейшей очистки, сефадексы и сефароза 4В — коммерческие препараты Pharmacia (Швеция). Остальные реагенты — соли, компоненты буферных растворов, кислоты — препараты аналитической степени чистоты.

Активность растворимого фермента определяли в анализаторе скоростей ферментативных реакций (модель 8600, ЛКВ, Швеция) при 37° и концентрации NAD 1,6 мМ и формиата 0,3 М в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,5).

Скоростное аналитическое ультрацентрифугирование проводили в аналитической ультрацентрифуге Spinco E (Beckman, ФРГ) при 20° в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,5) при 56000 об/мин. Концентрация белка в ячейке составляла 4 мг/мл; концентрацию полимера варьировали от 1 до 10 мг/мл. Растворы предварительно инкубировали в течение 20 ч при 37°. Значение коэффициентов седиментации рассчитывали из величин тангенсов угла наклона графиков временной зависимости расстояния от вершины пика до оси вращения.

Аналитический электрофорез осуществляли в 7% полиакриламидном геле при рН 8,6 согласно [31] на приборе фирмы Pharmacia (Швеция).

Комплексы фермента с полимерами получали при добавлении раствора полимера к раствору фермента в буфере либо в растворе, содержащем 0,3 М формиат или ацетат натрия, или NAD в концентрации 1 мг/мл. Определение кинетических параметров реакции проводили при рН 7,6, предварительно инкубируя приготовленные растворы в течение 20 ч при 37°.

Для получения буферных растворов с рН от 5,8 до 8,0 использовали $NaH_2PO_4 - NaOH$, а с рН от 8,0 до 9,0 — $Na_2B_2O_7 - H_3BO_3$. Концентрация буферных растворов составляла 0,05 М.

Модификацию аминокрупп фермента формальдегидом проводили в фосфатном буфере при рН 8,0. Свободные аминокруппы оттитровывали нитробензолсульфокислотой в том же буфере, регистрируя увеличение оптической плотности при 420 нм. Титрование SH-групп фермента осуществляли при рН 7,8 с использованием дитиобиснитробензойной кислоты, регистрируя оптическую плотность при 412 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zaborsky O. R. (1973) Immobilized Enzymes, с. 127—144, CRC. Press, Cleveland Ohio.
2. Имобилизованные ферменты (1976) Березин И. В., Антонов В. К., Мартынек К., ред., т. 2, с. 109—261, Изд-во МГУ, М.
3. Мартынек К., Гольдмахер В. С., Клибанов А. М., Торчилина В. Н., Смирнов В. Н., Чазов Е. Н., Березин И. В. (1976) Докл. АН СССР, 228, 1468—1471.
4. Snyder P. D., Wold F., Bernlohr R. W., Dullium C., Desnick R. J., Krivit W., Condie R. M. (1974) Biochim. et biophys. acta, 350, 432—436.
5. Beaven G. H., Gratzel W. B. (1973) Int. J. Peptide Protein Res., 5, 215—218.
6. Josephs R., Eisenberg H., Reiser E. (1973) Biochemistry, 12, 4060—4067.
7. Wang J. H., Tu J. (1969) Biochemistry, 8, 4403—4408.
8. Herzog D. J., Rees A. W., Day R. A. (1964) Biopolymers, 2, 349—354.
9. Zaborsky O. R. (1974) in: Enzyme Engineering (Pye E. K., Wingard L. B., Jr., eds.), vol. 2, p. 115, Plenum Press, New York—London.
10. Goldstein I. (1973) Biochim. et biophys. acta, 315, 1—17.

11. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Тищенко Е. Г., Ильина Е. В., Смирнов В. Н., Чазов П. И. (1976) Биоорган. химия, 2, 1687—1691.
12. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Смирнов В. П., Чазов Е. И. (1976) Биоорган. химия, 2, 1252—1258.
13. Казанская Н. Ф., Кост О. А. (1975) Биоорган. химия, 1, 1332—1336.
14. Кабанов В. А., Евдаков В. П., Мустафаев М. И., Антипина А. Д. (1977) Молекулярн. биология, 11, 582—597.
15. Стрельцова З. А., Швыдас В. К., Максименко А. В., Клесов А. А., Браудо Е. Е., Толстогузов В. Б., Березин И. В. (1975) Биоорган. химия, 1, 1464—1469.
16. Kint J. A. (1973) FEBS Lett., 36, 53—56.
17. Стрельцова З. А., Браудо Е. Е., Толстогузов В. Б. (1975) Биоорган. химия, 1, 267—271.
18. O'Malley J. J., Ulmer R. W. (1973) Biotechnol. and Bioeng., 15, 917—925.
19. Рабинович И. М. (1971) Применение полимеров в медицине, с. 20—22, «Медицина», Л.
20. Ламри Р., Билтонен Р. (1973) в сб.: Структура и стабильность биологических макромолекул (Волькенштейн М. В., ред.), с. 42—66, «Мир», М.
21. Жюли М. (1968) Физическая химия денатурации белков, с. 315—330, «Мир», М.
22. Егоров А. М., Осипов А. П., Диков М. М., Александровский Я. И., Кириш Ю. Э., Лебедева Т. С. (1977) Тезисы докладов II Всесоюзного симпозиума «Получение и применение иммобилизованных ферментов», с. 44, г. Абовян.
23. Kirsch U. E., Kovner V., Kokoïin A. I., Zamaraev K. I., Chernyak V. Y., Kabanov V. A. (1974) Eur. Polym. J., 10, 671—678.
24. Родионов Ю. В., Авилова Т. В., Захарова Е. Н., Платонова Л. С., Егоров А. М., Березин И. В. (1977) Биохимия, 42, 1896—2012.
25. Родионов Ю. В., Авилова Т. В., Попов В. О. (1977) Биохимия, 42, 2020—2034.
26. Eventoff W., Rossmann M. G. (1976) Trends in Biochem. Sci., 1, 227—229.
27. Мартинек К., Клибанов А. М., Чернышева А. В., Березин И. В. (1975) Докл. АН СССР, 228, 233—236.
28. Дженкс В. П. (1972) Катализ в химии и эвзимологии, с. 367—372, «Мир», М.
29. Boyes A. G., Strause U. P. (1956) J. Polym. Sci., 22, 463—476.
30. Кириш Ю. Э., Плужнов С. К., Шомина Т. С., Кабанов В. А., Каргин В. А. (1970) Высокомолекул. соед., 12 А, 186—203.
31. Модель-69. Прибор для электрофореза в полиакриламидном геле и набор реактивов (ред. Сомбатхейн Д. и др.), «Рсанал», Венгрия.

Поступила в редакцию
25.V.1978

INCREASE IN FORMATE DEHYDROGENASE STABILITY ON COVALENT BINDING TO WATER-SOLUBLE COPOLYMER OF 4-VINYLPYRIDINE AND ACROLEINE

DIKOV M. M., OSIPOV A. P., EGOROV A. M., BEREZIN I. V.,
KIRSH Y. E., LEBEDEVA T. S., KABANOV V. A.

Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The interaction of water-soluble partially quaternized copolymer of 4-vinylpyridine and acroleine with formate dehydrogenase from methylotropic strain 1 has been studied. Sedimentation analysis revealed the presence of an enzyme-polymer water-soluble complex with a weight ratio of 2 : 1. It was shown that the complex has a high enzymatic activity and its storage stability at 37° is 100—350 times higher than that of the native enzyme. The implication of electrostatic enzyme-polymer interactions in enzyme stability was discussed. The influence of the copolymer on the enzyme kinetic properties was studied.