



УДК 577.158.42.02

СО<sub>2</sub> — ПЕРВИЧНЫЙ ПРОДУКТ РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ  
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗОЙ

Тшиков В. И., Егоров А. М.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
кафедра химической энзимологии

Ионов В. О.

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

Предложен новый метод определения, какой из возможных продуктов ферментативной реакции (СО<sub>2</sub> или НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>) является истинным. Метод основан на регистрации медленного процесса гидратации-дегидратации образующегося углекислого газа или бикарбонат-иона с помощью кислотно-основного индикатора бромтимолового синего при рН 7 и 20° С. С использованием данного метода показано, что первичным продуктом реакции, катализируемой формиатдегидрогеназой метилотрофных бактерий *Achromobacter parvulus* T1, является СО<sub>2</sub>.

Углекислый газ играет важную роль в метаболизме живых организмов. Он участвует во многих реакциях, катализируемых различными ферментами. Из ферментов этого типа, за исключением карбоангидразы, одни используют в виде субстрата или высвобождают в качестве продукта только СО<sub>2</sub>, а другие — только НСО<sub>3</sub><sup>-</sup> [1]. При нейтральных значениях рН равновесие в растворе между углекислым газом и бикарбонат-ионом устанавливается довольно медленно. Так, при рН 7,3 и 17° С время достижения полуравновесия ([НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>]/[СО<sub>2</sub>]=8) составляет 41 с [2]. Знание природы истинного субстрата или продукта конкретной ферментативной реакции имеет большое значение как для правильного понимания процесса метаболизма углекислого газа и способов его регуляции, так и для исследования кинетики и механизма действия самого фермента. Одним из ферментов, продуктом реакции которого может быть либо СО<sub>2</sub>, либо НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>, является формиатдегидрогеназа метилотрофных бактерий *Achromobacter parvulus* T1 (формиат: NAD<sup>+</sup> — оксидоредуктаза, КФ 1.2.1.2). Этот фермент катализирует окисление формиат-иона при сопряженном восстановлении NAD<sup>+</sup> до NADH. В нашей лаборатории проводится систематическое исследование этого фермента [3—7]. В настоящее время изучены его структура и аминокислотный состав [3], кинетическая схема действия [4], а также роль остатков гистидина, цистеина, аргинина и лизина [5—7] в катализе ферментативной реакции. Однако отсутствие данных о природе истинного продукта реакции не позволяет провести четкую интерпретацию кинетических данных по ингибированию фермента продуктом реакции. Если продуктом является СО<sub>2</sub>, то величина константы ингибирования формиатдегидрогеназы углекислым газом при рН 7 и 37° С составляет 1,2 мМ [4]. Если считать продуктом НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>, то константа ингибирования при этих же условиях равна 0,11 М. Знание природы истинного продукта формиатдегидрогеназы также необходимо для изучения переноса гидрид-иона в ходе ферментативной реакции.

Наиболее удобными методами определения истинного субстрата или продукта являются регистрация кинетики карбоксилирования при быстром вводе в реакционную среду свободного СО<sub>2</sub> [8, 9] и изучение стехиометрии включения <sup>18</sup>О из NaHC<sup>18</sup>O<sub>2</sub> в продукты реакции, когда изотопный обмен между меченым бикарбонат-ионом и Н<sub>2</sub>O сведен к минимуму

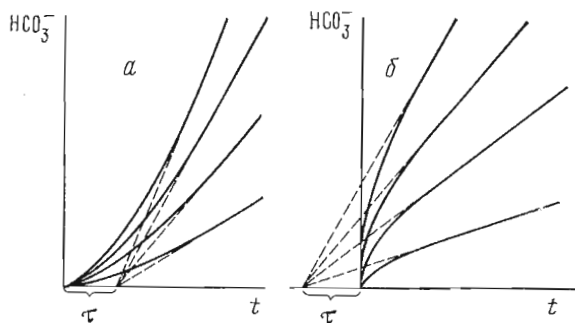


Рис. 1. Теоретические кривые образования бикарбонат-иона в ходе ферментативной реакции, когда истинным продуктом фермента является  $\text{CO}_2$  (а) или  $\text{HCO}_3^-$  (б). Отношение активностей фермента 1 : 2 : 3 : 4

[10, 11]. Однако эти методы в случае формиатдегидрогеназы неприменимы, так как равновесие реакции окисления формиата сильно сдвинуто в сторону образования продуктов [4] и исследовать обратную реакцию при нормальных условиях практически невозможно.

Для определения истинного продукта уреазы и пируваткарбоксилазы Кребс и сотр. [12] предложили метод манометрического определения ско-

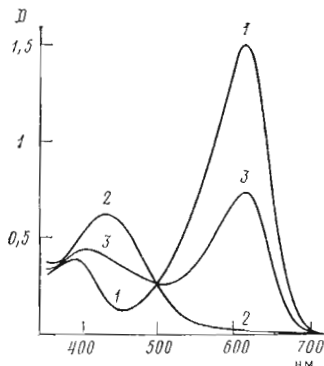
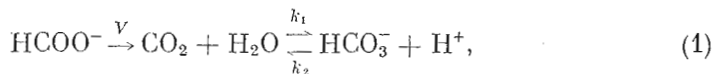


Рис. 2. Спектры поглощения бромтимолового синего при pH 9,5 (1), 7 (2), 4,5 (3). Концентрация красителя 25 мкг/мл; 0,5 мМ фосфат калия, 0,3 М формиат, 20° С

рости реакции по увеличению давления  $\text{CO}_2$  в закрытой системе в присутствии и в отсутствие карбоангидразы, когда скорость процесса декарбоксилирования была много выше скорости реакции гидратации углекислого газа. Основные недостатки этого метода — низкая точность манометрического определения скорости ферментативной реакции, использование очень высоких концентраций фермента, необходимость применения дополнительного фермента карбоангидразы.

Учитывая вышесказанное, для определения природы истинного продукта формиатдегидрогеназы мы разработали более простой, удобный и чувствительный метод.

Предположим, что первичным продуктом формиатдегидрогеназы является  $\text{CO}_2$ :



где  $V$  — скорость ферментативной реакции окисления формиат-иона. В течение всего эксперимента она постоянна и зависит только от количества фермента, вводимого в реакционную среду. Система дифференциальных уравнений, описывающая эту схему, имеет следующий вид:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[\text{CO}_2]}{dt} &= V + k_2[\text{HCO}_3^-] \cdot [\text{H}^+] - k_1[\text{CO}_2] \\ \frac{d[\text{HCO}_3^-]}{dt} &= k_1[\text{CO}_2] - k_2[\text{HCO}_3^-] \cdot [\text{H}^+] \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

Эта система нелинейна, так как содержит переменные концентрации бикарбонат-иона и протонов. Однако, если в процессе реакции величина концентрации ионов водорода сильно не изменяется (что наблюдалось в наших экспериментах), произведение  $k_2[\text{H}^+] = k_{-1}$  можно считать постоянным и система (2) упрощается до системы линейных дифференциальных уравнений (3):

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[\text{CO}_2]}{dt} &= V + k_{-1}[\text{HCO}_3^-] - k_1[\text{CO}_2] \\ \frac{d[\text{HCO}_3^-]}{dt} &= k_1[\text{CO}_2] - k_{-1}[\text{HCO}_3^-] \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

С учетом уравнения материального баланса

$$[\text{CO}_2] + [\text{HCO}_3^-] = Vt \quad (4)$$

и начальных условий при  $t=0$

$$\begin{aligned} [\text{CO}_2] = [\text{HCO}_3^-] &= \frac{d[\text{HCO}_3^-]}{dt} = 0, \\ \frac{d[\text{CO}_2]}{dt} &= V \end{aligned}$$

решение системы (3) имеет вид

$$[\text{CO}_2] = \frac{k_{-1}Vt}{k_1 + k_{-1}} - \frac{k_1V}{(k_1 + k_{-1})^2} \cdot (1 - e^{-(k_1+k_{-1}) \cdot t}), \quad (5)$$

$$[\text{HCO}_3^-] = \frac{k_1Vt}{k_1 + k_{-1}} + \frac{k_1V}{(k_1 + k_{-1})^2} \cdot (1 - e^{-(k_1+k_{-1}) \cdot t}). \quad (6)$$

Как видно из уравнения (6), на кривой накопления бикарбонат-иона от времени перед выходом на линейный участок имеется лаг-период, равный  $\tau = (k_1 + k_{-1})^{-1}$ , который не зависит от активности фермента. Согласно литературным данным [1, 2, 13], величина лаг-периода при pH 7 и 20° С должна быть 25 с.

Если первичным продуктом формиатдегидрогеназы является бикарбонат-ион, то зависимость накопления  $\text{CO}_2$  от времени будет описываться уравнением (6), а зависимость образования  $\text{HCO}_3^-$  от времени — уравнением (5). Кривые появления бикарбонат-иона перед выходом на линейный участок будут иметь начальный выброс, величина которого зависит от активности фермента. Продолжения линейных участков этих кривых в левый квадрант будут пересекаться в одной точке на оси абсцисс с координатой  $-(k_1 + k_{-1})^{-1}$  (рис. 1б). Если кривые накопления бикарбонат-иона имеют лаг-период, не зависящий от активности фермента (рис. 1а), то истинным продуктом является  $\text{CO}_2$ . Таким образом, изучая зависимости образования  $\text{HCO}_3^-$  от времени, можно определить природу первичного продукта формиатдегидрогеназы. Так как в ходе ферментативной реакции одновременно с  $\text{HCO}_3^-$  образуется протон, кинетику образования бикарбонат-иона можно регистрировать по появлению ионов водорода. Если в реакционную среду ввести кислотно-основной индикатор с рК, равным рН раствора, появление протона можно легко зафиксировать по изменению окраски индикатора, причем при малых изменениях рН количества индикатора, перешедшего из щелочной формы в кислую, будет прямо пропорционально изменению концентрации ионов водорода [14].

На рис. 2 представлены спектры поглощения кислотно-основного индикатора бромтимолового синего, который при ионной силе 0,3 (это соответствует 0,3 М концентрации формиат-иона при определении активности формиатдегидрогеназы) и 10–30° С имеет рК 7 [15]. Из рис. 2 видно, что щелочная форма бромтимолового синего имеет максимумы поглощения при 616 и 388 нм (спектр 1), а кислая форма индикатора имеет максимум поглощения при 433 нм (спектр 2). Спектр 3 записан при рН 7, когда одна половина индикатора находится в щелочной, а другая — в кислой формах.

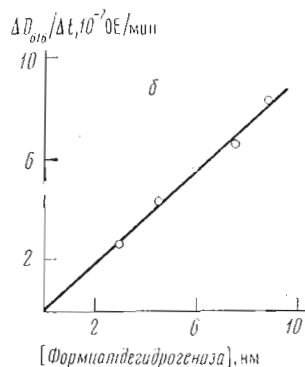
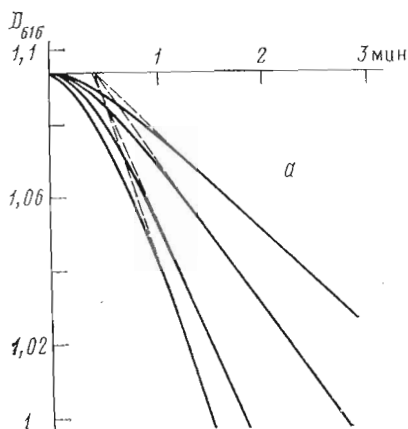


Рис. 3. Кривые образования бикарбонат-иона в ходе ферментативного окисления формиата при увеличении концентрации формиатдегидрогеназы (1 : 1,5 : 2,5 : 3) (а) и зависимость стационарной скорости образования  $\text{HCO}_3^-$  от концентрации фермента (б); 1,5 мМ  $\text{NAD}^+$ , 0,3 М формиат, 50 мкг/мл бромтимолового синего, 0,5 мМ фосфат калия (рН 7), 20° С

Поскольку кислая форма бромтимолового синего почти не поглощает при 616 нм, эта длина волны и была выбрана для регистрации скорости ферментативной реакции по появлению протона.

Как видно из рис. 3а, на кинетических кривых выделения протонов в процессе реакции в присутствии различных концентраций формиатдегидрогеназы имеется лаг-период 24 с, что хорошо согласуется с литературными данными (25 с [1, 2, 13]). Величина лаг-периода в соответствии с теорией не зависит от активности фермента, хотя величины стационарных скоростей прямо пропорциональны концентрации фермента (рис. 3б).

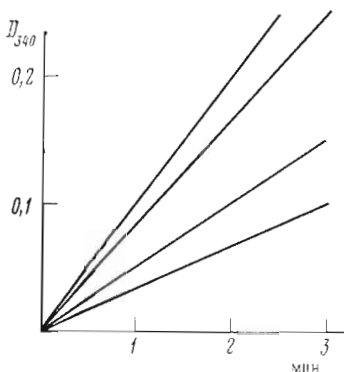


Рис. 4. Кривые накопления  $\text{NADH}$  в ходе ферментативного окисления формиата. Концентрации формиатдегидрогеназы и субстратов аналогичны указанным на рис. 3

Отсутствие периода индукции на кривых накопления  $\text{NADH}$  от времени в тех же условиях, что и в экспериментах на рис. 3 (рис. 4), свидетельствует, что лаг-период на кинетических кривых рис. 3а обусловлен не характером действия формиатдегидрогеназы, а процессом гидратации углекислого газа, образующегося в ходе ферментативной реакции.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что первичным продуктом реакции, катализируемой формиатдегидрогеназой метилотрофных бактерий, является углекислый газ, а не бикарбонат-ион.

### Экспериментальная часть

Формиатдегидрогеназу выделяли из метилотрофных бактерий *A. parvulus* T1, как описано ранее [3]. Согласно данным аналитического диск-электрофореза, полученные ферментные препараты были гомогенными. Специфическая активность формиатдегидрогеназы составляла 5 мкмоль/

/мин на 1 мг белка при 20°С и рН 7. Фермент хранили в 0,5 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7, при 4°С в присутствии 0,1 мМ меркаптоэтанола.

NAD<sup>+</sup> (Grade III, Sigma, США) использовали без предварительной очистки. Формат натрия, бромтимоловый синий были марки ч.д.а.

Скорость ферментативной реакции определяли спектрофотометрически на спектрофотометре фирмы Бекман (США), модель 35, при 20°С в 0,5 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7, при 340 нм по накоплению NADH или при 616 нм, регистрируя выделяющиеся в ходе реакции протоны с помощью кислотно-основного индикатора бромтимолового синего. Реакционная смесь содержала 1,5 мМ NAD<sup>+</sup>, 0,3 М формат натрия, 0,05 мг/мл бромтимолового синего (при регистрации скорости реакции при 616 нм) и форматдегидрогеназу в различных концентрациях. Перед каждым измерением скорости реакции реакцию смесь и раствор фермента продували гелием 1,5 ч для удаления растворенного CO<sub>2</sub>.

Запись спектров бромтимолового синего при различных значениях рН проводили на спектрофотометре Бекман (США), модель 35, в растворе, содержащем 0,5 мМ фосфат калия и 0,3 М формат натрия. Скорость сканирования составляла 20 нм/мин.

Определение рН всех растворов проводили с точностью до 0,01 на рН-метре фирмы Бекман (США), модель 4500, при 20°С и непрерывном токе гелия через раствор.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dalziel K. FEBS Lett., 1980, v. 117, № 1, p. 45–55.
2. Roughton F. J. W., Clark A. M. In: The Enzymes / Eds Sumner J. B., Myrback K. New York – London: 1951, v. 1, pt. 2, p. 1250.
3. Egorov A. M., Avilova T. V., Dickov M. M., Popov V. O., Rodionov Yu. V., Berezin I. V. Eur. J. Biochem., 1979, v. 99, № 1, p. 569–576.
4. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 1, с. 117–129.
5. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. Биохимия, 1978, т. 43, № 10, с. 1212–1221.
6. Попов В. О., Егоров А. М. Биохимия, 1979, т. 44, № 2, с. 207–212.
7. Тишков В. И., Попов В. О., Егоров А. М. Биохимия, 1980, т. 45, № 2, с. 317–324.
8. Dalziel K., Londesborough J. C. Biochem. J., 1968, v. 110, № 1, p. 223–230.
9. Vitte R. H., Dalziel K. Biochem. J., 1969, v. 115, № 2, p. 633–638.
10. Cooper T. G., Tchen T. T., Wood H. G., Benedict C. R. J. Biol. Chem., 1968, v. 243, p. 3857–3863.
11. Cooper T. G., Wood H. G. J. Biol. Chem., 1971, v. 246, p. 5488–5490.
12. Krebs H. A., Roughton F. J. W. Biochem. J., 1948, v. 43, № 2, p. 550–555.
13. Dalziel K. Biochem. J., 1953, v. 55, № 1, p. 79–87.
14. Shore J. D., Gutfreund H., Brooks R. L., Santiago D., Santiago P. Biochemistry, 1974, v. 13, № 20, p. 4185–4190.
15. Ваньян Е. В. в кн.: Индикаторы / ред. Бишоп Э. М.: Мир, 1976, т. 1, с. 153–156.

Поступила в редакцию  
29.IV.1982

## CO<sub>2</sub> IS THE PRIMARY PRODUCT OF BACTERIAL FORMATE DEHYDROGENASE

TISHKOV V. I., EGOROV A. M., POPOV V. O.

*Chair of Chemical Enzymology, M. V. Lomonosov State University, Moscow;  
A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Science of the USSR, Moscow*

A new method has been proposed to determine which out of two possible products of enzymatic reaction (CO<sub>2</sub> or HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) is formed. It is based on registration of a slow hydration-dehydration of the produced carbon dioxide or hydrocarbonate ion with the help of acid-base indicator bromothymol blue at pH 7,0 and 20°С. Using this method, CO<sub>2</sub> was determined as a primary product of formate dehydrogenase from methylophilic bacterium *Achromacter parvulus* T1.