

Е. Н. КОНДРАТЬЕВА, З. Г. ТКАЧЕВА, И. В. МАЛОФЕЕВА

**ФЕРРЕДОКСИНЗАВИСИМАЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА  
ЗЕЛЕННЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ  
CHLOROPSEUDOMONAS ETHYLICA ШТАММ 5И**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 2 VII 1971)

Было установлено, что зеленые серобактерии *Chl. ethylica* штамм 5И, относящиеся к анаэробам, при росте на разных средах образуют формиатдегидрогеназу<sup>(1)</sup>. Активность фермента проявлялась в присутствии метилвиологена, метиленовой сини, феррицианида калия и некоторых других искусственных акцепторов электрона. Однако восстановления никотинамидадениндинуклеотидов (НАД и НАДФ) обнаружить не удалось.

Способность изучаемых бактерий восстанавливать в присутствии формиата метилвиологен, имеющий окислительно-восстановительный потенциал, близкий к ферредоксину, который они содержат<sup>(2)</sup>, позволила предположить, что в intactных клетках этот переносчик электрона может служить акцептором при окислении формиата.

Для проверки такого предположения было проведено выделение ферредоксина из клеток *Chl. ethylica* штамм 3С, растущего быстрее и с большим выходом биомассы, чем *Chl. ethylica* 5И. Выделение и очистку ферредоксина проводили по методу Эванса и соавторов<sup>(3)</sup>.

Выделенный препарат имел спектр поглощения, типичный для бактериальных ферредоксинов с максимумами при 250 и 390 мμ и плечом при 305—310 мμ. Отношение  $E_{390}/E_{260} = 0,65$ . При электрофорезе в 20% полиакриламидном геле он давал одну полосу.

Культуры *Chl. ethylica* 5И выращивали на среде с формиатом<sup>(4)</sup>. Формиатдегидрогеназу определяли в экстрактах клеток, разрушенных ультразвуком после центрифугирования при 44 000 *g* 60 мин. Предварительно экстракты пропускали через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, что предполагает их очистку от имеющегося ферредоксина<sup>(5)</sup>. Определения проводили в анаэробных условиях в специальной кювете, откуда откачивали воздух и замещали его аргоном. Реакционная смесь (3 мл) содержала (μмол): НАД или НАДФ 2,0; ФМН или ФАД 0,05;  $MgCl_2$  20; формиат натрия 45; ферредоксин 0,12—0,24 мг; экстракт клеток 0,5—1,5 мл (2—3 мг по белку). Белок определяли по методу Лоури<sup>(6)</sup>.

Образование восстановленного НАД(Ф) измеряли на спектрофотометре СФ-4А при 340 мμ. Кроме того проводили измерения при 390 мμ, где имеется максимум поглощения окисленного ферредоксина.

Опыты показали, что экстракты клеток *Chl. ethylica* 5И, пропущенные через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, восстанавливают НАД (но не НАДФ) при наличии формиата, ферредоксина и флавинов. Более быстро реакция идет в присутствии ФАД. Количество восстановленного НАД зависит от концентрации в среде ферредоксина (рис. 1, 2). Наибольшее количество НАД восстанавливалось при содержании формиата в эквимолярном к нему отношении.

Участие ферредоксина в разложении формиата подтвердили измерения, проведенные при 390 мμ, где в первые минуты опытов наблюдалось уменьшение поглощения, свидетельствующее о восстановлении ферредоксина (рис. 3).

В случаях, если экстракты клеток *Chl. ethylica* не пропускали через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, восстановления НАД в присутствии ферредоксина не наблюдалось. Более того, добавление к очищенному неочищенного экстракта (даже прокипяченного 5 мин.) ингибировало реакцию. Причина этого пока не ясна.

Оказалось также, что добавление ферредоксина, выделенного из зеленых бактерий, стимулирует восстановление НАД в присутствии формата

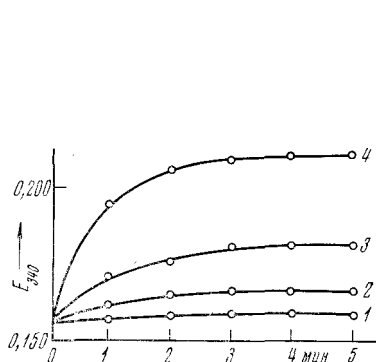


Рис. 1. Восстановление НАД экстрактами клеток *Chl. ethylica* в зависимости от наличия ферредоксина (Фд) и формата. 1 — НАД + ФМН + Фд; 2 — НАД + ФМН + Фд + 0,05 мг Фд; 3 — то же + 0,1 мг Фд; 4 — то же + 0,1 мг Фд + 0,05 мг Фд. Количество белка 0,6 мг/мл

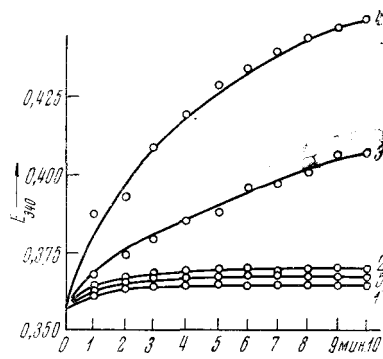


Рис. 2. Восстановление НАД и НАДФ экстрактами клеток *Chl. ethylica* в присутствии формата, ферредоксина и ФМН или ФАД. 1 — НАД + ФАД; 2 — НАД + Фд; 3 — то же + ФМН; 4 — то же + ФАД; 5 — НАДФ + Фд + ФАД. Количество белка 1 мг/мл

экстрактами клеток пурпурной бактерии *Rhodospseudomonas palustris* (рис. 4). Более заметное действие ферредоксин оказывал на восстановление НАД экстрактами этой бактерии, пропущенными через ДЭАЭ-целлюлозу, хотя реакция ускорялась и при использовании неочищенных экстрактов.

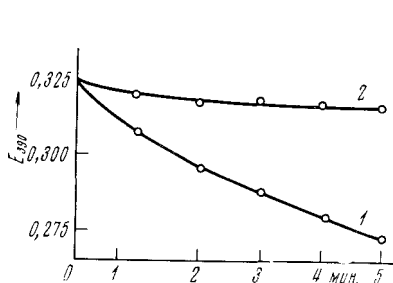


Рис. 3

Рис. 3. Восстановление ферредоксина экстрактами клеток *Chl. ethylica*. 1 — в присутствии формата; 2 — без формата. Количество белка 1 мг/мл

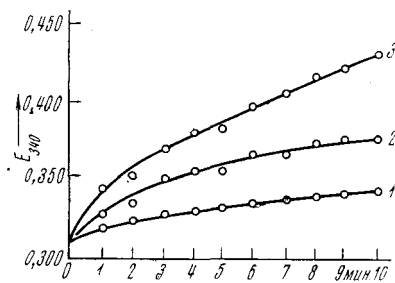


Рис. 4

Рис. 4. Восстановление НАД экстрактами клеток *Rh. palustris*, пропущенными через колонку ДЭАЭ-целлюлозы, в зависимости от наличия ферредоксина. 1 — НАД + ФМН; 2 — то же + формат; 3 — то же + Фд. Количество белка 0,6 мг/мл

Полученные данные свидетельствуют о том, что окисление формата у зеленых бактерий, так же как у некоторых клостридиев (<sup>5</sup>, <sup>6</sup>) и, видимо, метанообразующих бактерий (<sup>7</sup>), происходит при участии в качестве акцептора электронов ферредоксина. Таким образом, у различных групп анаэробных бактерий функционирует ферредоксинзависимая форматдегидрогеназа. Следует также отметить, что это еще одна из реакций, в которых

установлено участие ферредоксина у фотосинтезирующих бактерий. Поскольку изучаемые зеленые бактерии проявляют, кроме того, формиатгидрогеназную активность, полученные данные подтверждают значение ферредоксина для функционирования и этой системы, очевидно, на этапе, приводящем к выделению молекулярного водорода.

Что касается *Rh. palustris*, то вопрос об участии ферредоксина в окислении этими бактериями формиата не столь ясен, так как восстановление НАД экстрактами клеток, пропущенными через ДЭАЭ-целлюлозу, происходило и в отсутствие ферредоксина. Сохранение формиатдегидрогеназной активности в экстрактах клеток *Rh. palustris* после очистки от ферредоксина на ДЭАЭ-целлюлозе отмечалось и ранее (<sup>3</sup>).

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
29 VI 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> З. Г. Ткачева, Е. Н. Кондратьева, Микробиология, **40**, 1, 63 (1971).  
<sup>2</sup> K. K. Rao, H. Matsubara et al., J. Bacteriol., **100**, 3, 1411 (1969). <sup>3</sup> M. C. W. Evans, D. O. Hall et al., Biochem. J., **110**, 3, 485 (1968). <sup>4</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 1, 265 (1951). <sup>5</sup> L. G. Ljungdahl, H. G. Wood, Ann. Rev. Microbiol., **23**, 515 (1969). <sup>6</sup> K. Jungerman, H. Kirchnaiawy, R. K. Thauer, Biochem. Biophys. Res. Commun., **41**, 3, 682 (1970).  
<sup>7</sup> W. J. Brill, E. A. Wolin, R. S. Wolfe, Science, **144**, 3615, 297 (1964). <sup>8</sup> S. M. H. Qadri, D. S. Hoare, J. Bacteriol., **100**, 6, 890 (1968).