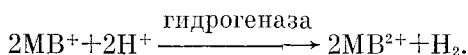


Член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН, С. Д. ВАРФОЛОМЕЕВ,  
И. Н. ГОГОТОВ, Н. А. ЗОРИН, ЧАНЬ ДИНЬ ТОАЙ

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ГИДРОГЕНАЗЫ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ *THIOCAPSA ROSEOPERSICINA*

Проблема получения молекулярного водорода из воды с помощью механизма фотосинтеза привлекает большое внимание в связи с возможностью создания на этой основе систем, преобразующих солнечную энергию в энергию транспортабельного и экологически безвредного топлива (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>). Ключевое место в проблеме фотосинтетического получения водорода занимает гидрогеназа — фермент, участвующий в конечной стадии образования водорода. Гидрогеназой активностью обладают микроорганизмы, различные по своему таксономическому положению и физиолого-биохимическим свойствам (<sup>3</sup>). Одним из важных параметров действия гидрогеназ, определяющим надежность систем преобразования энергии, является стабильность и кинетическая устойчивость фермента. В литературе существует недостаточно обоснованное мнение о высокой лабильности гидрогеназ, подверженности их быстрому окислению кислородом воздуха и тепловой денатурации (<sup>2</sup>, <sup>4</sup>). В настоящее время нами выполняется ряд исследований, направленных на поиски гидрогеназ, обладающих высокой активностью в реакциях образования  $H_2$ , а также изучение их физико-химических свойств и стабильности. Для проверки стабильности гидрогеназы были поставлены опыты с экстрактами и препаратами гидрогеназы из фототрофных пурпурных серобактерий *Thiocapsa roseopersicina* штамм ВВ8, который был любезно предоставлен профессором Е. Н. Кондратьевой (кафедра микробиологии биологического факультета МГУ).

Бактерии выращивали на среде Пфеннига (<sup>5</sup>) содержащей 0,2% ацетата, 0,1% тиосульфата и 0,1%  $NH_4Cl$ . Условия выращивания культур, получение фракций клеток и выделение гидрогеназы были приняты согласно методам, описанным ранее (<sup>6</sup>, <sup>7</sup>). На последней стадии очистки фермента использовали препаративный электрофорез. Активность гидрогеназы определяли двумя методами: а) по образованию  $H_2$  при действии гидрогеназы на восстановленный дитионитом натрия метилвиологен (<sup>8</sup>), б) спектрофотометрически по скорости исчезновения в растворе восстановленного метилвиологена:



Спектрофотометрические измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре «Хитаги-124» при 600 нм; молярное поглощение восстановленного метилвиологена (МВ)  $1,1 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

При изучении выделения  $H_2$  методом газовой хроматографии использовали следующую реакционную смесь (общий объем 2 мл): 1 мкмоль  $\cdot$  мл<sup>-1</sup> МВ + 10 мг дитионита + 0,02 М К-фосфатный буфер рН 6,2 + 0,2 мл экстракта или препарата гидрогеназы, количество белка 1 мг  $\cdot$  мл<sup>-1</sup>.

Результаты. Для выяснения влияния кислорода на стабильность гидрогеназы изучена кинетика инактивации фермента, локализованного в растворимой фракции ( $144 \cdot 10^3$  г; 90 мин.; 4°), в условиях инкубации под разными газовыми фазами (рис. 1). Кривые 1 и 2 соответствуют случаям инкубации экстракта в атмосфере аргона и водорода. В этих условиях от-

сутствуют эффекты, связанные с действием  $O_2$ , и процесс инактивации представляет собой, по-видимому, тепловую денатурацию белка. На начальных этапах тепловая денатурация протекает с повышенной скоростью, однако на ограниченную глубину ( $\sim 50\%$ ). Эта начальная стадия описывается кинетикой реакции первого порядка со временем полупревращения около 6 суток. В дальнейшем активность гидрогеназы остается на одном уровне. Это, по-видимому, указывает на то, что используемая фракция содержит, по крайней мере, две формы гидрогеназы, различающиеся по ста-

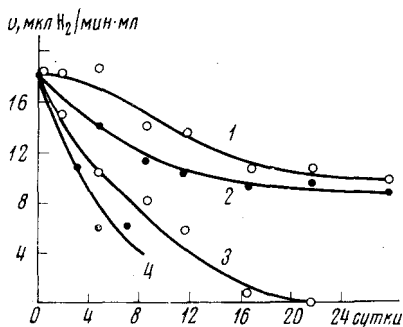


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика инактивации гидрогеназы при инкубации экстракта под разными газовыми фазами. 1 — аргон; 2 — водород; 3, 4 — воздух. Условия инкубации: для 1, 2, 3 — 0,067 M К-фосфатный буфер pH 7,2,  $20 \pm 3^\circ$ ; для 4 — 0,05 M К-фосфатный буфер pH 6,2,  $25 \pm 0,1^\circ$

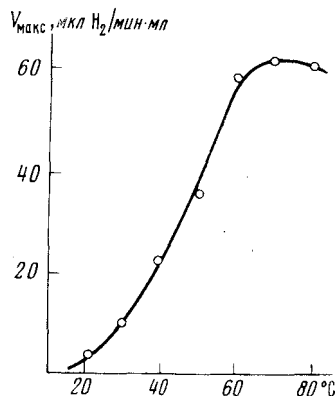


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость активности гидрогеназы от температуры (pH 6,2; 0,067 M К-фосфатный буфер)

бильности в условиях инертной и восстановительной атмосферы. В присутствии кислорода (кривые 3, 4) постепенно происходит полная потеря гидрогеназной активности. Выяснение детального механизма тепловой денатурации фермента и влияния кислорода на инактивацию гидрогеназы требует дополнительных исследований, однако необходимо отметить, что кинетика инактивации фермента в присутствии  $O_2$  является достаточно медленной (время полупревращения, как и в случае инертной атмосферы, составляет 5—6 суток). Это существенно отличает гидрогеназу *T. roseopersicina* от ферментов из других микроорганизмов, для которых характерна очень высокая чувствительность к присутствию кислорода воздуха (<sup>4</sup>).

Определенное представление о стабильности гидрогеназы, выделенной из *T. roseopersicina*, дает исследование зависимости активности фермента от температуры. На рис. 2 представлена зависимость от температуры максимальной скорости выделения  $H_2$  из восстановленного МВ, катализируемого чистым препаратом гидрогеназы. В опытах использовали «насыщающую» концентрацию МВ ( $1 \cdot 10^{-3}$  мол·мл<sup>-1</sup>); константа Михаэлиса, найденная для этой реакции, равна  $5 \cdot 10^{-3}$  M (0,02 M К-фосфатный буфер pH 6,2;  $30^\circ$ ). Найденная в соответствии с теорией абсолютных скоростей реакций энтальпия активации каталитической константы скорости лимитирующей стадии катализа гидрогеназой равна  $(16 \pm 2)$  ккал/моль (использовались данные рис. 2 в диапазоне температур  $20-40^\circ$ ). Приведенная на рис. 2 кривая имеет характерный для ферментативного катализа вид, с максимумом, отражающим конкуренцию двух процессов — увеличения скорости ферментативной реакции с ростом температуры и уменьшения скорости, вызываемой тепловой денатурацией фермента. Исследуемая гидрогеназа — достаточно термостабильный белок. Уменьшение активности, вызываемое тепловой денатурацией фермента за время определения

активности (20 мин.) при 50° составляет менее 3%. Так называемый «температурный оптимум» реакции лежит в диапазоне 70—80°.

Таким образом, полученные данные показывают, что гидрогеназа пурпурных серобактерий *T. roseopersicina* является умеренно лабильным ферментом, она выдерживает достаточно высокие температуры и относительно медленно инактивируется кислородом воздуха. Это делает перспективным поиски возможностей стабилизации этой гидрогеназы на базе исследования детального механизма ее инактивации.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
7 X 1974

Институт фотосинтеза  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> An Inquiry into Biological Energy Conversion. A Report on a Workshop Held at Gatlinburg, Tennessee. The Univ. of Tennessee, Knoxville, 1972. <sup>2</sup> J. R. Benemann, J. A. Berenson et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 8, 2317 (1973). <sup>3</sup> C. T. Groy, H. Gest, Science, v. 48, 186 (1965). <sup>4</sup> A. L. Shug, P. B. Hamilton, P. W. Wilson, In: Inorganic Nitrogen Metabolism, Baltimore, 1956, p. 344. <sup>5</sup> N. Pfennig, Zbl. Bacteriol., I Abt. Orig. Suppl., 1, 179 (1965). <sup>6</sup> G. Norkos, L. E. Mortenson, Biochemistry, v. 10, 2442 (1971). <sup>7</sup> И. Н. Гоголов, Н. А. Зорин, Л. В. Богоров, Микробиология, т. 43, 1, 5 (1974). <sup>8</sup> И. Н. Гоголов, Т. В. Миткина, В. П. Глинский, Микробиология, т. 53, 4, 586 (1974).