

УДК 577.1 577.15

# Механизм термоинактивации дрожжевой формиаатдегидрогеназы при различной ионной силе и pH среды

В. И. Тишков<sup>1,2,3,\*</sup>, С. В. Угланова<sup>1,4</sup>, В. В. Федорчук<sup>1</sup>, С. С. Савин<sup>2,3</sup><sup>1</sup>Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1–3<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33<sup>3</sup>ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96<sup>4</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

\*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 11.05.2010 г.

**РЕФЕРАТ** Исследована кинетика термоинактивации рекомбинантной формиаатдегидрогеназы дикого типа из дрожжей *Candida boidinii* (CboFDH) в диапазоне температур 53–61°C при pH 6.0, 7.0, 8.0 и различных концентрациях фосфатного буфера и субстрата формиаата натрия. Показано, что потеря активности фермента протекает по мономолекулярному механизму, а наблюдаемые значения активационных параметров  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  характерны для процесса разворачивания белковой глобулы. Оптимальными условиями для стабильности фермента являются pH 7.0 и высокие концентрации буферного раствора или субстрата формиаата натрия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** формиаатдегидрогеназа, *Candida boidinii*, термоинактивация, стабилизация, ионная сила.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ФДГ – NAD<sup>+</sup>-зависимая формиаатдегидрогеназа, PseFDH – ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101, PseFDH GAV – мутантная ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 версии GAV, CboFDH – ФДГ из дрожжей *Candida boidinii*.

## ВВЕДЕНИЕ

NAD<sup>+</sup>-зависимая формиаатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) принадлежит к суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-гидроксикислот [1]. В силу простоты катализируемой реакции – прямой перенос гидрид-иона в активном центре между формиаатом и C4-атомом никотинамидного кольца без стадий кислотно-основного катализа – ФДГ рассматривается как модельная система для изучения особенностей каталитического механизма ферментов всего суперсемейства.

Наиболее изученными являются ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH) и дрожжей *Candida boidinii* (CboFDH). Исследование этих ферментов началось практически одновременно в начале 70-х годов прошлого века. В настоящее время получено большое количество мутантных форм этих ферментов [2], с помощью методов рентгеноструктурного анализа определены их четвертичные структуры [3–5]. Большой интерес также представляют ФДГ растений, которые локализованы в митохондриях. В нашей лаборатории были созданы штаммы *Escherichia coli* – продуценты растительных рекомбинантных ФДГ из *Arabidopsis thaliana* и сои *Glycine max* [6]. Недавно были получены кристаллы и определены структуры этих ФДГ [7].

Одной из важнейших характеристик фермента является его температурная стабильность. Этот параметр очень важен для практического применения. Для ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 нами были проведены систематические

исследования по термоинактивации как фермента дикого типа, так и его мутантов при различных температурах, pH и концентрациях фосфатного буфера [2, 8]. Было показано, что при увеличении ионной силы раствора зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации проходит через максимум и при высоких концентрациях фосфатного буфера наблюдается существенная (в несколько раз) стабилизация фермента [8]. Для ФДГ из дрожжей *C. boidinii* в литературе такой информации нет, хотя косвенные данные позволяют предполагать, что влияние среды на стабильность CboFDH может быть более сильным. Например, этот фермент теряет более половины активности за несколько дней при хранении при +4°C в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0, поэтому для длительного хранения препаратов CboFDH фермент помещают в 40% глицерин при -20°C. В то же время в реальном процессе получения *трет-L*-лейцина при 25–30°C в проточном мембранном реакторе фермент сохраняет активность в течение нескольких недель [9]. Процесс протекает при высоких концентрациях субстрата CboFDH формиаата аммония, и можно полагать, что его присутствие обеспечивает повышение стабильности этого фермента.

Цель данной работы – проведение систематических исследований стабильности рекомбинантной CboFDH дикого типа при повышенной температуре в диапазоне pH 6.0–7.0 и при различных концентрациях фосфатного буфера и субстрата фермента формиаата натрия.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали препараты рекомбинантной формиатдегидрогеназы из дрожжей *Candida boidinii* дикого типа. Препаративную наработку биомассы клеток *E. coli* BL21(DE3)/pCboFDH, экспрессирующих ФДГ *C. boidinii*, проводили при 25°C в специальных качалочных колбах с отбойниками объемом 250 мл или 1 л (50 или 250 мл среды соответственно, содержащей 16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л хлорида натрия, 1.5 г/л однозамещенного фосфата натрия, 1 г/л двузамещенного фосфата калия, 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола). Объем посевного материала составлял 10–15% от общего объема среды. Индуктор биосинтеза ФДГ – лактозу – добавляли до конечной концентрации 20 мг/мл по достижении поглощения суспензии клеток при 600 нм ( $A_{600}$ ) 0.5–0.7. Затем клетки культивировали при максимальной аэрации в течение ночи. Клетки осадили центрифугированием на центрифуге Beckman J-21 (США) при 8000 об/мин в течение 20 мин при 4°C. Очистку CboFDH, экспрессированной в клетках *E. coli*, проводили по стандартной методике, разработанной для ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 [10]. Процедура очистки фермента включала: разрушение клеток (10% w/v суспензия в 0.1 М калий-фосфатном буфере, 0.02 М EDTA, pH 8.0) с помощью ультразвукового дезинтегратора Braun Sonic (Германия) при 0°C, высаживание части балластных белков сульфатом аммония (35% от насыщения), гидрофобную хроматографию на системе FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) фирмы "Pharmacia" (Швеция) с использованием носителя Phenyl Sepharose Fast Flow той же фирмы и гель-фильтрацию на колонке с Сефакрилом S200. Полученные препараты были не менее 95% чистоты согласно данным аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

### Определение активности формиатдегидрогеназ

Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) на спектрофотометре Shimadzu UV 1601PC при 30°C в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. Концентрации NAD<sup>+</sup> и формиата натрия в кювете были насыщающими и составляли 1.5 мМ и 0.3 М соответственно.

### Исследование термоинактивации рекомбинантной CboFDH

Термостабильность фермента измеряли в натрий-фосфатном буфере заданной концентрации в диапазоне 0.01–1.5 М (pH 6.0–8.0), содержащем 0.01 М EDTA и, в зависимости от типа эксперимента, 0.1–2.5 М формиата натрия. Для каждого эксперимента готовили серию из пластиковых пробирок объемом 1.5 мл по 100 мкл раствора фермента (0.2–0.25 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (53–61°C, точность термостатирования  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5415D. Остаточную активность ФДГ измеряли как описано выше. Константу скорости термоинактивации  $k_{\text{ин}}$  определяли как тангенс угла наклона прямой зависимости натурального логарифма величины

остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты  $\ln(A/A_0) - t$ ) методом линейной регрессии, используя программу «Origin 7.0».

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Влияние pH на скорость термоинактивации рекомбинантной ФДГ из *C. boidinii*

В ранее проведенных исследованиях для ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 при температурах выше 37°C [2, 8] было показано, что:

- 1) процесс термоинактивации является необратимым;
- 2) зависимость потери ферментативной активности от времени соответствует кинетике реакции первого порядка;
- 3) наблюдаемая константа скорости инактивации первого порядка не зависит от концентрации фермента, т.е. инактивация бактериальных ФДГ при повышенных температурах является истинно мономолекулярным процессом.

Термоинактивация рекомбинантной CboFDH была исследована в диапазоне температур 53–61°C и значениях pH 6.0, 7.0 и 8.0. На рис. 1 представлены зависимости величин остаточной ферментативной активности от времени при различных температурах в 0.1 М фосфатном буфере, pH 6.0.

Как видно из рис. 1, эти зависимости линейны в полулогарифмических координатах ( $\ln(A/A_0) - t$ ). Величина тангенса наклона прямых (т.е. константа скорости инактивации  $k_{\text{ин}}$ ) не зависит от концентрации фермента в диапазоне концентраций 0.08–1.5 мг/мл. Линейный характер зависимостей остаточной ферментативной активности от времени в полулогарифмических координатах и постоянное значение наблюдаемой константы скорости инактивации при различных концентрациях фермента указывают на то, что термоинактивация CboFDH, как и в случае бактериальных ферментов, является мономолекулярным процессом, т.е. происходит в одну стадию без предварительной

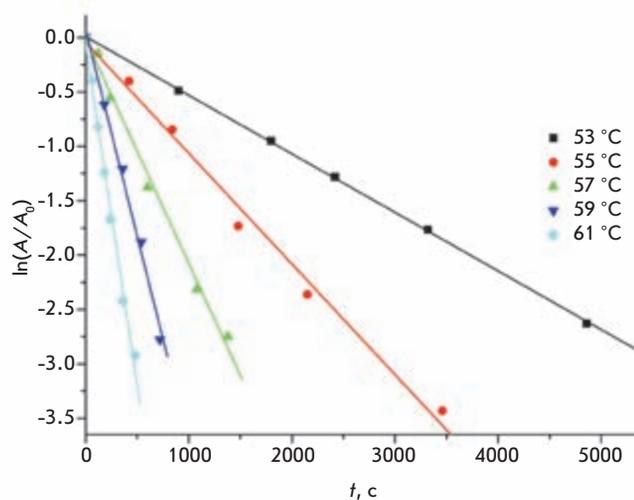


Рис. 1. Зависимость остаточной активности CboFDH от времени в координатах  $\ln(A/A_0) - t$  при нескольких температурах (0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 6.0).

**Таблица 1.** Наблюдаемые константы скорости термоинактивации рекомбинантной ФДГ из *S. boidinii* в 0.1 М фосфатном буфере при различных значениях рН

рН	$k_{ин} \cdot 10^6, c^{-1}$				
	53 °С	55 °С	57 °С	59 °С	61 °С
6.0	539±4	1020±50	2070±80	3800±200	6200±200
7.0	28±1	97±3	370±20	1050±50	2260±90
8.0	290±9	1000±10	2570±40	6350±200	12000±400

**Таблица 2.** Значения активационных параметров процесса термоинактивации SboFDH при различных значениях рН

рН	$\Delta H^\ddagger, кДж \cdot моль^{-1}$	$\Delta S^\ddagger, Дж \cdot К^{-1} \cdot моль^{-1}$
6.0	280±9	500±30
7.0	500±30	1360±90
8.0	420±30	1240±80

диссоциации димерной молекулы фермента на отдельные субъединицы.

Исследование кинетики потери активности рекомбинантной SboFDH при рН 7.0 и 8.0 показало, что при этих рН термоденатурация фермента также протекает по мономолекулярному механизму. В табл. 1 приведены значения наблюдаемых констант первого порядка скорости инактивации рекомбинантной ФДГ из дрожжей *S. boidinii* в 0.1 М натрий-фосфатном буфере при различных рН.

Следует отметить более высокую стабильность бактериальных ФДГ по сравнению с SboFDH. Например, при рН 7.0 и 61 °С константа скорости инактивации SboFDH составляет  $2.26 \times 10^{-3} c^{-1}$ , в то время как соответствующая константа для PseFDH дикого типа при этой температуре равна  $1.3 \times 10^{-4} c^{-1}$  [2], что почти в 20 раз меньше.

**Определение активационных параметров процесса термоинактивации SboFDH**

Истинно мономолекулярный характер процесса инактивации дрожжевой ФДГ во всем диапазоне исследованных температур и рН среды позволяет применить теорию активированного комплекса для анализа этого процесса.

Согласно теории активированного комплекса, уравнение, описывающее зависимость наблюдаемой константы скорости первого порядка от температуры, имеет следующий вид:

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}, \quad (1)$$

где  $k_B$  и  $h$  – постоянные Больцмана и Планка соответственно,  $R$  – универсальная газовая постоянная и  $T$  – температура в градусах Кельвина,  $\Delta G^\ddagger$ ,  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  – изменения энергии, энтальпии и энтропии активации соответственно.

Уравнение (1) можно преобразовать к линейному виду:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} = const - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T},$$

где  $const = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$ .

Как видно из рис. 2, полученные при трех значениях рН экспериментальные зависимости наблюдаемой константы скорости инактивации от температуры в координатах  $\ln(k_{ин}/T) - 1/T$  представляют собой прямые, т.е. эти зависимости действительно описываются уравнением теории активированного комплекса. Из тангенса угла наклона прямых на рис. 2 были рассчитаны соответствующие значения  $\Delta H^\ddagger$ .

Величина  $\Delta S^\ddagger$  может быть получена аппроксимацией прямой на рис. 2 на нулевое значение оси ординат. Однако данная процедура приводит к очень большим ошибкам, поскольку аппроксимация проводится на очень удаленное расстояние, и из полученного значения отсекаемого отрезка необходимо вычесть величину  $\ln(k_B/h)$ . С гораздо большей точностью величина  $\Delta S^\ddagger$  может быть получена из тангенса угла наклона зависимости  $\Delta G^\ddagger$  от  $T$  согласно уравнению:

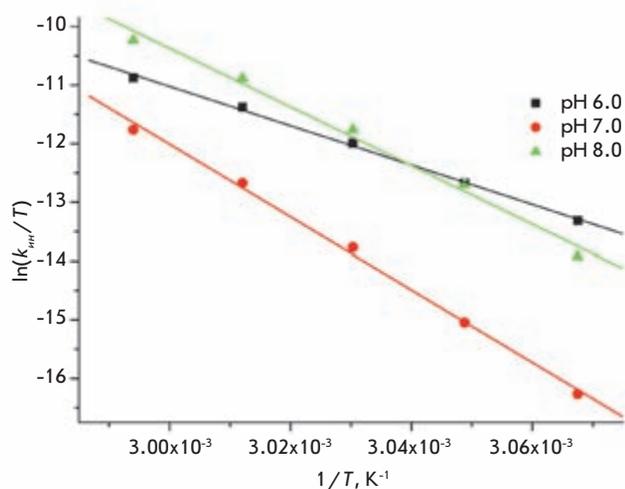
$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger.$$

Для нахождения свободной энергии активации было использовано следующее выражение:

$$\Delta G^\ddagger = RT \left[ \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) - \ln\left(\frac{k}{T}\right) \right] = RT \ln\left(\frac{k_B T}{kh}\right).$$

Величины  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  для трех значений рН представлены в табл. 2.

В большинстве случаев инактивация фермента при повышенных температурах обусловлена денатурацией белковой глобулы. Термоденатурация является кооперативным процессом и должна сопровождаться увеличением значений  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$ , превышающих соответствующие



**Рис. 2.** Зависимость константы скорости инактивации SboFDH от температуры в координатах  $\ln(k_{ин}/T) - 1/T$  в 0.1 М фосфатном буфере при различных значениях рН.

значения для химических реакций в десятки раз, что и наблюдается в случае полученных нами величин  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  для термоинактивации CboFDH (табл. 2). Следует отметить, что близкие значения активационных параметров были, например, получены при изучении различных бактериальных форматдегидрогеназ [8].

Как следует из полученных данных, pH оказывает большое влияние на процесс термоинактивации рекомбинантной ФДГ из *C. boidinii*. Фермент наиболее стабилен при pH 7.0. Увеличение или уменьшение величины pH приводит к резкой дестабилизации белковой глобулы и, как следствие, к росту значения  $k_{ин}$  в 3–20 раз в зависимости от температуры (табл. 1). Особо следует отметить разный ход температурной зависимости величины  $k_{ин}$  при различных значениях pH. Наиболее быстро она меняется при pH 7.0 и наиболее медленно – при pH 6.0 (рис. 2). По-видимому, это связано с изменением состояния ионизации заряженных групп в белковой глобуле (например, потеря положительного заряда на остатке гистидина при pH  $\geq 7.0$  или появление положительного заряда на остатке гистидина при pH  $\leq 7.0$ ), что приводит к уменьшению количества противоположно заряженных групп, участвующих в электростатических взаимодействиях или возникновению отталкивания между одноименно заряженными остатками. Например, согласно данным рентгеноструктурного анализа, в молекуле CboFDH ND1-атом остатка His57 находится на расстоянии всего 2.82 Å от NZ-атома аминогруппы остатка Lys2 в той же субъединице, а расстояние между ND1-атомом остатка His126 одной субъединицы и NE-атомом гуанидиновой группы остатка Arg136 другой субъединицы составляет 3.61 Å (структура 2FSS.PDB). В молекуле апо-CboFDH также возможно наличие четырех электростатических связей между остатками His и карбоксильными группами остатков Asp и Glu на расстоянии до 4 Å. Кроме того, не следует забывать, что изменение состояния ионизации даже одной группы может привести к значительным конформационным изменениям всей белковой глобулы.

### Зависимость термостабильности CboFDH от концентрации фосфат-иона

Как отмечалось выше, электростатические взаимодействия играют важнейшую роль в поддержании нативной конформации белков. Эффективность таких взаимодействий сильно ослабляется в растворах с высокой ионной силой. Для выяснения роли электростатических взаимодействий в стабильности ФДГ из дрожжей *C. boidinii* был изучен процесс термоинактивации фермента в растворах с различными концентрациями фосфата. Фосфат-ион был выбран из-за большого размера, препятствующего проникновению внутрь белковой глобулы, поэтому он должен разрушать только ионные пары на поверхности белка, не влияя на структуру самой глобулы фермента. Для сравнения была исследована такая же зависимость для мутантной ФДГ из бактерий *Pseudomonas sp.101* PseFDH GAV при pH 8.0.

На рис. 3 представлена зависимость константы скорости термоинактивации форматдегидрогеназы из дрожжей *C. boidinii* от концентрации фосфатного буфера при pH 7.0. Вначале при увеличении ионной силы раствора наблюдает-

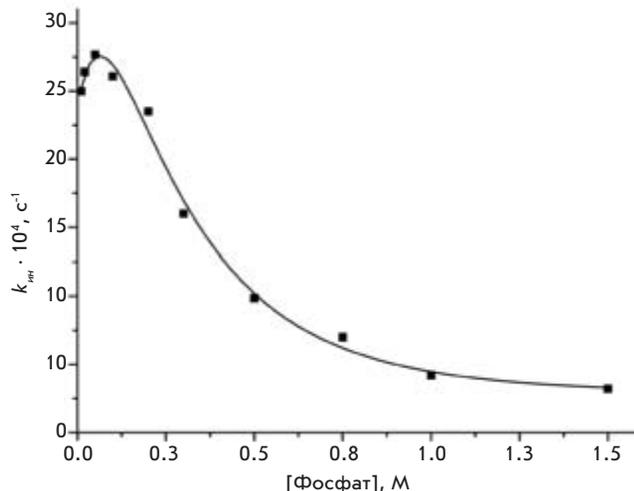


Рис. 3. Зависимость константы скорости инактивации CboFDH от концентрации фосфат-иона (0.01–1.5 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0, 61°C).

ся уменьшение стабильности фермента, что можно объяснить повышением диэлектрической проницаемости среды и ослаблением электростатических взаимодействий. Однако при больших концентрациях соли стабильность начинает повышаться (общая стабилизация примерно в 7 раз). Аналогичная зависимость наблюдается и при pH 8.0, однако эффект стабилизации намного выше – почти в 100 раз.

Влияние высоких концентраций фосфатного буфера на термостабильность рекомбинантной PseFDH дикого типа была изучена ранее [8]. В случае этого фермента максимальное значение константы скорости инактивации наблюдалось при более высокой концентрации фосфатного буфера – 0.2 М, и величина эффекта дестабилизации была выше (в 2 раза), чем в случае CboFDH (около 11%), а при высоких концентрациях фосфатного буфера (>1 М) эффект стабилизации по сравнению с низкими концентрациями (0.05 М) вообще не наблюдался.

На рис. 4 представлена зависимость константы скорости инактивации от концентрации фосфат-иона для мутантной ФДГ из *Pseudomonas sp.101* версии GAV (PseFDH GAV) при pH 8.0 и 61°C. В случае PseFDH GAV наблюдается гораздо более низкая степень стабилизации при увеличении концентрации соли – всего в 3 раза (для CboFDH при pH 8.0 – 100-кратная стабилизация), однако запаса «прочности» по термостабильности PseFDH GAV хватает настолько, что даже 100-кратного эффекта стабилизации CboFDH недостаточно для того, чтобы она смогла сравниться по стабильности с бактериальным ферментом.

Данные по влиянию концентрации фосфатного буфера на константу скорости инактивации CboFDH дикого типа и анализ четвертичной структуры фермента позволяют объяснить высокий эффект стабилизации фермента при концентрации фосфатного буфера 0.1 М за счет мутации Arg178Ser [11]. Эта замена приводит к увеличению стабильности фермента более чем в 3 раза [2]. Дело в том, что рядом с ним расположены еще два остатка Arg в положениях 174 и 182 (рис. 5А). Их положительно заряженные

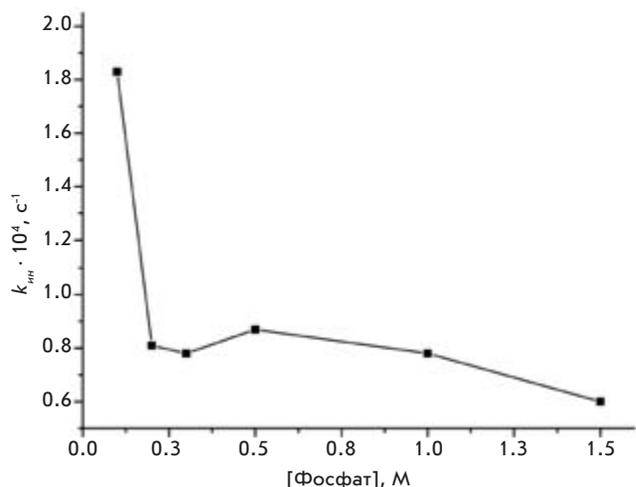


Рис. 4. Зависимость константы скорости инактивации PseFDH GAV от концентрации фосфат-иона (0.1–1.5 М натрий-фосфатный буфер, pH 8.0, 61°C).

гуанидиновые группы расположены от таковой у Arg178 на расстоянии 4.05 и 4.78 Å соответственно. Это достаточно большие расстояния, и в случае одного положительного заряда сила отталкивания будет не очень велика, но положительных зарядов два, вследствие чего эффективность отталкивания сильно возрастает. Замена Arg178Ser приводит к удалению электростатического отталкивания положительных зарядов и образуется новая водородная связь между остатками Arg182 и Ser178 (рис. 5Б), что и обеспечивает высокий эффект стабилизации при этой замене. При увеличении концентрации фосфатного буфера происходит экранирование положительных зарядов отрицательно заряженными ионами фосфата.

Сравнение аминокислотных последовательностей ФДГ из бактерий, высших растений, дрожжей и микроскопических грибов свидетельствует, что остатки аргинина в положениях, соответствующих в CboFDH остаткам Arg174 и 182, являются консервативными для всех вышеуказанных ферментов (см. рис. 1 в работе [2]). Более того, остаток Arg174 входит в участок (G/A)AGIRG, являющийся характерным «фингерпринтом», на основании которого выявляют наличие коферментсвязывающего домена в дегидрогеназах. Методом рентгеноструктурного анализа для ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 [3] и *Moraxella* sp.C2 было показано, что остаток аргинина из «фингерпринтного» участка (Arg202 в бактериальных ферментах) участвует в связывании NAD<sup>+</sup>, взаимодействуя с его пирофосфатной группой. Вполне очевидно, что замена этих двух консервативных остатков Arg (особенно Arg174) должна приводить к ухудшению его каталитических свойств. В ФДГ из дрожжей и микроскопических грибов остаток Arg178 является абсолютно консервативным. В то же время в бактериях и высших растениях у ФДГ в положении, соответствующем положению остатка Arg178 в аминокислотной последовательности CboFDH, встречаются соответственно или остаток Ala, или остаток Leu. Причина, по которой в ФДГ из дрожжей и микроскопических грибов природа «поместила» в это положение невыгодный остаток аргинина неизвестна, и для ответа на этот вопрос необходимы дополнительные исследования.

#### Зависимость термостабильности CboFDH от концентрации формиат-иона

При практическом применении формиатдегидрогеназы в системах ферментативного синтеза для достижения большого количества циклов кофермента необходимо использовать как можно более высокие концентрации субстратов (до 2–3 М), в том числе и формиата. Поэтому нами также была изучена кинетика термоинактивации CboFDH при различных концентрациях формиата натрия при двух

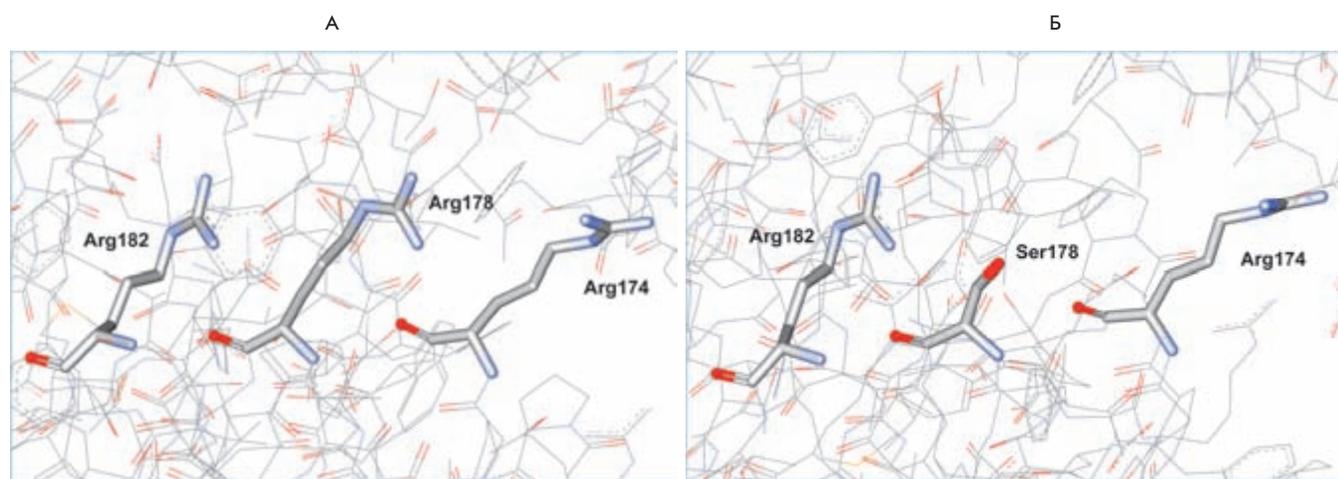


Рис. 5. А — Взаимная пространственная ориентация остатков Arg174, 178 и 182 в апоформе формиатдегидрогеназы из *C. boidinii* (структура 2FSS.PDB). Б — Удаление электростатического отталкивания и образование новой водородной связи за счет аминокислотной замены Arg178Ser в субъединице CboFDH.

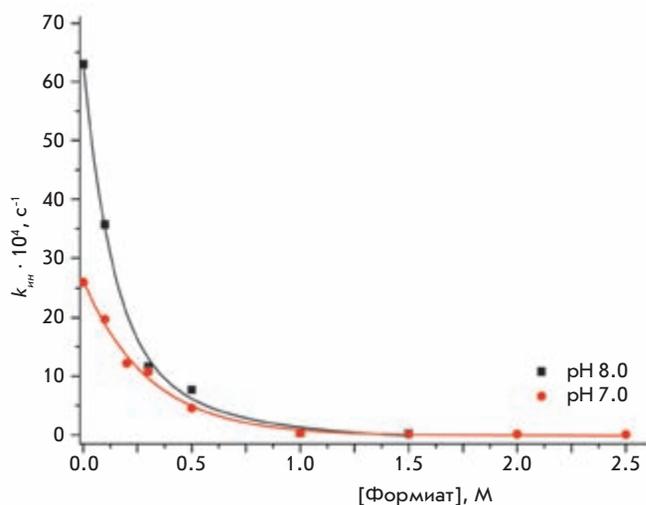
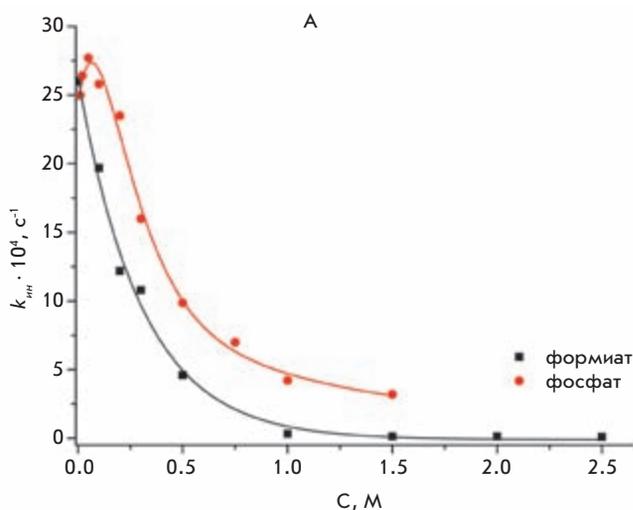


Рис. 6. Зависимость константы скорости инактивации CboFDH от концентрации формиат-иона в 0.1 М натрий-фосфатном буфере при pH 7.0 и 61°C и при pH 8.0 и 59°C.

значениях pH – 7.0 и 8.0 (рис. 6), поскольку именно в этом диапазоне в основном и проводят процессы ферментативного синтеза с помощью дегидрогеназ. Как видно из рис. 6, при высоких концентрациях формиата натрия наблюдается очень сильная стабилизация фермента. Особенно хорошо этот эффект виден при концентрациях формиата натрия до 1.5 М. Как и в случае зависимости константы скорости инактивации от концентрации фосфат-иона, эффект стабилизации более ярко выражен при pH 8.0, чем при pH 7.0 (рис. 6).

Сравнение зависимостей констант скоростей инактивации от концентрации фосфата и формиата (рис. 7А),



полученных при pH 7.0 и 61°C, показывает, что формиат стабилизирует CboFDH лучше, чем фосфат, причем для достижения эффекта стабилизации требуются намного меньшие концентрации субстрата. Однако пересчет концентрации фосфата на соответствующую ей ионную силу показывает, что в зависимости от ионной силы ход изменения константы скорости инактивации в случае формиата и фосфата идентичен, причем наблюдаемая зависимость описывается простой экспонентой, как и в случае формиат-иона (рис. 7Б). Этот факт свидетельствует об универсальности эффекта стабилизации CboFDH под действием ионной силы. Более высокая эффективность стабилизации в случае формиата, по-видимому, связана с тем, что формиат-ион в силу меньшего размера способен более глубоко проникать внутрь белковой глобулы или специфически связываться.

Данные по стабилизации CboFDH в присутствии высоких концентраций формиата могут быть использованы на практике при проведении процессов ферментативного синтеза хиральных соединений. Кроме того, CboFDH можно хранить без потери активности в буферных растворах с высокой концентрацией соли при +4°C, а не при -20°C в 40% глицерине, как это делается сейчас. Высокая концентрация соли также снижает концентрацию растворенного кислорода, что обеспечивает дополнительную защиту фермента от инактивации за счет окисления сульфгидрильных групп остатков цистеина. В нашем случае препараты рекомбинантной CboFDH дикого типа хранились в течение 9 мес. без потери активности при +4°C в растворе сульфата аммония (35% от насыщения) и 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0.

В заключение отметим, что результаты по прямому сравнению термостабильности бактериальной и дрожжевой ФДГ, основанные на исследовании кинетики инактивации, очень хорошо согласуются с данными по изучению термостабильности этих ферментов с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии, которые были

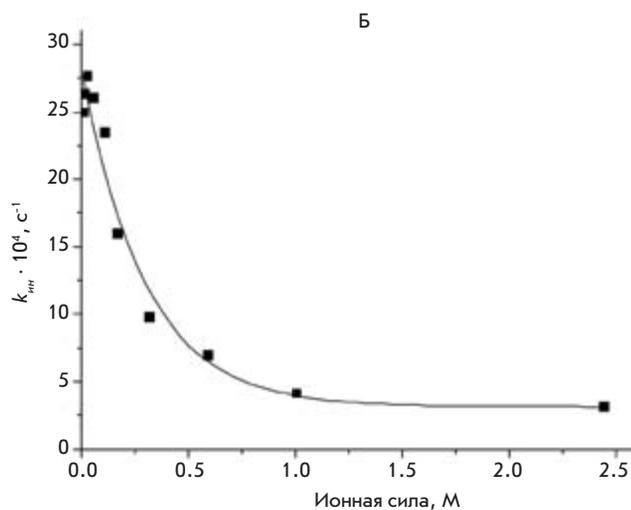


Рис. 7. А — Зависимость константы скорости термоинактивации CboFDH от концентрации фосфатного буфера и концентрации субстрата формиата натрия. pH 7.0, 61°C. Б — Зависимость константы скорости термоинактивации CboFDH от концентрации фосфатного буфера, пересчитанной на величину ионной силы. 0.01–1.5 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0, 61°C.

получены в нашей лаборатории [12] и в которых были использованы те же препараты рекомбинантной CboFDH, что и в этой работе.

Таким образом, в данной работе впервые были выполнены систематические исследования термостабильности форматдегидрогеназы из дрожжей *C. boidinii*, результаты которых позволили провести прямое сравнение с ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101. Полученные данные

свидетельствуют, что механизм инактивации ферментов одинаковый, однако влияние среды на их стабильность разное. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-01589-а).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vinals C., Depiereux E., Feytmans E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 192. P. 182–188.
- Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. V. 23. P. 89–110.
- Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., et al. // J. Mol. Biol. 1994. V. 236. P. 759–785.
- Филиппова Е.В., Поляков К.М., Тихонова Т.В. и др. // Кристаллография. 2006. Т. 51. С. 663–667.
- Schirwitz K., Schmidt A., Lamzin V.S. // Protein Sci. 2007. V. 16. P. 1146–1156.
- Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Ясный И.Е. и др. // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. С. 31–34.
- Шабалин И.Г., Серов А.Е., Скиргелло О.Е. и др. // Кристаллография. 2010. Т. 55. № 5. Принята в печать.
- Федорчук В.В., Галкин А.Г., Ясный И.Е. и др. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1385–1393.
- Bommarius A.S., Schwarm M., Stingl K., et al. // Tetrahedron-Asymmetry. 1995. V. 6. P. 2851–2888.
- Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., et al. // FEBS Lett. 1999. V. 445. P. 183–188.
- Felber S. Optimierung der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse: PhD Thesis. Düsseldorf: Heinrich-Heine University of Düsseldorf, 2001. URL: <http://diss.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/file?dissid=78>
- Sadykhov E., Serov A., Voinova N., et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. V. 42. P. 236–240.