

УДК 547

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГИДРОГЕНАЗ

Карякин А. А., Варфоломеев С. Д.

В обзоре рассмотрены наиболее общие физико-химические свойства гидрогеназ, строение их активных центров и особенности катализитических реакций с их участием. По содержанию железосерных кластеров в молекуле белка предложено подразделять гидрогеназы на одноцентровые и многоцентровые. Гидрогеназы этих групп различаются по своей активности, физическим и кинетическим свойствам. Наибольшее внимание удалено кинетическим характеристикам гидрогеназ, выявлена схема катализа, продвинуты гипотезы о молекулярном механизме действия этих ферментов.

Библиография — 144 ссылки.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1524
II. Некоторые физико-химические свойства железосерных белков	1525
III. Физико-химические свойства гидрогеназ	1528
IV. Влияние различных эффекторов на активность гидрогеназ	1533
V. Кинетика реакций, катализируемых гидрогеназами	1537
VI. Кинетика электрохимических процессов, катализируемых гидрогеназами .	1544
VII. Заключение	1545

I. ВВЕДЕНИЕ

Процессы поглощения и образования молекулярного водорода в биологических системах, как правило, протекают при участии специфического класса ферментов, для которых предложено тривиальное название «гидрогеназы» [1].

Как общен научный, так и практический интерес к этим ферментам стимулируется рядом особенностей гидрогеназ.

Во-первых, детальное исследование механизма активации водорода биологическими катализаторами может существенно продвинуть нас в понимании физико-химических основ ферментативного катализа окислительно-восстановительных реакций в целом.

Во-вторых, понимание механизма действия этих ферментов должно намного облегчить поиск катализаторов реакций гидрогенизации-дегидрогенизации органических соединений, находящих широкое применение в практике. Кроме того, большой интерес представляет непосредственное практическое использование гидрогеназ в реакциях, сопряженных с окислением или образованием водорода.

В-третьих, гидрогеназы являются терминальными ферментами в процессе образования водорода микроорганизмами [2—4], которые, в частности, можно использовать для утилизации солнечной энергии с целью промышленного получения водорода (биофотолиз воды) [5]. Кроме того, существует возможность создания модельных биохимических систем, осуществляющих фоторазложение воды на водород и кислород [6].

В-четвертых, весьма перспективной представляется возможность использования ферментов в системах биоконверсии энергии. Биоэлектрокатализ гидрогеназами может быть положен в основу создания топливных электродов в электрохимических преобразователях (биотопливных элементах) [7—11].

Гидрогеназы являются в достаточной степени распространенными ферментами, обеспечивающими энергоснабжение ряда микроорганизмов за счет окисления водорода. К настоящему времени хорошо изучены метаболические пути у микроорганизмов, проявляющих гидрогеназную активность, а также локализация и функции самих гидрогеназ. Имеются

также многочисленные данные о биохимии этих ферментов (см. [12–15]). Однако в литературе не встречаются сколь-нибудь общие взгляды относительно катализитических свойств гидрогеназ, весьма неполно и противоречиво представлены кинетические характеристики отдельных ферментов.

Целью данного обзора является систематизация данных о катализитических функциях гидрогеназ. Авторы не стремились включить в него все, что известно в литературе об этом классе ферментов, а ставили своей задачей поиск наиболее общих закономерностей.

II. НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЖЕЛЕЗОСЕРНЫХ БЕЛКОВ

1. Гидрогеназы — железосерные белки

Первые предположения о наличии железа в активном центре гидрогеназ основывались на существовании зависимости активности ферментов от концентрации железа в среде роста микроорганизма [16]. Прямое определение радиоактивным методом содержания железа во фракциях, обладающих гидрогеназной активностью, на различных стадиях очистки препарата подтвердило наличие железа в гидрогеназах [17]. Кроме того, все авторы, начиная с 1943 г. [18], отмечали влияние комплексонов железа на активность гидрогеназ. Наконец, путем прямого определения, в том числе с применением атомно-абсорбционной спектроскопии, было доказано, что в активный центр гидрогеназ входит негемовое железо [15].

В то же время привел к успеху большой цикл работ, посвященный ингибиторному анализу гидрогеназ с помощью специфических реагентов на SH-группы. В 60-х годах было установлено, что *n*-хлормеркурийбензоат, иодацетамид и мерсалил подавляют гидрогеназную активность [19, 20]. Однако последнюю иногда можно реанимировать посредством инкубации с восстановителями [20–22]. Показано [23], что при ингибировании мерсалилом гидрогеназы из *Clostridium pasteurianum* ионы ртути взаимодействуют с атомами серы, приводя к удалению железа из активного центра. Независимо было установлено наличие в гидрогеназах так называемой «кислотолабильной» серы, которая выделяется в виде сероводорода при сильном подкислении препаратов [24–26].

В начале 70-х годов при исследовании гидрогеназы из *Cl. pasteurianum* было обнаружено наличие 12 атомов железа и 12 атомов кислотолабильной серы в активном центре фермента [24]. Последующие работы подтвердили, что железо и сера содержатся в гидрогеназах в эквимолярных количествах. Изучение оптических спектров гидрогеназ позволило определить в активном центре хромофорную группу, отвечающую железосерному кластеру. Разработка методов количественной экструзии [27] дала возможность установить идентичность строения кластеров в активных центрах гидрогеназ и низкомолекулярных железосерных белков. Структура и свойства последних изучены гораздо более полно по сравнению с гидрогеназами. На примере ферредоксинов удобно рассмотреть закономерности поведения железосерных кластеров, чрезвычайно важные для анализа катализитических свойств гидрогеназ.

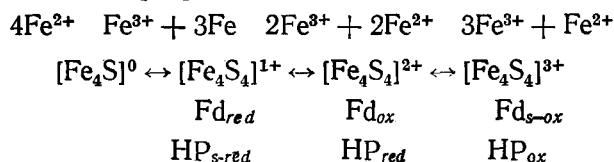
2. Структура активного центра и окислительно-восстановительные свойства низкомолекулярных железосерных белков

Бурное исследование железосерных белков началось с 1962 г., когда был открыт ферредоксин из *Cl. pasteurianum* [28]. Одним из отличительных свойств металлопротеидов этого класса является наличие негеминового железа в активном центре [29, 30].

Ферредоксины обладают относительно низким молекулярным весом (6000–30 000) [29]. Они различаются в основном структурой активного центра. Белки 1Fe, или рубредоксины, содержат один атом железа, свя-

занный с четырьмя атомами серы аминокислотных цистеиновых остатков. Ферредоксины $2\text{Fe} - 2\text{S}$ кроме двух атомов железа содержат два атома кислотолабильной серы. Наиболее интересен класс белков $4\text{Fe} - 4\text{S}$. В него входят как ферредоксины, так и высокопотенциальные белки, или HIPR (High Potential Iron Protein), различающиеся потенциалами окислительно-восстановительных переходов. Белки класса $8\text{Fe} - 8\text{S}$ и более сложные не образуют самостоятельных структур, а формируют активный центр из кластеров $2\text{Fe} - 2\text{S}$ и $4\text{Fe} - 4\text{S}$.

Железосерные белки принято разделять на две группы по величине потенциала окислительно-восстановительного перехода. Наиболее широк класс ферредоксинов, включающий белки $2\text{Fe} - 2\text{S}$ и $4\text{Fe} - 4\text{S}$, потенциалы которых лежат в отрицательной области ($-0,3 \div -0,4$ В). Здесь и далее значение потенциала приводится относительно нормального водородного электрода. К группе высокопотенциальных белков относятся исключительно белки $4\text{Fe} - 4\text{S}$ с величинами потенциалов около $+0,3$ В. Для объяснения указанного различия предложена гипотеза «трех состояний» [31], согласно которой переходы в ферредоксинах и HIPR осуществляются между разными электронными состояниями кластеров, определяемых соотношением атомов Fe^{2+} и Fe^{3+} . Обнаружение суперокисленных ферредоксинов ($\text{Fd}_{\text{s-ox}}$) и супервосстановленных HIPR ($\text{HP}_{\text{s-red}}$) позволило дополнить модель «трех состояний» и предложить окончательную схему окислительно-восстановительных переходов в белках $4\text{Fe} - 4\text{S}$ [32]:



Заряд кластера здесь и далее соответствует сумме зарядов атомов железа и кислотолабильной серы.

Исследование физических свойств позволило также выяснить природу ферредоксинового перехода в $2\text{Fe} - 2\text{S}$ белках. Установлено, что в окисленном состоянии кластера оба атома железа находятся в степени окисления +3; восстановление кластера приводит к переходу одного из атомов в двухвалентное состояние [33].

Примечательным является то обстоятельство, что железосерный кластер представляет собой единую электронную структуру. Как показали многочисленные исследования, атомы железа внутри кластера неразличимы [30]. Для объяснения этого эффекта предложена гипотеза «антиферромагнитного взаимодействия» [33], основанная на методе валентных схем.

Как указывают многие исследователи (см., например, [34]), спектральные характеристики кластеров $2\text{Fe} - 2\text{S}$ и $4\text{Fe} - 4\text{S}$ весьма схожи, и иногда бывает невозможно идентифицировать тип кластера. Причиной этого является связывание других хромофоров, а зачастую и влияние самой полипептидной цепи. Преодолеть эти трудности удается применением метода магнитного кругового дихроизма [35] и воздействием линейного электрического поля, приводящим к изменению спектра ЭПР [36]. Однако наиболее простой метод состоит в изучении спектров ЭПР в 80%-ном диметилсульфоксиде при различных температурах [37].

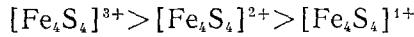
Количество атомов железа в активном центре гидрогеназ кратно четырем. Метод количественной экструзии в применении к 12Fe гидрогеназам из *Cl. pastorianum* [27] и *Desulfovibrio vulgaris* [38] показал наличие в них только кластеров $4\text{Fe} - 4\text{S}$. Кроме того, существует целый ряд ферментов, содержащих один кластер $4\text{Fe} - 4\text{S}$ на молекулу белка. Однако при исследовании спектров ЭПР 12Fe гидрогеназы из *Alcaligenes eutrophus* H16 [39, 40] наряду с двумя кластерами $4\text{Fe} - 4\text{S}$ были обнаружены два кластера $2\text{Fe} - 2\text{S}$. Для других многокластерных гидрогеназ столь детального исследования проведено не было, но для осу-

ществления водородного катализа, по-видимому, всегда необходимо наличие в активном центре фермента кластеров 4Fe—4S. Рассмотрим кратко свойства последних.

3. Физические свойства кластеров 4F—4S в низкомолекулярных белках

а) Оптические свойства

Спектры поглощения в видимой области для железосерных белков, содержащих кластер в одинаковой степени окисления, идентичны. В ряду



наблюдается падение величины поглощения при 400 нм. Отношение величин поглощения при 400 нм и 280 нм является мерой отношения хромофора к пептиду, оно обычно используется как индикатор чистоты железосерного белка [34].

б) Магнитные свойства

Четное число неспаренных электронов в кластере предопределяет отсутствие сигналов ЭПР. Таким образом, ЭПР недетектируемым является состояние $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$.

Кластеры $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$ имеют характерный спектр ЭПР, относительно слабо зависящий от полипептидного окружения. Наблюдаются аксиальный или ромбический сигнал, средняя величина g -фактора составляет около 1,96. Если исключить влияние пептида, записывая спектр в 80%-ном диметилсульфоксиде [37], можно получить аксиальный сигнал с параметрами: $g_{\perp}=1,94$, $g_{\parallel}=2,05$. Ферредоксины, содержащие два и более железосерных кластеров, находящихся в состоянии $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$, дают более сложный сигнал ЭПР, что объясняется спин-спиновым взаимодействием [34].

Спектры ЭПР кластеров $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ гораздо более чувствительны к полипептидному окружению. Они характеризуются фактором $g>2$ (один неспаренный электрон на четыре атома железа).

в) Влияние белковой глобулы

Белковая глобула может оказывать двоякое воздействие на свойства кластеров. Во-первых, она влияет на выбор оптимального окислительно-восстановительного перехода (ферредоксины и НИРИП). Во-вторых, в зависимости от белка для одной и той же реакции возможна достаточно широкая вариация окислительно-восстановительного потенциала. Как отмечено в [34], потенциалы ферредоксинового перехода ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+} \leftrightarrow [\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$) колеблются в пределах 650 мВ, а перехода НИРИП ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+} \leftrightarrow [\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$) — до 750 мВ. В работе [41] были зарегистрированы конформационные изменения ферредоксина из *C. acidiphilic* в процессе восстановления. Картер с соавт., изучая высокопотенциальный белок из *Chromatium sp.* методом рентгеноструктурного анализа, обнаружили [42], что при окислительно-восстановительном переходе происходит изменение симметрии железосерного кластера. Белковая глобула может за счет конформационного влияния стабилизировать или дестабилизировать то или иное состояние кластера, воздействуя, с одной стороны, на выбор оптимального перехода, с другой стороны, смешая термодинамическое равновесие окислительно-восстановительной реакции и, следовательно, ее потенциал.

В литературе имеются также указания на возможность наличия у железо-серных белков двух кластеров 4Fe+4S, сильно отличающихся по величине потенциала одного и того же электронного перехода $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+} \leftrightarrow [\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$. Ферредоксин I из *Azotobacter vinelandii* [43] име-

ет потенциалы —420 и +320 мВ, ферредоксин IV из *Rhodospirillum rubrum* [44] соответственно —380 и +355 мВ, ферредоксин I из *Mycobacterium flavum* [45] — —420 и +230 мВ.

Способность железосерных белков к деструкции кислородом воздуха объясняется в основном лабильностью кластера. Было показано [46], что взаимодействие кластера 4Fe—4S с O₂ приводит к переходу одного атома железа в раствор. Открытие кластеров типа 3Fe—nS подтвердило этот вывод.

4. Кластеры 3Fe—nS

Впервые кластер 3Fe—nS был обнаружен в ферредоксine II из *Desulfovibrio gigas* [47]. Затем было показано, что ферредоксин из *Clostridium pasteurianum* при окислении феррицианидом также переходит в форму, содержащую подобный кластер [48].

При реконструкции ферредоксина II из *D. gigas*, содержащего первоначально по одному кластеру классов 4Fe—4S и 3Fe—nS [49], найдено, что избыток двухвалентного железа и S²⁻ ведет к образованию исключительно кластеров первого типа. Повышение ионной силы или снижение концентрации железа в растворе одинаково влекут за собой появление значительной доли кластеров 3Fe—nS. Кроме того [49], возможна непосредственная интерконверсия 4Fe—4S↔3Fe—nS. В жестких окислительных условиях (в присутствии феррицианида или кислорода) кластеры 4Fe—4S переходят в форму 3Fe—nS, высвобождая в раствор один атом двухвалентного железа. Оказалось возможным провести и обратный процесс: в восстановительных условиях под влиянием дитиотреитола и солей железа кластеры 3Fe—nS способны переходить в 4Fe—4S.

III. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГИДРОГЕНАЗ

1. Окислительно-восстановительные свойства

Гидрогеназы способны как активировать молекулярный водород, так и катализировать его выделение. Многочисленные эксперименты по выделению и хранению ферментов в различных условиях показали, что под воздействием кислорода воздуха гидрогеназа переходит в неактивную форму, которую, однако, часто можно реактивировать инкубацией с восстановителями. Представляет интерес проследить влияние окислительно-восстановительного состояния фермента на его активность.

Однако при изучении этого феномена в некоторых работах были допущены серьезные ошибки. Авторы [50—53], измеряя активность гидрогеназы по скорости выделения H₂, определяли в сущности потенциал зависимость водородного электрода (см., например, [54]), т. е. равновесного выделения водорода из воды. Тем не менее в работе [51] достоверно установлена потеря активности ферментом в области потенциалов меньше —480 мВ, в сильно восстановительных условиях.

Окислительно-восстановительное титрование гидрогеназы из *Thiocapsa roseopersicina* с применением различных доноров электронов позволило определить потенциал активации ($E = -276 \pm 8$ мВ) [55].

Хотя восстановление способствует активации гидрогеназ, однако перевосстановление активного центра также приводит к потере активности. Не вызывает сомнения ингибирующее действие восстановительных агентов, в частности дитионита натрия, на активность гидрогеназ (см. [13]). Наряду с необратимой потерей активности [56], многие авторы указывают либо на слабое воздействие, либо на возможность реактивации [20, 55, 57, 58]. Выше отмечалась инактивация гидрогеназы из *Clostridium pasteurianum* [51] при потенциалах ниже —480 мВ. Дитионит натрия в низких концентрациях не влияет на скорость выделения водорода, которое протекает при участии фермента из *D. vulgaris* [59]; увеличение концентрации восстановителя приводит к падению активности гидрогеназы до нуля.

Наряду с обычными, «двусторонними», существует ряд гидрогеназ, способных в основном к поглощению водорода. Все они локализуются в клетках микроорганизмов рядом с нитрогеназой, что, по-видимому, и обусловливает их физиологическую функцию. Активность по выделению водорода у «односторонних» гидрогеназ обычно на два порядка ниже активности, измеренной по поглощению H_2 в тех же условиях. Для *Rhodopseudomonas capsulata* [60], *C. pastorianum* [52], *Rhizobium japonicum* [61] скорость выделения составляет 1—3% от скорости поглощения H_2 ; соответствующие активности «односторонней» гидрогеназы из *Azotobacter chroococcum* [62] различаются в 200 раз.

Авторы [63] предположили, что перевосстановление «односторонних» гидрогеназ происходит уже в положительной области потенциалов относительно водородного электрода в том же растворе. Таким образом, в условиях, термодинамически выгодных для выделения водорода, гидрогеназа становится неактивной. Для фермента из *Rh. capsulata* [63] потенциал инактивационного перевосстановления при рН 7,0 составил —340 мВ. Эта величина зависит от рН: $\partial E / \partial pH \approx -30$ мВ. При рН 5,0 скорости выделения и поглощения водорода приблизительно совпадают.

2. Оптические свойства

Гидрогеназы имеют характерные для железосерных белков оптические спектры. В видимой области наблюдается максимум поглощения при длине волны около 400 нм. Коэффициенты экстинкции гидрогеназ в расчете на атом железа обычно составляют $4000 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, однако могут существенно отклоняться от этой величины [14, 15]. При восстановлении гидрогеназы до активного состояния различными агентами (в том числе дитионитом натрия и водородом) поглощение при 400 нм падает на 10—20% [14].

3. Спектры ЭПР

Гидрогеназы дают сигналы ЭПР, характерные для железосерных белков. По характеру изменения спектров ЭПР в процессе окисления-восстановления активного центра гидрогеназы можно разделить на две группы.

Одноцентровые, т. е. содержащие один кластер $4\text{Fe}-4\text{S}$, ферменты в окисленном состоянии имеют спектр ЭПР с $g > 2$, весьма похожий на спектры высокопотенциальных белков в окисленном состоянии, т. е. на спектры кластера $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$. При восстановлении этих гидрогеназ сигнал ЭПР исчезает. Следовательно, окислительно-восстановительный переход в этой группе ферментов отвечает превращению $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+} \leftrightarrow [\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$. Такие данные были получены для гидрогеназ из *Th. roseopersicina* и *Rh. capsulata* [63], *Rhodospirillum rubrum* [64—66], *Chromatium vinosum* [67] и *Chromatium sp.* [68]. Авторы последней работы, как и авторы [63], отмечают, что окись углерода не оказывает влияния на сигналы ЭПР гидрогеназ ни в окисленном, ни в восстановленном состоянии.

Многоцентровые гидрогеназы (содержащие больше четырех атомов железа в активном центре) ведут себя существенно иначе. Если в окисленном состоянии они также дают сигналы ЭПР, похожие на сигнал $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$, то после их восстановления наблюдаются спектры, характерные для восстановленных ферредоксинов, т. е. для состояния кластера $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$, с типичным $g = 1,94$. Гидрогеназа из *Megasphaera elsdenii*, содержащая три кластера на молекулу, в окисленном состоянии имеет сигнал ЭПР с $g > 2$, несколько нетипичный для НИРП; при ее восстановлении проявляется характерный ферредоксиновый спектр [69]. Гидрогеназа из *C. pastorianum*, содержащая в активном центре 12 атомов железа, наоборот, в восстановленном состоянии характеризуется наличием в ферредоксиновом спектре дополнительного «экстраординарного» сигнала [70]. В окисленном состоянии, как считают авторы, наблюда-

ется только сигнал $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$. Количество кластеров 4Fe—4S в гидрогеназе *D. vulgaris* равно трем [38, 71, 72]. Спектры ЭПР этой гидрогеназы типичны для многоцентровых гидрогеназ [38, 73].

Окислительно-восстановительное титрование фермента из *A. eutrophus H16*, содержащего 12 атомов железа на молекулу, при различных температурах в 80%-ном диметилсульфоксида позволило различить сигналы ЭПР двух 4Fe—4S- и двух 2Fe—2S-центров [39, 40]. Электронные переходы происходят при потенциалах соответственно —445 и —325 мВ.

Таким образом, одноцентровые гидрогеназы в окисленном состоянии содержат кластер $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$. При восстановлении они переходят в активное состояние, отвечающее форме $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$. Окислительно-восстановительные потенциалы указанных электронных переходов лежат, в основном, в отрицательной области (например, для *Tb. roseopersicina* при —276 мВ [55]). Следовательно, гидрогеназы этого типа имеют свойства низкопотенциальных НИРИ белков. Перевосстановление приводит, по-видимому, к переходу в состояние $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$, в котором ферменты являются неактивными.

Сложнее дело обстоит с многоцентровыми гидрогеназами. В восстановленном состоянии спектры ЭПР похожи на спектры кластеров $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$, в окисленном — на спектры $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$. Чен предположил, что в гидрогеназе из *Cl. pastorianum* [52], содержащей три 4Fe—4S центра [27], имеются два кластера $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ и один кластер $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$ в окисленном и два кластера $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$ и один $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ в восстановленном состояниях. Однако одновременный перенос трех электронов (в интервале изменения потенциала 50–60 мВ) возможен только в случае строго изолированных кластеров, тогда как имеющиеся данные свидетельствуют о взаимодействии последних. Авторы [38] показали, что трехцентровая (включающая три кластера типа 4Fe—4S) гидрогеназа из *D. vulgaris* в окисленном состоянии не содержит кластеров $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$. Вид спектра, этой гидрогеназы, напоминающего спектр НИРИ, обусловлен, по-видимому, спин-спиновым взаимодействием кластеров, находящихся в других степенях окисления ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$, $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$). К сожалению, более детально электронную структуру активного центра гидрогеназы определить не удалось.

4. Взаимосвязь физических и катализических свойств гидрогеназ

Представляет интерес сопоставление не только физических, но и катализических свойств одноцентровых и многоцентровых гидрогеназ. Как видно из таблицы, активность последних как по поглощению, так и по выделению водорода в среднем на два порядка выше по сравнению с одноцентровыми. Ниже будет показано, что расщепление молекулы водорода и обмен протонами с растворителем не лимитируют в реакциях активации и выделения H_2 .

Исходя из этого, можно предложить две гипотезы, касающиеся роли железосерных кластеров в катализе. Согласно первой из них, кластер представляет собой электронную структуру, стабилизирующую переходное состояние и тем самым снижающую высоту активационного барьера (см., например, [77]). С этой точки зрения маловероятным представляется путь окисления водорода через промежуточное образование заряженных форм фермента (E^- , E^{2-}), как предполагается, например, в [52]. Чрезмерная стабилизация промежуточного комплекса, наоборот, приведет к увеличению высоты активационного барьера [77].

Согласно второй гипотезе, изменение симметрии железосерных кластеров при окислительно-восстановительных переходах (см. выше) может приводить к вынужденной стабилизации или дестабилизации одного из электронных состояний под влиянием теплового движения белковой глобулы, что приведет к понижению энталпии активации за счет энтропии.

Сравнительная характеристика физических и катализитических свойств некоторых гидрогеназ

И. источник гидрогеназы	Содержание на молекулу		Молекулярный вес	Тип спектров ЭПР		Активность, мкмоль H ₂ /мин·мг		Субстрат	Ссылки
	Fe	S		окисленное состояние	восстановленное состояние	поглощение H ₂	выделение H ₂		
<i>Th. roseopersicina</i>	4	4	68 000 (1×47 000, 1×25 000)*	HIPIP	—	1,2 19,0	5,0 —	MV BV	[55]
<i>Rh. capsulata</i>	4	4	73 000	HIPIP	—	0,075 0,83 1,4	0,012 — —	MV BV MC	[74,75]
<i>Rh. rubrum</i>	4	4	67 000	HIPIP	—	0,26 1,8 2,5	26,0 7,0	MV BV MC	[64,65]
<i>Chromatium vinosum</i>	4	4	61 000—63 000	HIPIP	—	—	425	MV	[67]
<i>Chromatium sp.</i>	4	4	98 000 (2×50 000)*	MIPIP	—	240 78 —	— — 39	MC BV MV	[22] [68]
<i>Megasphaera elsdenii</i>	12	12	50 000	HIPIP (нетипичный)	$g=1,94$	—	630 8400**	MV	[69,71,76]
<i>Ct. pastorianum</i>	12	12	60 000	HIPIP	Fd-спектр; $g \geq 2,0$	1660 — —	317 3960 4000** 5000**	MV MV+Fd MV MV+Fd	[24] [52]
<i>D. vulgaris</i>	12	12	50 000	$g \geq 2,0$	$g_{\perp}=1,86$ $g_{\parallel}=2,03$	4600** 5000** —	— — 3800 10 400**	MV BV MV	[72] [71]

Обозначения: MV — метилвиологен, BV — бензилвиологен, MC — метиленовый синий.

* В скобках приведен субъединичный состав.

** Приводятся значения максимальных скоростей реакций.

Однако наличия железосерных кластеров в молекуле белка еще недостаточно для проявления гидрогеназной активности. В отличие от одноцентровых гидрогеназ, низкопотенциальные НИРП не катализируют ни выделения, ни поглощения водорода. Примером могут служить ферредоксины из *D. gigas* [78] и *M. flavum* [45], содержащие 4 атома железа на молекулу и имеющие окислительно-восстановительные потенциалы соответственно —130 и —420 мВ, а также 6Fe ферредоксин из *T. thermophilis* [79], потенциал которого равен —250 мВ.

5. Роль никеля в гидрогеназном катализе

Как показали исследования последних лет, весьма важным для проявления гидрогеназной активности является наличие никеля в активном центре. Отправной точкой для этого вывода послужили эксперименты по влиянию содержания никеля в культуральной среде на синтез гидрогеназ в процессе роста микроорганизма. Как было показано [80], добавление ЭДТА (в концентрации 150 мкмоль/л) в среду роста трех различных культур *Azospirillum brasiliense*, *A. lipoferum*, *Derxia guttosa* — не влияя на существующую активность, подавляет синтез гидрогеназы и только введение каталитических количеств ионов двухвалентного никеля (10 мкмоль/л) позволяет снять ингибирующее действие ЭДТА. В работе [81] была найдена корреляция между поглощением радиоактивного $^{65}\text{Ni}^{2+}$ клетками *Azotobacter chroococcum* и их гидрогеназной активностью. Добавление ионов двухвалентного никеля в культуральную среду *Chromatium vinosum* [82] приводит к повышению активности гидрогеназы в 3—6 раз, не оказывая влияния на скорость роста микроорганизма.

Было обнаружено, что в процессе очистки гидрогеназы из *Vibrio succinogenes* [83] происходит вымывание никеля из препаратов. Как указывают авторы, зависимость активности фермента от концентрации Ni^{2+} представляет собой прямую, проходящую через начало координат. Правда, отдельные точки этой прямой соответствовали образцам фермента разной степени чистоты.

Участие никеля в гидрогеназном катализе подтверждается физико-химическими данными. Спектр ЭПР фермента из *Chromatium vinosum* [82, 84, 85] свидетельствует о том, что 4Fe — 4S кластер взаимодействует с никелевым центром. Воздействие последнего не проявляется в атмосфере водорода. Невозмущенный спектр кластера удается наблюдать при его переходе в форму 3Fe — nS, которая, как указывают авторы, неактивна в катализе. Никель, обнаруживаемый методом ЭПР, найден также в гидрогеназах из *M. thermoautotrophicum* [86], *D. gigas* [87] и *D. vulgaris* [38].

Спектры ЭПР никеля, присутствующего в гидрогеназе из *D. gigas*, изучали при различных окислительно-восстановительных состояниях фермента [87—89]. Было показано, что никелевый центр способен вступать в реакции одноэлектронного обмена, изменяя степень окисления. Потенциал этого перехода равен —220 мВ при pH 8,5 [88] и сильно зависит от pH ($\partial E / \partial \text{pH} = -60$ мВ) [89]. Таким образом, реакция является протонозависимой, причем однократно протонируется форма Ni^{3+} :



Принимая во внимание характер окислительно-восстановительного перехода (1), нормируем величины потенциалов при pH 7,0. Для многоцентрового фермента из *D. gigas* [88, 89] и одноцентрового из *Chromatium vinosum* [85] получаются достаточно близкие значения (—140 и —150 мВ соответственно). В активном состоянии гидрогеназы (вблизи потенциала водородного электрода) Ni находится в двухвалентном состоянии.

Авторы [85] предполагают, что никелевый центр является первичным акцептором молекулы водорода. Считается, что атом Ni имеет

октаэдрическое окружение с пятью занятыми и одним замещаемым координационным местом. По данным ЭПР минимальное расстояние между атомами железа и никеля в гидрогеназе из *Chromatium vinosum* не превышает 12 Å.

6. Особенности катализа гидрогеназой из *A. eutrophus*

Гидрогеназа из *A. eutrophus* включает еще одну группировку,ирующую в водородном катализе, а именно флавинмононуклеотид (ФМН) [57], что обуславливает ее НАДН-дегидрогеназную активность. Молекула фермента (молекулярная масса 180 000–200 000) содержит по 12 атомов железа и кислотолабильной серы, объединенных в два 4Fe—4S и два 2Fe—2S кластера [39, 40], и две молекулы ФМН [90]. Фермент состоит из четырех субъединиц, причем гидрогеназную активность проявляет только полная молекула [91], тогда как НАДН-дегидрогеназная активность сохраняется у субъединиц с молекулярной массой до 60 000. Фермент из *A. eutrophus* обладает уникальными свойствами, являясь одновременно гидрогеназой и НАДН-дегидрогеназой. В процессе окисления водорода, по-видимому, в результате внутримолекулярного переноса электрона, акцептором электронной плотности является ФМН, который может затем реагировать с НАД, восстанавливая его до НАДН. В работе [92] было показано, что метилвиологен способен «снимать» электронную плотность на пути к молекуле ФМН. Отметим, что восстановленный флавинмононуклеотид, как и НАДН, слабо окисляется кислородом. В результате НАД должен реагировать с ФМН-Н даже в аэробных условиях. Действительно, скорость восстановления НАД водородом, катализируемого гидрогеназой из *A. eutrophus* Z1, в открытой кювете и в анаэробных условиях практически одинакова [93]. Для фермента из *A. eutrophus* H16 [94] отмечено конкурентное ингибирование кислородом по H₂. На последующих стадиях электронная плотность остается недоступной для O₂. Таким образом, уникальная особенность гидрогеназы из *A. eutrophus* состоит в том, что этот фермент способен проводить окисление водорода с последующим восстановлением акцептора, имеющего низкий отрицательный потенциал, практически независимо от присутствия кислорода. Это неосуществимо пока больше ни на одном катализаторе.

IV. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ЭФФЕКТОВ НА АКТИВНОСТЬ ГИДРОГЕНАЗ

1. Роль ионной силы раствора

В литературе приводятся противоречивые данные относительно влияния ионной силы раствора на активность гидрогеназ. Например, на ферменты из *Paracoccus denitrificans* [95, 96] и *D. vulgaris* [71] высокая ионная сила оказывает ингибирующее действие. Активность гидрогеназы из *Chromatium vinosum* [67] значительно падает в присутствии сульфатов и хлорида кобальта. Ферменты из *Chromatium* sp. [22] ингибируются ионами тяжелых металлов.

С другой стороны, гидрогеназа из *Megasphaera elsdenii* [69, 71] увеличивает свою активность при повышении ионной силы раствора. Отмечено стабилизирующее влияние хлоридов в концентрациях больше 0,7 М на фермент из *Rh. rubrum* [97]. Гидрогеназа из *Spirilina maxima* [98] инактивируется ионами меди и цинка, однако присутствие железа, марганца, магния и кальция приводит к незначительной активации.

Противоречивость приведенных данных дает некоторые указания на механизм влияния. Ионная сила, по-видимому, воздействует на белковые глобулы. Очевидно, белки даже одного микроорганизма, по-разному локализованные в клетке, могут обладать существенными различиями. В заключение упомянем о сохранении активности гидрогеназой из *D. vulgaris* [99] в лиофилизованном состоянии.

2. Влияние комплексонов железа

В начале 70-х годов многие авторы обнаружили сильное ингибиование активности гидрогеназ комплексонами железа: α,α' -дипиридилом, о-фенантролином, ЭДТА, CN^- , N_3^- (см., например, [20, 100]). Однако в дальнейшем было найдено, что указанные реагенты слабо влияют на активность ферментов из *Chromatium sp.* [22] и *D. vulgaris* [101]. Гидрогеназы из *Anabaena cylindrica* [102] и *E. coli* [103] не ингибируются α,α' -дипиридилом, а фермент из *Chromatium vinosum* [67] не подвержен влиянию CN^- и N_3^- . Более того, ЭДТА, α,α' -дипиридил и о-фенантролин оказывают пролонгирующее действие против инактивации кислородом гидрогеназы из *Ct. pastorianum* [104], а CN^- , N_3^- и F^- не оказывают влияния на ее активность в концентрациях до 10^{-2} М [105].

Хотя признано, что указанные комплексы железа не являются ингибиторами гидрогеназ [14, 15], до настоящего времени появляются работы, в которых отмечается падение их активности в присутствии ЭДТА, CN^- , N_3^- [98]. Воздействие этих реагентов, по-видимому, связано с частичной деструкцией железосерного кластера и, таким образом, должно зависеть от устойчивости последнего. Действительно, в работе [102], где обнаружено отсутствие влияния α,α' -дипиридила на активность гидрогеназы из *A. cylindrica*, отмечена устойчивость фермента к инактивации кислородом. Необычайная стойкость кластеров из *Chromatium sp.* к экструзии [106] хорошо согласуется с их нечувствительностью к комплексонам железа [22].

Особо следует рассмотреть влияние окиси углерода. Ингибирующее действие СО было найдено во всех работах, где изучали ее влияние на активность гидрогеназ. Трудно предположить, что при этом происходят какие-либо изменения в электронной структуре железосерного кластера, поскольку СО не оказывает влияния на его спектр ЭПР [67, 68]. Установлено, что на активном центре фермента сорбируется одна молекула СО [67, 102]. В реакции окисления водорода ингибиование окисью углерода является конкурентным по H_2 [105, 107—109] и неконкурентным по акцептору электронов [107, 108]. Таким образом, в рамках гипотезы о том, что никелевый центр является акцептором молекулы H_2 , а железо-серный кластер стабилизирует промежуточные состояния при переносе электрона, ингибирующее действие СО становится легко объяснимым. Окись углерода, очевидно, блокирует свободное координационное место никелевого центра, недоступное для более крупных комплексонов. На это координационное место сорбируется также и молекула водорода.

3. Механизмы инактивации гидрогеназ кислородом

Высокая чувствительность гидрогеназ к кислороду хорошо известна. Поэтому выделение ферментов из строгих анаэробов старались иногда проводить в условиях контролируемого отсутствия O_2 [24, 100, 110]. Дальнейшие исследования позволили отказаться от такого усложнения биохимических методик. Были выявлены два механизма воздействия кислорода на активность гидрогеназ: 1) обратимое окисление активного центра, при котором сохраняется возможность реактивации его восстановителем, 2) медленная необратимая инактивация. Наличие последней было доказано в работе [111].

Медленная необратимая инактивация на воздухе характерна для всех гидрогеназ. Тем не менее фермент из *A. eutrophus Z1* оказался более стабильным при хранении на воздухе, чем в атмосфере инертного газа или водорода [93]. Стабилизирующее действие окислителей отмечено также в работах [39, 40]. Кинетика необратимой инактивации гидрогеназ кислородом свидетельствует о ярко выраженном двухфазном характере процесса [93, 112, 114], причем восстановленная форма фермента является лабильной, а окисленная — стабильной [93]. Вывод о

большой устойчивости к O_2 окисленной гидрогеназы по сравнению с восстановленной подтверждается и другими данными [39, 71, 113].

Попытки стабилизировать гидрогеназы на воздухе в первую очередь связаны с иммобилизацией. Двухфазный характер инактивации фермента из *Cl. pastorianum* [114] сохранялся и после иммобилизации на стеклах, однако при этом достигалась его стабилизация. Степень блокировки активного центра фермента, определяемая по отношению его активности в присутствии низкомолекулярного (метилвиологен) и высокомолекулярного (ферредоксин) переносчиков электронов, хорошо коррелировала со стабилизирующим эффектом.

Оригинальный метод защиты от O_2 был предложен в работе [115]. Иммобилизацией белка на заряженной поверхности полинионного адсорбента можно создать микроокружение, в котором происходит «высаливание газов». Адсорбция гидрогеназы из *Cl. pastorianum* на DEAE-целлюлозе или Даэкс 1-X2 повышала стабильность фермента на воздухе в 20÷25 раз. Было отмечено при низкой ионной силе выключение также и водорода из контакта с гидрогеназой. Следовательно, таким методом можно осуществлять реакцию только в направлении выделения H_2 .

Наиболее интересным, однако, оказался другой путь стабилизации, проясняющий механизм инактивирующего действия кислорода. Оказалось, что комплексы железа — ЭДТА, α, α' -дипиридил, *o*-фенантролин, Chelex-100 — в концентрациях 0,01÷0,5 М оказывают пролонгирующее действие на гидрогеназу из *Cl. pastorianum* [104], а α, α' -дипиридил и бензилвиологен [103] снижают скорость кислородной инактивации фермента из *E. coli*. Наконец, был обнаружен защитный эффект окиси углерода против действия O_2 и показано, что гидрогеназа из *Chlamidomonas reinhardi* реагирует с одной молекулой кислорода на лимитирующую стадию инактивации [116].

Сообщалось, что взаимодействие восстановленного фермента из *A. eutrophus* H16 с O_2 приводит к появлению в растворе супероксидных радикалов O_2^\cdot [117]. Последние, как и перекись водорода, сильнее инактивируют гидрогеназы из *E. coli*, *Cl. pastorianum* [103], *Th. roseopersicina* и *Rh. capsulata* [118], чем молекулярный кислород. Возможно, это один из факторов, обусловливающих относительную лабильность восстановленных форм ферментов. Однако на гидрогеназу из *A. eutrophus* H16 супероксидные радикалы не оказывали воздействия [94].

Деструкция кислородом железосерных кластеров в гидрогеназах до некоторой степени аналогична интерконверсии в ферредоксинах. Кластер 4Fe—4S способен переходить в форму 3Fe—nS с высвобождением атома железа в раствор, в частности, под влиянием O_2 [49]. Кластер 3Fe—nS считается неактивным в водородном катализе [82, 84, 85, 87]. Кроме того, в [84, 85] при исследовании спектров ЭПР гидрогеназы из *Chromatium vinosum* было найдено, что в результате интерконверсии нарушается электронное взаимодействие железосерного и никелевого центров, что также существенно для катализа. Предполагается, что из кластера высвобождается ближайший к никелю атом железа. Однако попытки провести реконструкцию гидрогеназ по аналогии с ферредоксинами [49] привели к возврату лишь следов активности для *D. vulgaris* [119] и в ряде случаев не имели успеха. Существует, однако, косвенное подтверждение предлагаемой гипотезы. Тот факт, что ионы двухвалентного железа стабилизируют гидрогеназу из *Azotobacter chroococcum*, препятствуя потере его активности [62], можно интерпретировать как следствие их воздействия на кинетику деструкции кластера 4Fe—4S, происходящей с выделением иона двухвалентного железа в раствор.

Другим следствием воздействия кислорода на гидрогеназы является быстрое обратимое ингибирование. Как уже указывалось, при выделении и хранении на воздухе ферменты находятся в неактивном состоянии. Их реактивацию можно осуществить добавлением восстановительных агентов. Кроме того, при окислении H_2 или дейтерообмене после неко-

торого периода индукции возможен автокаталитический разгон реакции [20, 57, 120—122].

Детальное исследование явления автокатализа было проведено на примере ферментов из *Th. roseopersicina* [120] и *A. eutrophus* [93]. Было показано, что период индукции уменьшается или полностью снимается при добавлении восстановительных агентов, например, дитионита натрия, или незначительных количеств продукта, т. е. восстановленной формы акцептора электронов. Величина лаг-периода уменьшается также при увеличении концентрации фермента [93, 120, 122, 123] и акцептора электронов [120], что весьма характерно для реакций в автокаталитическом режиме [120]. Однако при восстановлении НАД водородом, которое катализируется гидрогеназой из *A. eutrophus* Z1, наблюдается обратная зависимость: период индукции увеличивается с повышением концентрации НАД [93]. Напомним, что НАДН ингибитирует гидрогеназу из *A. eutrophus* Z1 [91], расщепляя ее на субъединицы. Наложение эффекта ингибирования продуктом и приводит к такой экстраординарной зависимости.

Принципиальное значение имеет вопрос о механизме активации гидрогеназы: протекает ли оно под действием водорода, восстановленного акцептора электронов или в результате профермент-ферментного взаимодействия. Данные по автокатализу свидетельствуют о том, что непосредственной активации фермента водородом не происходит. При окислении водорода метилвиологеном [120] активация гидрогеназы из *Th. roseopersicina* происходит исключительно за счет взаимодействия неактивного фермента с восстановленным метилвиологеном. Следует, однако, отметить, что в данной реакции концентрации MV^{2+} была много больше концентрации фермента.

Изучение дейтерообмена гидрогеназы из *A. eutrophus* H16 [123] показало, что в растворе фермент может активироваться и без переносчика электронов, тогда как в иммобилизованном состоянии в отсутствие фермент-ферментного взаимодействия для этого необходим свободный переносчик электронов. Невозможность активации фермента непосредственно водородом подтверждена также в работе [92]. Следовательно, гидрогеназа, обратимо инактивированная кислородом, может восстанавливать свою активность в автокаталитическом режиме за счет взаимодействия либо с восстановленной формой переносчика электронов, либо с молекулами активного фермента.

В 1954 г. была предложена гипотеза «оксигенации», согласно которой [122] обратимое инактивирующее действие кислорода сводится к образованию комплекса, а не к окислительно-восстановительной реакции:



где EO_2 — неактивная, E — активная формы фермента. Кислород способен выделяться из активного центра фермента в результате диссоциации. Таким образом происходит, как считают авторы [122], активация гидрогеназы.

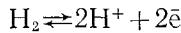
Поскольку эта теория получила достаточно широкое распространение [13, 15], необходимо остановиться на ней подробнее. Доказательством «оксигенации» авторы [122] считают наличие корреляции между «кислородпоглощающей» активностью восстановителя и степенью уменьшения периода индукции для гидрогеназы *P. vulgaris*. Однако лаг-период окисления водорода, катализируемом гидрогеназой из *A. eutrophus*, элиминируется как в результате глюкозооксидазной реакции (глюкоза + глюкозооксидаза) [121], которая рассматривается как один из лучших «деоксигенантов» в [122], так и при добавлении незначительных количеств НАДН (10^{-4} М) [93], весьма слабо взаимодействующего с O_2 . Отметим, что потенциал окисления глюкозы в глюконат [124] равен $-0,42$ В [7]. Окислителем в этой реакции может выступать не только кислород.

Наконец, данные об окислительно-восстановительных переходах в активном центре гидрогеназ при активации (см. выше) полностью противоречат гипотезе «оксигенации».

Автокатализ происходит за счет микроподхода активной формы фермента, которая неизбежно присутствует даже при больших положительных потенциалах. В растворе на начальных этапах реакции имеется кислород, так что O_2 реагирует с восстановленными формами фермента и переносчика электронов. В результате этого и появляется зависимость от концентрации кислорода, которая регистрировалась в [122]. Конкуренция между автокатализом и ингибиением реакции кислородом приводит к появлению более сложных зависимостей скорости разгона, в общем случае, от удельной активности гидрогеназы, окислительно-восстановительных потенциалов фермента и акцептора электронов, а также от концентраций всех компонентов, включая O_2 . Указание на наличие пороговой концентрации фермента имеется в работе [123].

4. Влияние рН среды на катализ гидрогеназами

Влияние концентрации ионов водорода на кинетику реакций с участием гидрогеназ определяется большим числом факторов. В реакции



протоны являются продуктом. Следовательно, изменение их концентрации влечет за собой смещение термодинамического равновесия, причем, как известно, сдвиг равновесного водородного потенциала на каждую единицу pH составляет 59,2 мВ. Таким образом, активность акцепторов электронов в окислении H_2 также должна зависеть от pH. Действительно, оптимальное поглощение водорода, как правило, достигается в области щелочных pH, а оптимальное выделение — в области кислых pH [13—15].

Однако для некоторых гидрогеназ, например, из *Chromatium sp.* [22], *Th. roseopersicina* [125], *Rh. capsulata* [126] в интервале pH 7—9 скорость реакции окисления водорода метилвиологеном не зависит от концентрации протонов. Кинетические закономерности катализа гидрогеназами будут рассмотрены в следующей главе.

Концентрация протонов может влиять не только на термодинамические и кинетические параметры самой реакции, но и на целый ряд других факторов. Во-первых, не исключено наличие ионогенных групп в белке, влияющих на катализ. Во-вторых, окислительно-восстановительные переходы железосерных кластеров и никелевых центров также зависят от pH. В-третьих, концентрация протонов может влиять на свойства переносчика электронов и восстановительного агента. Например, авторы [19] наблюдали сдвиг оптимума pH в реакции дейтерообмена, катализируемой гидрогеназой из *D. desulfuricans*, при активации различными восстановителями.

Считается, что восстановленная форма метилвиологена в области pH < 6,0 способна протонироваться и обесцвечиваться [15]. Фернандес с соавт. [126] объяснили наблюдавшиеся другими авторами эффекты обесцвечивания MV^+ в кислых растворах потерей восстановительной способности дитионита натрия, окислительно-восстановительный потенциал которого зависит от pH. При восстановлении металлическим цинком метилвиологена коэффициент экстинкции восстановленной формы последнего не зависел от pH вплоть до значения 5,0 [127].

V. КИНЕТИКА РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ГИДРОГЕНАЗАМИ

Как в природе, так и в искусственных системах гидрогеназы способны выступать в качестве катализаторов реакций двух типов. С одной стороны, они активируют молекулярный водород для последующих превращений, в том числе для окисления H_2 . С другой стороны, гидрогеназы

зы способны катализировать выделение водорода. Реакции дейтерообмена и орто — пара-конверсии водорода включают оба процесса. В целом эти ферменты ускоряют установление равновесия в системе:



Приведенные реакции могут быть использованы для измерения гидрогеназной активности. Особо следует рассмотреть методики, связанные с выделением водорода. Было найдено [128], что при встряхивании реакционной смеси с частотой больше 200 циклов в минуту процесс выделения H_2 не контролируется диффузией. Указанные условия используются до настоящего времени в большинстве работ. Однако, судя по последним данным [63], невозможно достичь независимости скорости выделения водорода от скорости перемешивания и величины поверхности раздела между жидкой и газовой фазой, т. е. процессы, связанные с выделением H_2 , все же осложнены диффузией. Способ определения концентрации водорода в растворе на электроде Кларка [129] также имеет ряд недостатков. Кроме того, выделение H_2 из восстановленных форм метилвиологена и других переносчиков электронов может быть осложнено перевосстановлением гидрогеназы. Поэтому основное внимание мы уделим кинетике процессов, связанных с активацией водорода.

1. Активация молекулы водорода в активных центрах гидрогеназ

Предполагалось, что лимитирующей стадией процесса является разрыв молекулы H_2 в активном центре гидрогеназ [125]. Однако порядок реакции окисления водорода метилвиологенов в присутствии гидрогеназ из *Th. roseopersicina* [130] и *Rh. capsulata* [126] по H_2 равен нулю. Изучение изотопного эффекта, наблюдающегося при замене водорода на дейтерий в процессе активации с участием гидрогеназ из *A. eutrophus*, *D. desulfuricans* и *Rh. japonicum* [92, 131, 132] подтвердило, что разрыв молекулы H_2 является стадией, определяющей скорость реакции.

Принципиальным для катализа является вопрос о природе этого разрыва. Имеется мнение, что расщепление водорода в активном центре гидрогеназ происходит гетеролитически. Это мнение основано, в частности, на работе [133], в которой при изучении катализируемого гидрогеназой изотопного обмена между H_2 и D_2O в газовой фазе был обнаружен только полупродукт HD. Однако позднее [128] в этой же системе был обнаружен конечный продукт обмена D_2 .

В дальнейшем было предложено [22] сравнивать скорости образования продуктов реакций обмена HD и D_2 . Соотношение скоростей $v_{\text{HD}}/v_{\text{D}_2}$ ($v_{\text{HD}}/v_{\text{H}_2}$) зависит от целого ряда параметров, например, от концентрации и активности фермента, так что ее численные значения не могут служить характеристикой системы. Тем не менее следует отметить, что при проведении реакций обмена с участием гидрогеназ из: *Chromatium sp.* [22], *D. desulfuricans* [134], *D. vulgaris* [128], *Th. roseopersicina* [135], *A. eutrophus* [123], *Rh. japonicum* [132] скорости образования HD совпадали по порядку величины со скоростями образования D_2 и, как правило, были не меньше последних. По мнению авторов [22], это следует рассматривать как несомненное свидетельство в пользу механизма гетеролитического разрыва молекулы H_2 , поскольку на платиновом катализаторе продукт состава HD, в отличие от D_2 , практически отсутствует. Однако платина представляет собой многоцентровый катализатор, таким образом, каждый атом водорода после разрыва молекулы ведет себя независимо, в то время как активный центр гидрогеназы является изолированной электронной системой со строго обозначенными окислительно-восстановительными электронными переходами.

Отношение скоростей образования полупродукта и продукта обмена падает при повышении концентрации фермента, что свидетельствует наряду с приведенными выше данными в пользу модели:

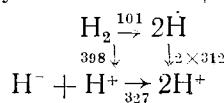


В работе [128] была обнаружена независимость отношения HD/D₂ от парциального давления водорода. Этот факт не является опровержением модели (2), поскольку он может найти объяснение и в рамках этой схемы, например, при совпадении порядков реакций образования HD и D₂ по H₂.

Зависимость скорости дейтерообмена на гидрогеназе из *Rh. japonicum* [132] от pH симбатна влиянию pH на скорость выделения водорода. В то же время наблюдается относительная независимость скорости поглощения H₂ от концентрации протонов в тех же пределах.

Приведенные результаты свидетельствуют в пользу механизма активации водорода через промежуточное образование фермент-гидридного комплекса EH⁻. Серьезных фактов, противоречащих этому механизму, в литературе нет. Более того, в ряде работ по кинетике реакций с участием гидрогеназ имеются прямые указания на возможность протекания процесса через промежуточное образование EH⁻ [52, 123, 128, 132].

Однако это еще не позволяет сделать выводы о механизме активации и расщепления молекулы водорода в активном центре гидрогеназ. Уместно привести энергетический цикл превращения между H₂ и протонами [136] (численные значения указаны в ккал/моль):



Для реакций в водной среде необходимо учесть энергию сolvатации [137], таким образом, на гетеролитический разрыв молекулы водорода в растворе необходимо затратить всего 33 ккал/моль.

Одноцентровые гидрогеназы в активном состоянии содержат кластер [Fe₄S₄]²⁺ и Ni²⁺. Не исключена возможность и гомолитического разрыва молекулы H₂ за счет перераспределения электронной плотности и образования связи ковалентного типа. Затем в результате протекания быстрой внутримолекулярной реакции в активном центре гидрогеназы может происходить высвобождение протона и образование формы EH с целью компенсации энергетических затрат.

Перейдем к обсуждению активации молекулы H₂, происходящей в активном центре гидрогеназ в процессе ее окисления. Сначала рассмотрим вопрос о взаимном влиянии двух субстратов: акцептора электронов и H₂. Как уже было указано, окись углерода является конкурентным ингибитором по водороду и неконкурентным по акцептору электронов. При изучении взаимного влияния H₂ и окисленной формы метилвиоло-гена было найдено, что в случае гидрогеназ из *Cl. pastorianum* [108, 138], *M. thermoautotrophicum* [109], *Rh. japonicum* [107] эти субстраты реагируют с различными участками активного центра. С другой стороны, достаточно сильно отличающиеся по природе акцепторы — высокомолекулярный цитохром c₃ и низкомолекулярный метилвиологен — взаимодействуют с одним и тем же участком активного центра гидрогеназы *D. vulgaris* [139]. Таким образом, в реакции окисления водорода молекулы акцептора электронов и H₂ присоединяются каждый к своему участку активного центра гидрогеназ.

Процессы активации водорода гидрогеназами происходят достаточно быстро. В реакции окисления H₂, катализируемой одноцентровыми ферментами из *Th. roseopersicina* [130] и *Rh. capsulata* [126], наблюдается нулевой порядок по водороду. Этот факт является довольно неожиданным для кинетики процессов с участием гидрогеназ. Ранее в процессе окисления H₂ метилвиологеном для гидрогеназ из *Cl. pastorianum* [108, 138] и *D. vulgaris* [140] зависимость от концентрации водорода описывалась классической функцией Михаэлиса. Ненулевой порядок по H₂ проявляется и при окислении последнего метиленовым синим в присутствии гидрогеназы из *Rh. japonicum* [107].

Отличие ферментов из *Th. roseopersicina* и *Rh. capsulata* от ферментов из *Cl. pastorianum* и *D. vulgaris* состоит в том, что первые относятся к одноцентровым, а последние к многоцентровым гидрогеназам (см.

таблицу). Физические свойства фермента из *Rh. japonicum* изучены слабее, но, как показано в работе [61], в нем содержится 12 атомов железа на молекулу белка.

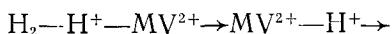
Кинетические параметры реакций с участием гидрогеназ этих групп также по-разному зависят от pH. В процессе окисления водорода метилвиологеном с участием фермента из *Cl. pastorianum* [108] отношение максимальной скорости реакции к константе Михаэлиса (V_{\max}/K_m) увеличивается при уменьшении концентрации протонов в интервале pH 8–10. При этом V_{\max} не изменяется, а K_m резко падает. Это косвенно подтверждает вывод о том, что окисленная форма метилвиологена реагирует с фермент-гидридным комплексом EH^- . В остальных случаях, к сожалению, не удается строго выявить влияние pH на кинетику реакций.

Что касается одноцентровых гидрогеназ из *Th. roseopersicina* [125] и *Rh. capsulata* [126], то в протекающей с их участием реакции окисления H_2 метилвиологеном в диапазоне pH 7–9 максимальная скорость и константа Михаэлиса не зависят от концентрации ионов водорода. Параметры полной кинетической кривой остаются неизменными при варьировании pH в тех же пределах [130].

Тот факт, что скорость ферментативной реакции может проявлять нулевой порядок по концентрациям субстрата и продукта, встречает непонимание в литературе. Так, авторы обзора [15], критикуя результаты из [125], утверждают из общих соображений, что скорость окисления водорода «должна» зависеть от pH.

Рассмотрим наблюдаемые зависимости с учетом известных закономерностей протекания одномаршрутных каталитических реакций в стационарном режиме (см., например, [141]). Концентрация продукта не входит в уравнение скорости таких реакций, если стадия его выделения необратима. Для исключения влияния субстрата необходимо, кроме того, чтобы его присоединение происходило намного быстрее остальных стадий реакции. Следовательно, нулевой порядок реакции означает, что присоединение молекулы водорода и высвобождение протонов из активного центра одноцентровых гидрогеназ *Th. roseopersicina* и *Rh. capsulata* протекают намного быстрее остальных, в том числе окислительно-восстановительных стадий.

В работе [130] была подробно изучена кинетика реакции окисления водорода метилвиологеном, катализируемой гидрогеназой из *Th. roseopersicina*. Для выявления последовательности стадий были определены зависимости $1/V_{\max}$ и K_m/V_{\max} для обоих субстратов от pH и концентрации второго субстрата. Кинетический анализ позволяет выбрать единственную последовательность:



где стрелкой обозначены необратимые стадии. Таким образом, согласно [130], акцептор электронов реагирует с фермент-гидридным комплексом EH^- ; после отщепления второй молекулы акцептора из активного центра фермент остается в протонированной форме.

Итак, кинетические данные подтверждают вывод о том, что активация молекулы водорода в активном центре гидрогеназ приводит к образованию фермент-гидридного комплекса.

На примере рассмотренных ферментов можно проследить кинетические различия многоцентровых и одноцентровых гидрогеназ. В то время как кинетические параметры реакций окисления водорода на одноцентровых гидрогеназах не зависят от pH и концентрации H_2 , на многоцентровых ферментах реакция имеет ненулевой порядок по водороду и протонам. Если бы скорости окислительно-восстановительных стадий для обеих групп ферментов были сравнимы, отсюда следовало бы, что расщепление молекулы H_2 на многоцентровых гидрогеназах должно протекать медленнее, чем на одноцентровых. Однако на опыте наблюдается обратное соотношение: активность многоцентровых гидрогеназ в среднем на два порядка выше, чем одноцентровых. Таким образом, скорости

окислительно-восстановительных стадий значительно выше в случае многоцентровых гидрогеназ, чем одноцентровых. В этом и заключается их основное кинетическое различие.

Было бы интересно сравнить также скорости образования фермент-гидридного комплекса для обеих групп гидрогеназ. Однако для этого необходимо знать зависимость константы Михаэлиса (по водороду) от pH. К сожалению, в литературе нет таких данных. Гидрогеназа из *Th. roseopersicina* [130] образует EH⁻ со скоростью, характеризуемой константой порядка 10^5 мин⁻¹. Эта величина сравнима с константами скорости реакций, катализируемых многоцентровыми гидрогеназами, (их вычисляют из максимальных скоростей [13, 14], см. таблицу), которые имеют порядок 10^4 — 10^5 мин⁻¹. Таким образом, активация молекулы водорода с образованием фермент-гидридного комплекса осуществляется одинаково быстро обеими группами гидрогеназ. Поскольку железосерные кластеры одноцентровых и многоцентровых ферментов обладают весьма различными свойствами, можно предположить, что активация молекулы водорода происходит не на кластере. Этот вывод хорошо согласуется с гипотезой о том, что акцептором молекулы H₂ является никелевый центр.

Обращает на себя внимание тот факт, что образование фермент-гидридного комплекса EH⁻ в активном центре гидрогеназ происходит с чрезвычайно высокой скоростью. Гетеролитический разрыв молекулы H₂ в условиях металлокомплексного катализа [142] протекает в 10^5 — 10^6 раз медленнее. Однако пока не ясно, какой именно механизм обуславливает столь высокие скорости ферментативных реакций по сравнению с реакциями на известных модельных катализаторах.

2. Окислительно-восстановительные стадии

Рассмотрим взаимодействие фермента с акцептором электронов в реакции окисления водорода. Во-первых, следует отметить, что для всех ферментов характерна зависимость их катализитических свойств от многих факторов. Так, было найдено, что цитохром C₃ значительно стимулирует активность гидрогеназы из *D. desulfuricans* [131]. Более того, скорость выделения водорода из восстановленной смеси метилвиологена и цитохрома C₃ под действием этой гидрогеназы превышает сумму скоростей его выделения из MV и цитохрома, взятых в отдельности [139]. Ингибиторный анализ показал, что оба акцептора взаимодействуют с одним и тем же участком активного центра в ферменте.

Во-вторых, как указывают некоторые авторы [108, 123], реакция дейтерообмена, протекающая в активных центрах гидрогеназ может включать окислительно-восстановительные стадии, обусловленные фермент-ферментным взаимодействием. Добавление акцептора электронов приводит к ингибированию дейтерообмена с участием гидрогеназ из *Ct. pastorianum* [108], *A. eutrophus* [123], *Rh. japonicum* [132]. После полного восстановления акцептора дейтерообмен возобновляется. Следовательно, путь, связанный с восстановлением переносчика электронов, является предпочтительным.

Наконец, как было установлено выше, окислительно-восстановительные стадии являются лимитирующими в катализе гидрогеназами окисления молекулярного водорода.

Зависимость скорости окисления молекулярного водорода, катализируемого гидрогеназами, от концентрации одноэлектронного акцептора (метилвиологен, бензилвиологен), как правило, описывается функцией Михаэлиса. Однако при катализе гидрогеназами из *M. elsdenii* [71, 76] и *D. vulgaris* [53] зависимость обратной величины скорости выделения водорода от обратной концентрации метилвиологена является нелинейной. Это можно объяснить побочными эффектами, например, образованием димеров восстановленной формы метилвиологена [143], диффузией или перевосстановлением фермента, поскольку в [53, 76] нелинейная зависимость скорости выделения водорода в координатах

Лануивера — Берка сочеталась с линейной зависимостью его поглощения. Кроме того, в работе [71] найдено, что реакция выделения H_2 имеет первый порядок по метилвиологену для той же гидрогеназы *D. vulgaris*, (штамм *Hildenborough*) (ср. [53]).

В то же время в работах [59, 139, 140] при использовании гидрогеназы из *D. vulgaris* (штамм *Miyagaki*) была найдена квадратичная зависимость скоростей поглощения и выделения водорода от концентрации метилвиологена. Объяснение этому противоречию будет дано несколько позднее.

За редкими исключениями, обычно наблюдается первый порядок реакции окисления (и образования) водорода по акцептору электронов. Метилвиологен и бензилвиологен являются одноэлектронными медиаторами, и взаимодействие их с активным центром фермента в процессе реакции должно быть разделено необратимой стадией [130, 141].

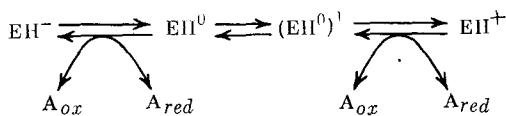
В работах [126, 130] была подробно изучена кинетика взаимодействия фермент-гидридного комплекса с акцептором электронов. Скорость реакции окисления водорода связана с концентрацией акцептора электронов выражением типа уравнения Михаэлиса, причем вид интегральной кривой зависит от концентрации восстановительной формы акцептора. Каждая константа Михаэлиса пропорциональна концентрации восстановленной формы акцептора электронов. Таким образом, уравнение скорости процесса имеет вид:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S] + K_p' [P]} \quad (3)$$

где $[S]$ и $[P]$ — соответственно концентрации субстрата и продукта, K_p' — константа связывания продукта.

В процессе кинетического анализа были рассмотрены различные возможные механизмы, в том числе механизм с обратимой каталитической стадией, общая схема ингибиования продуктом и механизм с обратимым бимолекулярным взаимодействием субстрата. Зависимость кинетических параметров уравнения (3) от окислительно-восстановительного потенциала акцептора электронов позволила отдать предпочтение механизму с обратимым бимолекулярным взаимодействием:

Схема 1



где A_{ox} и A_{red} — соответственно окисленная и восстановленная формы метилвиологена или бензилвиологена. Таким образом, в механизме катализа зарегистрирована медленная внутримолекулярная стадия.

В то же время реакция окисления H_2 , катализируемая гидрогеназой из *Rh. japonicum*, не ингибируется восстановленной формой акцептора электронов (метиленовый синий (МС), феназинметасульфат (ФМС)) [107]. Окислительно-восстановительные потенциалы указанных акцепторов равны соответственно +11 и +80 мВ и сильно отличаются от потенциалов MV и BV (соответственно —440 и —359 мВ). Поскольку «ингибирующий» эффект, как было показано, связан с обратной реакцией, т. е. с донированием электрона, поведение восстановленных МС и ФМС становится вполне понятным. Кроме того, схема 1 выведена для одноэлектронного переносчика.

В схеме 1 между стадиями взаимодействия с акцепторами электронов имеется мономолекулярная стадия, которая и является лимитирующей. Физический смысл этой стадии становится понятен, если учесть, что на отрыв первого электрона от гидрид-иона в газовой фазе требуется приблизительно в 20 раз меньше энергии, чем на отрыв второго. Ве-

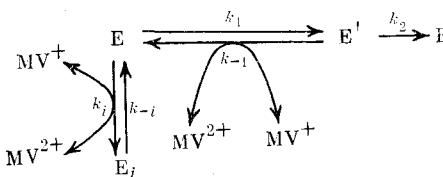
личины ΔH этих процессов равны соответственно 15 и 312 ккал/моль [136].

Отличие многоцентровых гидрогеназ от одноцентровых может заключаться как в различной степени стабилизации промежуточных форм и, таким образом, в изменении соотношения скоростей стадий (1) и (3) в прямом и обратном направлениях (схема 1), так и в ускорении внутримолекулярной стадии (2). Вследствие этого при использовании самых активных гидрогеназ может наблюдаться второй порядок по акцептору электроном. Гидрогеназа из *D. vulgaris* (см. таблицу) является своеобразным рекордсменом по активности и наблюдаемый в присутствии этого фермента второй порядок реакций поглощения и выделения водорода по метилвиологену является вполне объяснимым.

Однако, как было показано [126], в реакции окисления водорода в присутствии гидрогеназы из *Rh. capsulata* также наблюдается второй порядок скорости по метилвиологену. Этот фермент является ярким представителем группы одноцентровых гидрогеназ (см. таблицу), поэтому аналогия с гидрогеназой из *D. vulgaris* не прослеживается. Напомним, что фермент из *Rh. capsulata* принадлежит к группе «односторонних» гидрогеназ [60, 75]. Какими могут быть особенности ферментов этой группы?

Катализатор не способен сдвигать термодинамическое равновесие реакции. Следовательно, единственным возможным объяснением является создание кинетических затруднений: ускорение катализатором прямой реакции и его «выключение» на пути обратного превращения. Авторы работы [63] предположили, что инактивационное перевосстановление для односторонних гидрогеназ происходит уже в положительной области потенциалов относительно водородного электрода в том же растворе. Таким образом, в условиях, термодинамически выгодных для выделения водорода, гидрогеназа становится неактивной. Для фермента из *Rh. capsulata* [75] потенциал инактивационного перевосстановления составил -340 мВ при pH 7,0. При этом на каждую единицу pH изменение потенциала равно ≈ -30 мВ.

Донором электронов для перевосстановления в реакции окисления водорода может быть только восстановленный акцептор электронов. Простейшая схема окислительно-восстановительных стадий катализа гидрогеназой из *Rh. capsulata* выглядит следующим образом:



где E_i — неактивная форма катализатора.

Пользуясь соответствующим уравнением скорости, из кинетических данных можно вычислить потенциал инактивационного перевосстановления ($E_i \approx -387 \pm 5$ мВ при pH 8,5). Эта величина хорошо совпадает со значением, найденным посредством окислительно-восстановительного титрования ($E_i \approx -385 \pm 5$ мВ) [75]. Таким образом, гипотеза об инактивационном перевосстановлении как основе регуляции «односторонних» гидрогеназ получает подтверждение в непосредственном кинетическом исследовании. Следует подчеркнуть, что вывод об общности механизмов катализа распространяется и на группу «односторонних» ферментов. Единственным их отличием от двусторонних гидрогеназ с кинетической точки зрения является наличие характерной стадии инактивационного перевосстановления.

В заключение приведем окончательную схему катализа гидрогеназой из *Th. roseopersicina* (схема 2, по данным [126, 130]), которая является достаточно общей для гидрогеназ из различных источников:

Схема 3



где E — гидрогеназа, A — MV, BV. Стадии (1), (2) и (6) являются квазиравновесными. Равновесие здесь сильно смещено в сторону образования продуктов, так что наличие какого-либо вида необратимости на этой совокупности стадий вполне обусловлено. Стадия (4) также является необратимой, в рамках данного кинетического режима. Ввиду того, что соседние стадии (3) и (5) могут протекать как в прямом, так и в обратном направлениях, а стадия (4) является наиболее медленной, разумно предположить наличие простейшего вида необратимости: $[A_{ox}]k_5 \gg k_{-4}$. Отметим, что полученные ограничения на режим протекания реакции содержат концентрации реагирующих веществ. Таким образом, изменяя условия процесса, можно добиться не только достижения обратимости на указанных участках, но и необратимости в обратном направлении.

VI. КИНЕТИКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ГИДРОГЕНАЗАМИ

Феномен ускорения ферментами электродных процессов получил название «биоэлектрокатализ» [7—11]. Электрод в данном случае выступает в качестве одного из субстратов реакции, донора или акцептора электронов. Для сопряжения ферментативной и электрохимической реакций существуют два пути: медиаторный, когда обмен электронов осуществляется посредством переносчика, способного реагировать и с электродом, и с активным центром фермента, и прямой, в котором фермент непосредственно способен окисляться или восстанавливаться на электроде.

Медиаторный биоэлектрокатализ был реализован с использованием гидрогеназ из *Pr. aestuarii* и *Th. roseopersicina* [144]. Было показано, что условия окисления водорода близки к обратимым: в зависимости от потенциала электрода такая система может работать как с поглощением, так и с выделением водорода.

Уникальной особенностью гидрогеназы из *Th. roseopersicina* является ее способность при сорбции на поверхности электрода из сажи выступать в качестве электрокатализатора окисления-образования молекулярного водорода [145]. Было показано, что в атмосфере H_2 на электроде с иммобилизованной гидрогеназой устанавливается равновесный водородный потенциал. В реакции окисления водорода величина тока, снимаемого с электрода, не зависит от pH и парциального давления H_2 во всем диапазоне значений перенапряжения [126]. Нулевой порядок электрокаталитической реакции по концентрациям субстрата и продукта, как и в гомогенных реакциях, позволяет заключить, что присоединение молекулы водорода и высвобождение протонов из активного центра фермента протекают быстро по сравнению с окислительно-восстановительными, в данном случае электрохимическими, стадиями.

Полная поляризационная кривая электроокисления H_2 описывается

уравнением, отвечающим протеканию двух последовательных потенциалзависимых стадий переноса электрона с активного центра фермента на электрод [126]. Установлено, что электрохимические стадии должны следовать одна за другой, т. е. не могут быть разделены процессами при соединения — диссоциации. Механизм гомогенной реакции включает, кроме того, внутримолекулярную стадию, разделяющую две окислительно-восстановительные стадии. Очевидно, в электроокаталите эта стадия скрыта в электрохимических; можно только наблюдать, что второй электрон переносится на электрод медленнее первого.

Параметры положительной ветви поляризационной кривой позволяют предсказать кинетику обратной реакции, т. е. электровыделения водорода. Отрицательная ветвь обладает худшими токовыми характеристиками по сравнению с ее положительной частью. Таким образом, использование гидрогеназного электрода наиболее целесообразно в реакции окисления H_2 . Кроме того, в электрохимической системе удалось зарегистрировать процесс инактивационного перевосстановления активного центра гидрогеназы, что является доказательством существования этого явления, поскольку экспериментально была исключена возможность влияния каких-либо других факторов инактивации.

Таким образом, исследование кинетики электрохимической реакции с участием гидрогеназы из *Th. roseopersicina* не только подтверждает, но и дополняет выводы о закономерностях гомогенной кинетики и катализических свойствах гидрогеназ, сделанные в предыдущем разделе.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре рассмотрены наиболее общие физико-химические свойства гидрогеназ, строение их активного центра и особенности катализа. В заключение авторам хотелось бы предложить гипотезу молекулярного механизма действия этих ферментов.

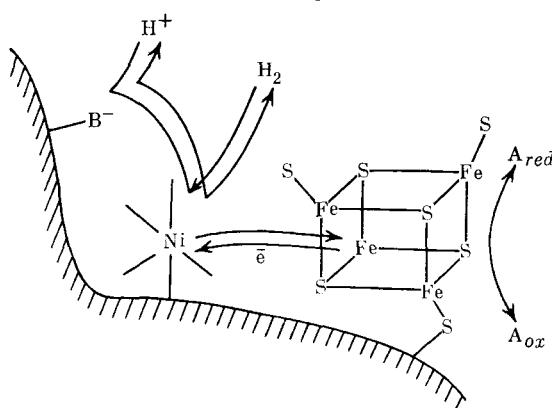
Нам удалось разделить гидрогеназы на две группы, различающиеся по физическим свойствам, активности и кинетическим параметрам в реакции окисления водорода. Одноцентровые гидрогеназы содержат один кластер $4Fe-4S$. Их активность в среднем на два порядка ниже, чем у многоцентровых, содержащих в активном центре несколько железосерных кластеров. В то время как присоединение молекулы водорода и высвобождение протонов обе группы гидрогеназ проводят одинаково быстро, наблюдается заметное различие в скоростях на совокупности окислительно-восстановительных стадий. Последние, очевидно, протекают с участием в активном центре железосерных структур.

Удалось, кроме того, выявить кинетическую схему гидрогеназного катализа. Активация молекулы водорода в активном центре гидрогеназ приводит к образованию фермент-гидридного комплекса EH^- . В реакции окисления H_2 взаимодействие одноэлектронного акцептора с активным центром представляет собой обратимый бимолекулярный процесс. Присоединению второй молекулы акцептора предшествует медленная внутримолекулярная стадия.

Несспоримым является участие никеля в гидрогеназном катализе. Это подтверждается, во-первых, перекрыванием электронных орбиталей никелевого и железосерного центров. Во-вторых, ингибиторный анализ и характер взаимного влияния субстратов указывают на то, что молекулы H_2 и акцептора электронов взаимодействуют с различными участками в активном центре. Кроме того, прослеживается параллель между относительным равенством скоростей активации молекулы водорода одноцентровыми и многоцентровыми гидрогеназами и совпадением окислительно-восстановительных потенциалов их никелевых центров, тогда как свойства железосерных кластерных структур этих двух видов гидрогеназ существенно различаются. Наконец, одноэлектронное восстановление Ni^{3+} до Ni^{2+} требует участия акцептора протона. Все это свидетельствует в пользу того, что никелевый центр является первоначальным акцептором молекулы H_2 .

Молекулярный механизм катализа гидрогеназами реакции окисления водорода можно описать с помощью двухцентровой модели:

Схема 3



Молекула H_2 сорбируется на «свободное» координационное место никеля, замещая, например, молекулу воды. Затем происходит гетеролитический разрыв с образованием фермент-гидридного комплекса, по-видимому, не без участия электронной плотности железо-серного кластера. Последний также способен быстро и обратимо акцептировать один из электронов гидрида. Железосерный кластер взаимодействует с акцептором, отдавая «лишний» электрон, также быстро и обратимо. На отрыв второго электрона от гидрида-иона требуется, как известно, на 300 ккал/моль больше энергии, чем на отрыв первого. Следовательно, перенос второго электрона между никелевым и железосерным центрами происходит гораздо медленнее. Эта стадия и проявляется в кинетике как медленная, внутримолекулярная. За ней следует также быстрое взаимодействие с акцептором и депротонирование. Многоцентровые гидрогеназы за счет более тонкой организации железосерных кластеров способны проводить внутримолекулярный перенос второго электрона более быстро. В целом, роль железосерных кластеров в гидрогеназах, как и в других ферментах, например, в нитрогеназе, заключается в стабилизации промежуточных электронных состояний. Наличие пространственно разветвленной структуры необходимо для нивелирования изменения окружающей среды при изменении степени окисления, что, согласно теории реорганизации растворителя, приводит к понижению энергии активации электронного переноса.

В окисленном состоянии гидрогеназы неактивны в реакции окисления водорода, причем утрачивается возможность активации молекулы H_2 . Казалось бы, электрическое поле Ni^{3+} должно в большей степени способствовать гетеролитическому разрыву молекулы H_2 , нежели поле Ni^{2+} . По-видимому, первый акт активации молекулы H_2 состоит в переходе на нее электрона от активного центра гидрогеназы, что приведет к значительному ослаблению связи $\text{H}-\text{H}$. Потенциал перехода $\text{Ni}^{3+} \leftrightarrow \text{Ni}^{2+}$ (-150 мВ) вполне допускает возможность такого донирования. Если бы после этого произошло восстановление Ni^{3+} до Ni^{2+} , например, за счет восстановленного железосерного кластера $([\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+})$, то в координационной сфере Ni^{2+} появилась бы протоноакцепторная группировка. Таким образом, в полученном переходном состоянии реализуются следующие условия для разрыва молекулы H_2 : 1) ослабление $\text{H}-\text{H}$ — связи за счет появления электрона на разрыхляющей орбитали молекулы, 2) наличие двухвалентного атома никеля, способного акцептировать гидрид-ион, 3) появление акцептора протона в координационной сфере никелевого центра и 4) образование окисленного железосерного кластера, способного принять электрон.

Как уже было отмечено, гидрогеназы проводят активацию молекулы водорода и образование фермент-гидридного комплекса с чрезвычай-

но высокими скоростями по сравнению с металло-комплексными катализаторами. Гидрогеназа из *A. eutrophus* способна гидрировать НАД до НАДН. Таким образом, направленная модификация активных центров гидрогеназ или их моделирование открывают путь для создания более высокоеффективных катализаторов гидрирования и дегидрирования органических соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stephenson M., Stickland L. H. Biochem. J., 1931, v. 25, p. 205.
2. Gaffron H., Rubin J. J. Gen. Physiol., 1942, v. 26, p. 19.
3. Ощепков В. П., Красновский А. А. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1976, № 1, с. 87.
4. Weaver P., Lin S., Seibert M. Photobiological Production of Nitrogen — a Solar Energy Conversion Option. Solar Energy Res. Inst. Colorado, USA, 1979.
5. Варфоломеев С. Д. Конверсия энергии биокаталитическими системами. М.: Изд-во МГУ, 1981. 256 с.
6. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Гелиотехника, 1976, № 3, с. 60.
7. Сенек М. Chemike Listy, 1968, v. 62, p. 927.
8. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Ярополов А. И., Богдановская В. А., Тарасевич М. Г. Докл. АН СССР, 1975, т. 255, с. 105.
9. Berezin I. V., Varfolomeyev S. D. Enzyme Engineering, 1980, v. 5, p. 95.
10. Varfolomeyev S. D., Berezin I. V. In: Advances in Physical Chemistry. Ed. by Kolturkin Y. M. M.: Mir, 1981, p. 60.
11. Ярополов А. И., Каракин А. А., Варфоломеев С. Д. Вестник МГУ. Сер. 2, химия, 1983, т. 24, с. 523.
12. Schlegel H. G., Schneider K. In: Hydrogenases Their Catalytic Activity, Structure and Functions. Ed. by Schlegel H. G., Schneider K. Gottingen: E. Goeltze KG, 1978, p. 15.
13. Пинчукова Е. Е. Дисс. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, 1979. 182 с.
14. Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 1981. 344 с.
15. Adams M. W. W., Mortenson L. E., Chen J.-S. Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 594, p. 105.
16. Mortenson L. E., Chen J.-S. In: Microbial Iron Metabolism. Ed. by Neilands J. B. Acad. Press, 1974, p. 231.
17. Nicholas D. J. D., Fisher D. P., Rednoud W. J., Wright H. A. J. Gen. Microbiol., 1960, v. 22, p. 191.
18. Hoberman H. D., Rittenberg D. J. J. Biol. Chem., 1943, v. 147, p. 211.
19. Sadana J. C., Rittenberg D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1963, v. 50, p. 900.
20. Bone D. H. Biochim. biophys. Acta, 1963, v. 67, p. 589.
21. Pures L., Krasna A. I. Biochemistry, 1968, v. 7, p. 1.
22. Gitlitz P. H., Krasna A. I. Ibid., 1975, v. 14, p. 2561.
23. Nacos G., Mortenson L. E. Ibid., 1971, v. 10, p. 2442.
24. Chen J.-S., Mortenson L. E. Biochim. Biophys. Acta, 1974, v. 371, p. 283.
25. Гоготов И. Н., Зорин Н. А., Кондратьева Е. Н. Биохимия, 1976, т. 41, с. 836.
26. Серебрякова Л. Т., Зорин Н. А., Гоготов И. Н. Там же, 1977, т. 42, с. 740.
27. Gillum W. O., Mortenson L. E., Chen J.-S., Holm R. T. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, p. 584.
28. Mortenson L. E., Valentine R. C., Carnahan J. E. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1962, v. 7, p. 448.
29. Malkin R. In: Iron-Sulphur Proteins. Ed. by Lowenberg W. N. Y.—L.: Acad. Press, 1973, p. 1.
30. Orme-Johnson W. H., Sands R. H. Ibid., p. 195.
31. Carter C. W., Kraut J. J., Freer S. T., Alden R. A., Seiker L. C., Adman E., Jensen L. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, p. 3526.
32. Holm R. H. Endeavour, 1975 v. 34, p. 38.
33. Palmer J. Cm. [29], p. 285
34. Sweney W. V., Rabinowitz J. C. Ann. Rev. Biochem., 1980, v. 49, p. 139.
35. Stephus P. J., Thomson A. J., Kesderling T. A., Rawlings J., Rao K. K., Hall D. O. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 5273.
36. Peisach J., Orme-Johnson N. R., Minis W. B., Orme-Johnson W. H. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 5643.
37. Cammak R. Biochem. Soc. Trans., 1975, v. 3, p. 482.
38. Grande H. J., Dunham W. R., Averill B., van Dijk C., Sands R. H. Europ. J. Biochem., 1983, v. 136, p. 201.
39. Schneider K., Cammak R. Cm. [12], p. 221.
40. Schneider K., Gammak R., Schlegel H. G., Hall D. O. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 578, p. 445.
41. Hong J. S., Rabinowitz J. S. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, p. 4995.
42. Carter C. W., Kraut J. J., Freer S. T., Alden R. A. Ibid., 1974, v. 249, p. 6339.
43. Sweeney W. V., Rabinowitz J. C., Yoch D. C. Ibid., 1975, v. 250, p. 7842.

44. Yoch D. C., Carithers R. P., Arnon D. I. Ibid., 1977, v. 252, p. 7453.
 45. Yates M. G., D'Donnel M. J., Lowe D. J., Bothe H. Europ. J. Biochem., 1978, v. 83, p. 291.
 46. Petering D., Fee J. A., Palmer G. J. Biol. Chem., 1971, v. 246, p. 643.
 47. Huynh B. H., Moura J. J. G., Moura I., Kent T. A., le Gall J., Xavier A. V., Munk E. Ibid., 1980, v. 255, p. 3242.
 48. Thomson A. J., Robinson A. E., Johnson M. K., Cammack R., Rao K. K., Hall D. O. Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 637, p. 423.
 49. Moura J. J. G., Moura I., Kent T. A., Lipsomb J. D., Huynh B. H., le Gall J., Xavier A. V., Munk E. J. Biol. Chem., 1982, v. 25, p. 6259.
 50. Van Dijk C., Veeger C. Europ. J. Biochem., 1981, v. 114, p. 209.
 51. Fernandez V. M., Minulla R., Ballesteros A. Arch. Biochem. Biophys., 1982, v. 215, p. 129.
 52. Chen J.-S. См. [12], p. 57.
 53. Grande H. G., van Berkel-Arts A., Bregt J., van Dijk C., Veeger C. Europ. J. Biochem., 1983, v. 131, p. 81.
 54. Дамаскин Б. Б., Петрий О. А. Введение в электрохимическую кинетику, М.: Высшая школа, 1975. 416 с.
 55. Gogolov I. N., Zorin N. A., Serebriakova L. T., Kondratieva E. N. Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 523, p. 335.
 56. Gest H. J. Bacteriol., 1952, v. 63, p. 111.
 57. Schneider K., Schlegel H. G. Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 452, p. 66.
 58. Sadana J. C., Rittenberg D. Arch. Biochem. Biophys., 1964, v. 108, p. 255.
 59. Okura I., Nakamura K.-I., Nakamura S. J. Molec. Catal., 1979, v. 6, p. 311.
 60. Colbeau A., Chabert J., Vignais P. M. См. [12], p. 183.
 61. Arp D. J., Burris R. H. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 570, p. 221.
 62. Van der Werf A. N., Yates M. G. См. [12], p. 307.
 63. Зорин Н. А., Серебрякова Л. Т., Гоголов И. Н. Биохимия, 1984, т. 49, с. 1316.
 64. Adams M. W. W., Hall D. O. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, v. 77, p. 730.
 65. Adams M. W. W., Hall D. O. См. [12], p. 159.
 66. Adams M. W. W., Hall D. O. Arch. Biochem. Biophys., 1979, v. 195, p. 288.
 67. Van Heerkhuizen H., Albracht S. P. J., Slater E. S., van Rheenen P. S. Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 657, p. 26.
 68. Strekas T., Antanaitis B. S., Krasna A. I. Ibid., 1980, v. 611, p. 1.
 69. Van Dijk C., Grande H. J., Mayhew S. G., Veeger C. Europ. J. Biochem., 1980, v. 107, p. 251.
 70. Srbes D. L., Burris R. H., Orme-Johnson W. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 4795.
 71. Mayhew S. G., van Dijk C., van der Westen H. M. См. [12], p. 125.
 72. Van der Westen H. M., Mayhew S. G., Veeger C. FEBS Letters, 1978, v. 86, p. 122.
 73. Le Gall J., DerVartanian D. V., Spilker E., Lee J.-P., Peck H. D. Biochim. Biophys. Acta, 1971, v. 234, p. 525.
 74. Colbeau A., Vignais P. M. Ibid., 1981, v. 662, p. 271.
 75. Серебрякова Л. Т., Зорин Н. А., Гоголов И. Н. Биохимия, 1984, т. 49, с. 1456.
 76. Van Dijk C., Mayhew S. G., Grande H. J., Veeger C. Europ. J. Biochem., 1979, v. 102, p. 317.
 77. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1977. 280 с.
 78. Cammack R., Rao K. K., Hall D. O. Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 490, p. 311.
 79. Onnishi T., Blum H., Sato S., Nakazaya K., Honhami K., Oshima T. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 345.
 80. Pedrosa F. O., Yates M. G. FEMS Microbiol. Letters, 1983, v. 17, p. 101.
 81. Partrige C. D. P., Yates M. G. Biochem. J., 1982, v. 204, p. 339.
 82. Albracht S. P. J., Albracht-Elmer K. J., Schmedding D. J. M., Slater E. C. Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 681, p. 330.
 83. Unden J., Bocher R., Knecht J., Kroger A. FEBS Letters, 1982, v. 145, p. 230.
 84. Albracht S. P. J., Kalkman M. L., Slater E. C. Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 724, p. 309.
 85. Albracht S. P. J., van der Zwaan J. W., Fontijn R. D., Ibid., 1984, v. 766, p. 245.
 86. Albracht S. P. J., Graf E.-G., Thauer R. K. FEBS Letters, 1982, v. 140, p. 311.
 87. Le Gall J., Ljungdahl R. O., Moura I., Peck H. D., Xavier A. V., Moura J. J. G., Teixeria M., Huynh B. H., DerVartanian D. V. Biochim. Biophys. Res. Commun., 1982, v. 106, p. 610.
 88. Teixeria M., Moura I., Xavier A. V., DerVartanian D. V., Le Gall J., Peck H. D., Huynh B. H., Moura J. J. G. Europ. J. Biochem., 1983, v. 130, p. 481.
 89. Cammack R., Patil D., Aguirre R., Hatchigan E. C. FEBS Letters, 1982, v. 142, p. 289.
 90. Schneider K., Schlegel H. G. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, v. 84, p. 564.
 91. Popov V. O., Berezin I. V., Zaks A. M., Gazaryan I. G., Utkin I. B., Egorov A. M. Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 744, p. 298.
 92. Egerer P., Simon H. Ibid., 1982, v. 703, p. 158.
 93. Пинчукова Е. Е., Варфоломеев С. Д. Биохимия, 1980, т. 45, с. 1405.
 94. Shirk B., Probst I. Biochem. Res. Commun., 1980, v. 95, p. 1563.
 95. Sim E., Colbeau A., Vignais P. M. См. [12], p. 269.
 96. Sim E., Vignais P. M. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 570, p. 43.
 97. Kakuno T., Hiura H., Yamashita J., Barthch R. G., Horio T. J. Biochem., 1978, v. 84, p. 1649.

98. Llama M. J., Serra J. L., Rao K. K., Hall D. O. FEBS Letters., 1979, v. 98, p. 342.
99. Kimura K., Suzuki A., Inokuchi H., Yagi T. Biochim. Biophys. Acta, 1979, p. 567, p. 96.
100. Hashke R. H., Campbell L. L. J. Bacteriol., 1971, v. 105, p. 603.
101. Yagi T., Kimura K., Daidoji H., Sakai F., Tamura S., Inokuchi H. J. Biochem. (Tokyo), 1976, v. 79, p. 661.
102. Halenbeck P. C., Benemann J. R. FEBS Letters., 1978, v. 94, p. 261.
103. Henry L. E. A., Adams M. W. W., Rao K. K., Hall D. O. Ibid., 1980, v. 122, p. 211.
104. Klibanov A. M., Kaplan N. O., Kamen M. D. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 547, p. 411.
105. Thauer R. K., Kaufer B., Zahtinger M., Jungermann K. Europ. J. Biochem., 1974, v. 42, p. 447.
106. Strekas T., Krasna A. I. См. [12], p. 141.
107. Arp D. J., Burris R. H. Biochemistry, 1981, v. 20, p. 2234.
108. Erbes D. L., Burris R. H. Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 525, p. 45.
109. Fuchs G., Moll J., Scherer P., Thauer R. См. [12], p. 83.
110. Nakos G., Mortenson L. E. Bioclim. Biophys. Acta, 1971, v. 227, p. 576.
111. Тоай Ч. Д., Варфоломеев С. Д., Гоготов И. Н., Березин И. В. Молекулярная биология, 1976, т. 10, с. 452.
112. Chen J.-S., Blanchard D. K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, v. 84, p. 1144.
113. Van Dijk C., van Berkelaars A., Veeger C. FEBS, 1983, v. 156, p. 340.
114. Lappi D. A., Stolzenbach F. E., Kaplan N. O., Kamen M. D. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, v. 99, p. 848.
115. Klibanov A. M., Kaplan N. O., Kamen M. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 3640.
116. Erbes D. L., King D., Gilbs M. Plant Physiol., 1979, v. 63, p. 1138.
117. Schneider K., Schlegel R. G. Biochem. J., 1981, v. 193, p. 99.
118. Кулакова С. М., Якунин А. Ф., Гоготов И. Н. Прикладная биохимия и микробиология, 1982, т. 18, с. 324.
119. Okura I., Nakamura K.-I., Nakamura S. J. Molec. Catal., 1979, v. 6, p. 299.
120. Варфоломеев С. Д., Бачурин С. О., Тоай Ч. Д. Молекулярная биология, 1977, т. 11, с. 423.
121. Schink B., Schlegel H. G. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 567, p. 315.
122. Fisher H. F., Krasna A. I., Rittenberg D. J. Biol. Chem., 1954, v. 209, p. 569.
123. Egerer P., Gunter H., Simon H. Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 703, p. 149.
124. Кретович В. Л. Введение в энзимологию. М.: Наука, 1967. 352 с.
125. Варфоломеев С. Д., Гоготов И. Н., Тоай Ч. Д., Бачурин С. О. Молекулярная биология, 1978, т. 12, с. 63.
126. Калякин А. А. Дисс. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, 1985.
127. Fernandez V. M., Gulierrez C., Ballesteros A. Analyt. Biochem., 1982, v. 120, p. 85.
128. Tamiya N., Miller S. L. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, p. 2194.
129. Fernandez V. M. Analyt. Biochem., 1983, v. 130, p. 54.
130. Калякин А. А., Ярополов А. И., Зорин Н. А., Гоготов И. Н., Варфоломеев С. Д. Биохимия, 1984, т. 49, с. 611.
131. Yagi T. J. Biochem. (Tokyo), 1970, v. 68, p. 649.
132. Arp D. J., Burris R. H. Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 700, p. 7.
133. Krasna A. I., Rittenberg D. J. J. Amer. Chem. Soc., 1954, v. 76, p. 3015.
134. Krasna A. I. Ibid., 1961, v. 83, p. 289.
135. Зорин Н. А., Гоготов И. Н. Биохимия, 1975, т. 40, с. 192.
136. Термодинамические свойства индивидуальных веществ. Справочник, т. 1, кн. 1/Под ред. Глушко В. П. М.: Наука, 1978. 495 с.
137. Басоло Ф., Пирсон Р. Механизмы неорганических реакций. М.: Мир, 1971. 592 с.
138. Kleiner D., Burris R. H. Biochim. Biophys. Acta, 1970, v. 212, p. 417.
139. Okura I., Nakamura S., Nakamura K.-I. J. Molec. Catal., 1979, v. 5, p. 315.
140. Okura I., Nakamura K.-I., Nakamura S. Inorg. Biochem., 1981, v. 14, p. 155.
141. Калякин А. А., Варфоломеев С. Д., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1984, т. 275, с. 110.
142. Khan M. M. T., Martell A. E. Homogeneous Catalysis by Metal Complexes. N. Y.—L.: Acad. Press., 1974, v. 1. 292 р.
143. Thornalley R. N. F. Biochim. Biophys. Acta, 1974, v. 33, p. 487.
144. Богдановская В. А., Варфоломеев С. Д., Таракевич М. Р., Ярополов А. И. Электрохимия, 1980, т. 16, с. 763.
145. Ярополов А. И., Калякин А. А., Гоготов И. Н., Зорин Н. А., Варфоломеев С. Д., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1984, т. 274, с. 1434.

Межфакультетская проблемная НИЛ
молекулярной биологии и биоорганической
химии им. А. Н. Белозерского
Московского Гос. ун-та им. М. В. Ломоносова