

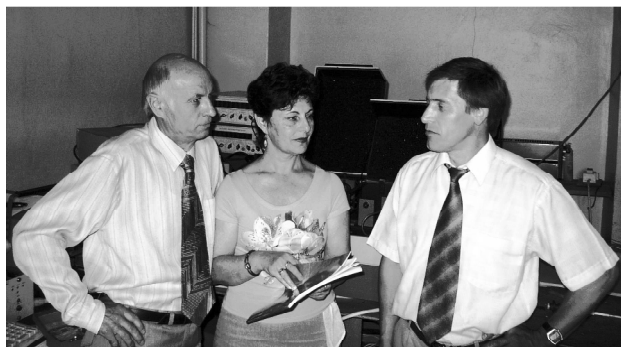
УДК 577.15.08

АЛКОГОЛЬОКСИДАЗА МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ: ОЧИСТКА, СВОЙСТВА, СТАБИЛИЗАЦИЯ

И.М. Арцукевич¹, И.П. Черникевич¹, А.А. Маскевич²

¹УО «Гродненский государственный медицинский университет»

²УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купаль»

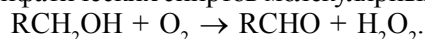


ЧЕРНИКЕВИЧ Иван Петрович – доктор химических наук, профессор кафедры общей и биоорганической химии ГГМУ, т. (0152) 78-34-32

АРЦУКЕВИЧ Ирина Михайловна – кандидат биологических наук, начальник научного отдела ГГМУ, т. (0152) 33-33-52, e-mail: science@grsmu.by

МАСКЕВИЧ Александр Александрович – кандидат физико-математических наук, заведующий кафедрой общей физики ГрГУ им. Я. Купаль, т. (0152) 44-42-97

Являясь катализаторами биохимических процессов, ферменты находят широкое применение в промышленности, ветеринарии, медицине [9]. Алкогольоксидаза (АО) – фермент технологического назначения, осуществляющий окисление низших алифатических спиртов молекулярным кислородом:



Для промышленного его использования важна проблема доступности фермента. Метилотрофные дрожжи активно синтезируют АО для утилизации углеродсодержащих соединений [15]. Фермент локализуется в специфических органеллах - пероксисомах, и может достигать высокого уровня содержания (30-45%) от общего количества растворимого белка в клетке. При его использовании нет необходимости в создании вспомогательных звеньев регенерации флавинадениндинуклеотида (ФАД), поскольку имеется естественная система, в которой молекулярный кислород, являясь акцептором электронов, обеспечивает рециклизацию кофермента [4].

В настоящее время с помощью АО активно отрабатываются условия модельных процессов синтеза алифатических альдегидов: формальдегида и ацетальдегида [20, 22]. Предполагается внедрение в производство технологии получения H_2O_2 для использования его в качестве отбеливателя [17]. В пищевой промышленности на основе АО

Из метилотрофных дрожжей методами ионообменной и аффинной хроматографий, гель-фильтрации выделена и очищена алкогольоксидаза (КФ 1.1.3.13), свободная от примеси сопутствующей каталазы (КФ 1.11.1.6). Предполагается, что формальдегид имеет два участка связывания с ферментом: один в области активного центра, другой – ингибиторного. Азид натрия является аллостерическим активатором алкогольоксидазы, проявляя одновременно стабилизирующий эффект. Эффект лиганда реализуется через снижение диссоциации комплекса флавинадениндинуклеотида (кофермента) с белком.

Ключевые слова: алкогольоксидаза дрожжей, выделение, очистка, свойства, стабилизация

Catalase-free alcohol oxidase (AO) was isolated from methylotrophic yeast and purified by means of ion-exchange and affine chromatography as well as by employing gel filtration. Formaldehyde (substrate) was found to have two enzyme binding sites: the first was in the active center; the second – in the inhibitory center. Sodium azide was an allosteric activator of AO. It simultaneously exerted a stabilizing effect. This ligand lowered the dissociation of the flavin adenine dinucleotide (coenzyme) – protein complex.

Key words: alcohol oxidase of yeast, isolation, purification, properties, stabilization.

разработан метод определения аспартама в напитках [9], а в составе биферментного сенсора – для регистрации концентрации метилового эфира пектина [9]. Широкое применение находит АО для количественного анализа спиртов [21]. Однако во всех упомянутых случаях использование фермента ограничено его невысокой устойчивостью, которая может быть вызвана лабильностью связи ФАД с апоалкогольоксидазой.

Кроме того, многие из перспективных в технологическом плане решений лимитируются трудностью разделения двух сопряженных ферментов – АО и каталазы, локализованных в пероксисомах. Как правило, оно достигается на заключительных этапах очистки, что часто приводит к снижению стабильности глобулы. Принимая во внимание, что каталаза на несколько порядков активнее АО, наличие в препарате даже ее следов мешает работе с оксидазой [10]. Существует подход, при котором для получения АО, свободной от каталазы, используют мутантные штаммы, дефектные по способности синтезировать каталазу [16]. Однако, как

показали авторы [16], каталазо-дефицитные клетки характеризуются сниженным синтезом АО, что делает этот способ экономически нерентабельным.

Цель настоящей работы - разработка эффективного препаративного метода получения АО из штамма дрожжей *Candida boidinii* КД-1, свободного от примеси каталазы, адаптация метода к другим метилотрофным дрожжам (*Pichia pastoris* и *Hansenula polymorpha*), а также исследование свойств фермента с попыткой его стабилизации.

Материалы и методы

АО получали из дрожжей *Candida boidinii* КД-1 (коллекция Тартусского университета, Эстония), а также *Pichia pastoris* 884 и *Hansenula polymorpha* 1397 (коллекция микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов НАН РБ). Клетки выращивали в периодическом режиме культивированием на минеральной среде, содержащей в 1 л: 5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 г KH_2PO_4 , 0,5 г MgSO_4 и 0,1 г NaCl . В качестве источника углерода использовали 0,4% (по объему) метанол [11]. Культивирование осуществляли в колбах при 29°C в условиях постоянной аэрации при скорости потока воздуха 2 л в минуту. Плотность культуры определяли по поглощению суспензии при 623 нм. Клетки от среды культивирования отделяли центрифугированием (3000g, 15 мин), промывали 20 мМ натрий-фосфатным буфером pH 7,6 и повторно центрифугировали. Полученную биомассу хранили в замороженном состоянии при -10°C. Все операции по выделению и очистке АО проводили при 4-6°.

Активность каталазы определяли при 230 нм по разложению H_2O_2 на спектрофотометре Perkin-Elmer (Швеция) в 70 мМ Na-фосфатном буфере pH 7.0 при 25 °C [8] и выражали в мкмоль/мин на 1 мг белка.

Активность АО измеряли в сопряженной системе по скорости образования H_2O_2 , которая в присутствии пероксидазы восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ) [14]. За обесцвечиванием индикатора следили при 610 нм. Инкубационная смесь содержала: 0.1 мл 0.2 М этанола, 0.06 мл 0.07% ДХФИФ, 0.03 мл (30 мкг) пероксидазы хрена и бесклеточный (7-9 мкг) экстракт или очищенный (2-4 мкг) препарат фермента. Общий объем доводили 0.02 М Na-фосфатным буфером pH 7.6 до 1.2 мл, температура смеси 25°C. Активность выражали числом мкмоль H_2O_2 , образовавшегося за 1 мин в расчете на 1 мг белка ферментного препарата. Измерения проводили на спектрофотометре «Spectol 221» (Германия).

Концентрацию белка определяли по Лоури или спектрофотометрически при 280 нм. Коэффициент кооперативности n_{H} оценивали методом Хилла [5].

Чистоту фермента контролировали электрофорезом в градиенте концентрации полиакриламидного геля [2]. Гели фиксировали 5% ТХУ, окраши-

вали 1% раствором амидочерного 10Б на 7% уксусной кислоте. Для выяснения локализации АО полоски геля нарезали на сегменты толщиной 1 мм, растирали и помещали в инкубационную смесь для определения ферментативной активности. В присутствии АО окраска раствора изменялась от темно-синей до темно-коричневой.

Экспериментальные данные обрабатывали методом вариационной статистики. Регрессионный анализ выполняли методом наименьших квадратов.

В работе использовали: ДЭАЭ-сефадекс А-50 фирмы «Farmacia» (Швеция), ДЭАЭ-целлюлозу, дитиотрейтол фирмы «Reanal» (Венгрия), ДЭАЭ-тойоперл 650М фирмы «Toyo Soda Co» (Япония), пероксидазу хрена - фирмы «Олайн» (Латвия), 2,6-дихлорфенолиндофенол, этанол, метанол, ацетилацетон, ацетальдегид – производства «Реахим» (Россия). Голубую сефарозу получали из сефарозы CL-4В фирмы «Loba Feinchemie» (Австрия).

Результаты и их обсуждение. Потребность в препаративных количествах АО обусловила поиск оптимального источника, который удовлетворял бы следующим условиям: обеспечивал хороший выход биомассы (12-15г за один цикл); характеризовался малым временем удвоения клеток (4-5 ч); низкой температурой биоконверсии метанола (29°C); высоким накоплением активной формы АО (30-40% от общего количества белка). Предварительные исследования показали, что из трех имеющихся перспективных штаммов дрожжей наиболее полно предъявляемым требованиям соответствует штамм *Candida boidinii* КД-1, у которого, как и у всех металотрофов, энергетическое использование метанола осуществляется за счет его окисления до CO_2 и H_2O через формальдегид и формиат, а ассимиляция углерода от формальдегида реализуется по диоксиацетоновому пути [12].

Получение гомогенного препарата алкогольшоксидазы

Экстракция АО: 10 г влажной размороженной биомассы дрожжей суспендировали в 30 мл 10 мМ трис-НСl буфера pH 7.6, содержащего 50 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтола (буфер А). В полученную суспензию добавляли 18 г кварцевого песка, предварительно обработанного концентрированной HCl. Разрушение клеток осуществляли в гомогенизаторе Л-17 при 1000g 15 мин. Цельные клетки и крупные фрагменты осаждали (4000g, 20 мин), а надосадочную жидкость фракционировали методами ионообменной и аффинной хроматографий и гель-фильтрации.

Ионообменная хроматография: Поскольку содержимое пероксисом, основная доля которых приходится на АО и каталазу, структурировано [8], важно было найти условия их изначального разделения. Ни ДЭАЭ-целлюлоза, ни ДЭАЭ-сефадекс

оказались не эффективны. Расфракционировать пики, соответствующие ферментативным активностям, удалось на ДЭАЭ-тойоперле 650 М, сочетающем свойства ионообменника и избирательного адсорбента.

Бесклеточный экстракт, содержащий 810 мг белка, наносили на колонку (2x20 см), заполненную ДЭАЭ-тойоперлом 650М, уравновешенным буфером А. После сорбции фермента колонку промывали 300 мл стартового буферного раствора до исчезновения поглощения при 280 нм. В итоге удалялось до 30% примесных белков. Элюцию сорбированных кислых белков проводили градиентом NaCl от 0,1 до 0,5 М, со скоростью 16 мл/ч. Объемы резервуара и смесителя по 200 мл. Как видно из рис. 1, каталаза выходила несколько раньше АО, активность которой была сосредоточена во фракциях между 70 и 80 мл элюата. В результате уже на первой стадии получен препарат фермента, полностью свободный от следов каталазы. Он содержал до 72% начального количества АО с удельной активностью в 14,5 раз более высокой, чем в исходном экстракте. Фракции с максимальной активностью объединяли, высаливали и осадок собирали центрифугированием.

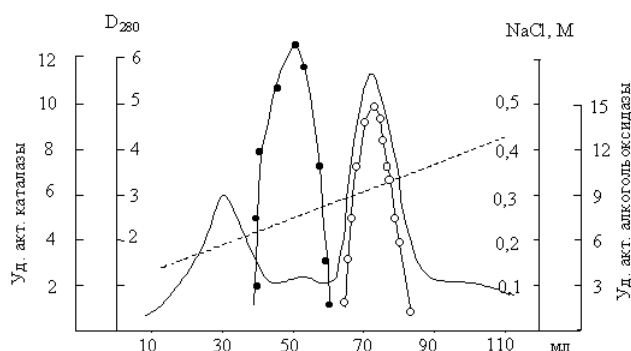


Рис. 1. Профиль элюции белков бесклеточного центрифугата дрожжей *Candida boidinii* КД-1 с колонки с ДЭАЭ-тойоперлом 650М линейным градиентом NaCl (---) и пики ферментативных активностей: ●—● — каталазы, ○—○ — АО; D_{280} — оптическая плотность белковых фракций

Гель-фильтрация: Растворенный в небольшом объеме буфера А белковый осадок наносили на колонку (1,1x100 см) с сефарозой 4В, уравновешенной 0,02 М трис-HCl буфером pH 7,6, содержащим 0,1 М NaCl. Элюцию вели этим же буферным раствором со скоростью 8 мл/час. Фермент вымывался симметричным пиком с близкой удельной активностью в центральных фракциях.

Полученная на стадии гель-фильтрации АО обладала низкой стабильностью. Поэтому фермент сразу высаливали и хранили при -10°C или подвергали очистке методом аффинной хроматографии. По данным электрофореза помимо основной полосы, принадлежащей АО, белок на этой стадии содержал еще слабый минорный неидентифи-

цированный компонент.

Аффинная хроматография: Для удаления примесного белка центральные фракции наносили на колонку (1x3 см) с голубой сефарозой, уравновешенной 0,01 М трис-HCl буфером pH 6,8. Дальнейшее понижение pH нежелательно из-за нарушения устойчивости АО при низких значениях водородного показателя. При pH 6,8 фермент не сорбировался на носителе, что указывало на низкую степень гидрофобности его поверхности. Аналогичное предположение о гидрофильности молекулы АО подтверждено нами при изучении флуоресценции белка [6]. Хотя на заключительном этапе активность фермента возросла незначительно, с 14,1 до 15,3 мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹, на электрофореграммах полоса, соответствующая примесному компоненту, уже не обнаруживалась.

Результаты всех стадий очистки представлены в таблице. На конечном этапе был получен препарат АО с удельной активностью 15,3 мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ и выходом 44,5%. Представленная схема испытана нами на других штаммах метилотрофных дрожжей и во всех случаях очищенная АО не содержала следов каталазы. Однако величины удельных активностей фермента из разных источников различались: 12-14 мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ для АО из *Pichia pastoris* и 10-12 мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ из *Hansenula polymorpha*.

Свойства фермента

АО относится к кислым белкам и хорошо удерживается на анионообменных смолах, не связываясь с катионообменными. Ее максимальная активность проявляется в интервале pH 7,3 - 8,0.

Спектр поглощения фермента из *Candida boidinii* в видимой области сходен со спектром свободного ФАД и имеет максимумы при 390 и 465 нм, что свидетельствует о флавиновой природе кофермента (рис. 2, кривая 1). Соотношение D_{390}/D_{465} равнялось 0,96. Спектр АО из *Pichia pastoris* существенно отличался от спектра из *Candida boidinii*. Соотношение пиков в этом случае равно 1,43 (рис. 2, кривая 3). Различие объясняется тем, что спектр поглощения ФАД, особенно в длинноволновой области, чрезвычайно чувствителен даже к незначительным перестройкам

Таблица. Очистка алкогольоксидазы из метилотрофных дрожжей

Стадия очистки	Белок, мг	Активность		Степень очистки	Выход, %
		общая, мкмоль·мин ⁻¹	удельная, мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹		
Экстракт	810	688	0,85	-	100
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-тойоперле 650М	40,8	501,8	12,3	14,5	71,9
Гель-фильтрация на сефарозе 4В	26,7	376	14,1	16,6	54,6
Аффинная хроматография на голубой сефарозе	20	306	15,3	18,0	44,5

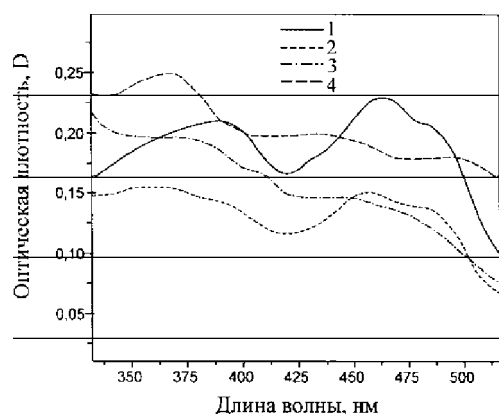


Рис. 2. Спектр поглощения АО в 0.02 М натрий-фосфатном буфере pH 7.6: 1. белок из *Candida boidinii* КД-1, концентрация 2.4 мг/мл; 2. этот же препарат фермента после внесения 2 мМ метанола; 3. белок из *Pichia pastoris*, концентрация 3.9 мг/мл; 4. этот же препарат фермента модифицированный азидом натрия

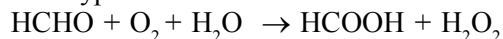
в структуре молекулы и поэтому отражает те изменения, которые молекула кофермента претерпевает при ассоциации с апофермой белка.

Внесение в среду метанола сопровождается частичным снижением интенсивности поглощения обоих пиков (рис. 2, кривая 2), свидетельствуя о появлении в процессе реакции полувосстановленной формы флавина. Попытки уловить свободный флавиновый радикал - семихинон, используя метод ЭПР и индикатор радикалов нитротетразолиевый синий, не увенчались успехом. Скорее всего, наряду с присоединением протона к молекуле ФАД происходит восстановление одной из групп белка.

Молекулярно-кинетические параметры АО

Кинетические зависимости начальной скорости АО реакции от концентрации субстратов (метанола или этанола) сходны и представляли гиперболы, описываемые уравнением Михаэлиса-Ментен. Однако величины K_m существенно различались между собой, составляя для метанола и этанола 3,0 и 12,5 мМ соответственно.

Наряду со спиртами, субстратом АО у некоторых видов бактерий и дрожжей может служить также формальдегид [19], причем продуктом является муравьиная кислота:



Существует мнение, что реакция возможна вследствие почти полной гидратации формальдегида, в результате чего в водных растворах последний реально существует в форме спирта гемдиола - $\text{CH}_2(\text{OH})_2$. Способность АО (и соответственно клеток дрожжей) окислять высокотоксичные соединения (метанол и формальдегид) объясняет повышенный интерес к метилотрофным микроорганизмам не только как продуцентам кормового белка [9], но и с целью утилизации формальдегида и метанола при очистке промышленных стоков [7].

Поскольку кинетические параметры, получаемые на чистых ферментах, отражают закономер-

ности функционирования организма в целом [13], в ряде случаев их знание помогает выработать стратегию технологического процесса очистки стоков, а также предварительно оценить возможные концентрационные пределы утилизируемых соединений. В связи с этим, нами изучался молекулярный механизм взаимодействия АО с НСНО, а также со смесью НСНО и метанола. Дело в том, что в промышленности (например, при синтезе формальдегидных смол) формальдегиду сопутствует метанол, изначально добавляемый для предотвращения полимеризации НСОН. Внося смесь формальдегида и метанола, мы моделировали конкретную ситуацию одновременного присутствия обоих компонентов в среде инкубации. Полученные результаты затем сравнивались с данными по индивидуальному окислению субстратов.

График зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации НСНО, в отсутствие метанола, подчиняется классической кинетике Михаэлиса-Ментен до концентрации формальдегида в растворе 10 мМ (оптимальное насыщение). Выше этого значения наблюдали резкое падение скорости окисления - субстратное ингибирование. Кажущаяся K_m равнялась при этом 0.03 М. Фиксируемое снижение скорости окисления можно объяснить высокой реакционной способностью карбонильной группы формальдегида, которая при превышении определенной концентрации субстрата может модифицировать акцепторные центры белка с образованием непродуктивных комплексов.

Так как при концентрации НСНО 10 мМ торможения ферментативной активности не наблюдалось, логично было предположить, что смесь формальдегида и метанола, в условиях переменной концентрации метанола и фиксированной формальдегида, также не будет блокировать скорость реакции. Как видно из рис. 3, при низких концентрациях метанола (в области 0.5 мМ) наличие в системе формальдегида несколько увеличивало общую начальную скорость (кривая 2), свидетельствуя об одновременном окислении субстратов в активном центре фермента. Однако с повышением концентрации метанола, по отношению к которому АО имеет более высокое сродство, скорость ферментативного процесса снижалась. Этот факт указывает на замещение метанолом формальдегида в активном центре АО и взаимодействие последнего с другим, ингибиторным центром глобулы. Регистрируемые при этом нетипичные и сложные для анализа формы кинетических кривых (рис. 3) вызваны способностью НСНО к многоточечному связыванию с amino- и SH-группами АО как в области активного, так и пространственно удаленного ингибиторного центра, с образованием непрочных соединений Шиффа [18]. Сложная комбинация взаимодействий белок-субстрат будет

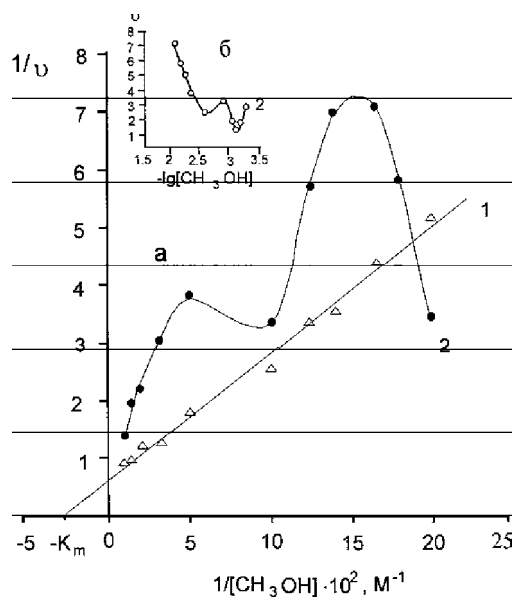


Рис. 3. Зависимость скорости АО реакции от концентрации метанола в двойных обратных координатах в отсутствие (1) и при внесении (2) 10 мМ формальдегида (а). (б) - кривая 2 в полулогарифмических координатах

вести к последовательным конформационным перестройкам молекулы фермента, волнообразному характеру кинетических зависимостей.

Таким образом, несмотря на то, что НСНО является субстратом АО, его присутствие тормозит процесс окисления метанола. Отсюда понятно наблюдаемое отравление дрожжей не только формальдегидом («эффект формальдегидного отравления»), но и метанолом при концентрации более 0.5% [3]. Становится ясным, почему при микробиологической очистке сточных вод от метанола и формальдегида неэффективно использование одного штамма метилотрофных дрожжей и специалисты вынуждены пользоваться или консорциумом микроорганизмов, или вводить дополнительную культуру, способную утилизировать поллотанты в более высоких концентрациях, чем на это способны метилотрофные дрожжи.

Стабильность

Очищенный фермент характеризовался неустойчивостью при хранении в водных растворах. При 10°C он терял до половины исходной активности уже в первые несколько суток. Гораздо стабильнее белок высоленный сульфатом аммония. Поскольку АО, как и большинство оксидаз, перспективна для использования в качестве тест-системы в аналитических целях при количественном определении спиртов или в составе ферментных электродов в биосенсорах, задача поиска способов стабилизации актуальна.

Ранее было показано, что внесение азид натрия (NaN_3) к ферменту из *Candida boidinii* S 2 вызывало подав-

ление ферментной активности. Ингибирование носило конкурентный по отношению к метанолу характер с $K_i = 0.015$ мМ [23]. Нами обнаружено, что азид натрия, добавленный в раствор белка в процессе высаливания сульфатом аммония, может быть эффективным стабилизатором АО, а в случае хранения ее в высоленном состоянии даже активатором фермента. Присутствие NaN_3 в растворе приводит к сдвигу второго пика поглощения АО в более длинноволновую область – 490 нм (рис. 2, кривая 4). При этом желтая окраска, обусловленная наличием ФАД, переходит в красную, однозначно свидетельствуя о взаимодействии модификатора с коферментом. Интересно отметить, что со свободным ФАД лиганд не реагирует. Это указывает, что по крайней мере одна из точек взаимодействия локализована в области контакта кофермента с апоферментом, т.е. в районе каталитического центра. Причем реакция носит обратимый характер: гель-фильтрация преинкубированного с азидом натрия белка через колонку с сефадексом G-50 возвращает исходный цвет и форму спектра.

На рис. 4 приведены результаты хранения высоленной сульфатом аммония АО при 16° и 30°C, из которых видно, что в первом случае в течение месяца без NaN_3 активность АО падала с 7.2 до 0.5 мкмоль · мин⁻¹ · мг⁻¹. Добавка стабилизирующего агента вела к снижению активности всего на 15%. При 30°C присутствие азидов позволяло сохранять к тридцатым суткам до 75% начальной активности АО. Сходный активационный эффект, наблюдаемый в наших экспериментах при 30°C, отмечался в работе [1] при часовой инкубации АО из *Hansenula polymorpha* в тех же условиях.

Внесение NaN_3 в раствор АО меняло ее кинетические характеристики: классическая михаэлисовская зависимость скорости окисления метанола или этанола свойственная нативному ферменту становилась S-образной (рис. 5а, кривые 1,3). Одновременно это сопровождалось 2-х кратным увеличением ферментативной активности. Коэффициент кооперативности, рассчитанный по методу Хилла и позволяющий оценить число центров свя-

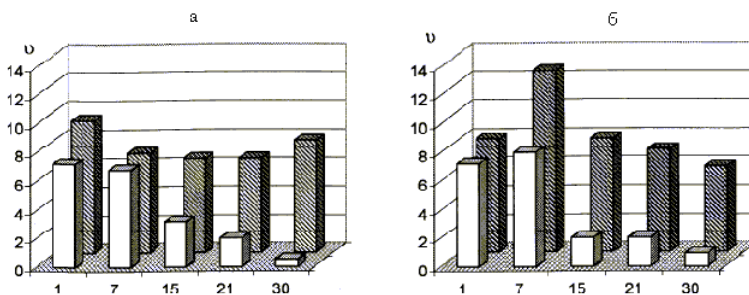


Рис. 5. Зависимость удельной активности (%) нативной (светлые столбики) и модифицированной азидом натрия (заштрихованные) АО от времени хранения (сутки) при 16° (а) и 30°С (б). Фермент после высаливания сульфатом аммония

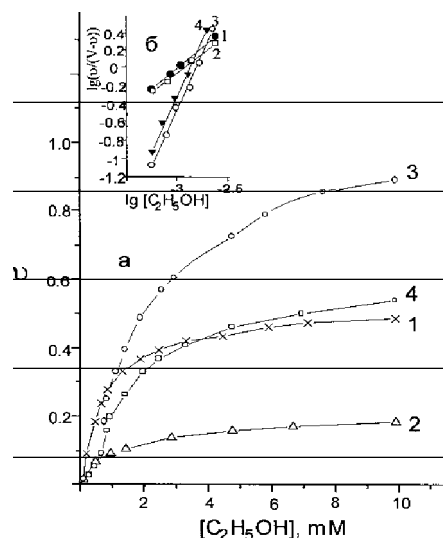


Рис. 5. Зависимость скорости АО реакции от концентрации этанола: 1 - нативный фермент; 3 - содержащий азид натрия; 2 и 4 - соответственно после 7 дней хранения

зывания, становился при этом равным 2.9 (рис. 5б). Полученная величина η_n указывает на то, что помимо участка связывания NaN_3 в области каталитического центра, АО имеет на своей поверхности и аллостерические участки, связывание с которыми путем оптимизации структуры белка приводит к ускорению окисления субстратов. Вновь возникающая пространственная конфигурация является более стабильной. Так, если в течение недели АО в отсутствие NaN_3 теряла 60% своей активности (рис. 5а, кривая 2), то в присутствии лиганда активность с максимального значения снижалась до начального уровня (кривая 4), сохраняя исходные величины коэффициента Хилла.

Методами гигантского комбинационного рассеяния [24] и флуоресценции [6] нами показано, что азид натрия способствует перераспределению электронной плотности на молекуле ФАД в области связывания его с апоферментом. Данный эффект сопровождается увеличением степени поляризации триптофановой флуоресценции АО, что, в свою очередь, приводит к возрастанию жесткости связи кофермент-апофермент. Возможно, именно этот феномен ответственен за увеличение стабильности белковой глобулы. Это подтверждают и наши последние опыты по денатурации белка в 6 М мочеvine, когда в результате диссоциации кофермента наблюдалось резкое увеличение флуоресценции надбелковой жидкости. Для АО, предварительно обработанной азидом натрия, степень флуоресценции была в 4 раза ниже.

Литература

1. Баев М.В., Капульевич Ю.Г. «Формальдегидное отравление» метилотрофных дрожжей // Микробиология. – 1987. – Т. 56, № 4. – С. 570 – 577.
2. Гааль Э., Медьеша Г., Верецки Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – М.: Мир, 1982. – 446 с.
3. Гончар М.В., Сибирный А.А. О природе индуцируемого метанолом закисления среды продуктами метаболизма метилотроф-

- ных дрожжей // Укр. биохим. журн. – 1988. – Т. 60, № 1. – С. 97 – 100.
4. Диксон М., Узбб Э. Ферменты: В 3 т. – М.: Мир, 1982. – 1120 с.
5. Курганов Б.И. Аллостерические ферменты. – М.: Наука, 1978. – 248 с.
6. Маскевич А.А., Арцукевич И.М., Маскевич С.А., Черникевич И.П. Флуоресценция алкогольоксидазы из метилотрофных дрожжей // Биоорганическая химия. – 1997. – Т. 23, № 6. С. 479 – 485.
7. Подгорский В.С. Физиология и метаболизм метанол усваивающих дрожжей. – Киев.: Наукова думка, 1982. – С. 38.
8. Потапович М.В., Еремин А.Н., Арцукевич И.М., Черникевич И.П., Метелица Д.И. Выделение, очистка и характеристика каталазы метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 6. – С. 797 – 810.
9. Розанов А.Я. Ферментная технология. – Одесса.: Эрудит, 1996. – 296 с.
10. Сибирный А.А., Убийвовка В.Г., Кшелинская Г.М. Пероксидазное окисление метанола АО метилотрофных дрожжей // Биохимия. – 1988. – Т. 53, № 6. – С. 936 – 945.
11. Симискер Я., Хейнару Э., Ныгес Т. Аэробная биодеградация НСОН // Ученые записки Тартуского ГУ. – 1982. – Вып. 624. – С. 21 – 35.
12. Троценко Ю.А. Метилотрофные эукариоты // Успехи микробиологии. – 1983. – Т. 18. – С. 18 – 38.
13. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. – М.: Мир, 1988. – 568 с.
14. Anthony C., Zatman L. Energy metabolism of aerobic, methylotrophic bacteria // Biochem. Y. – 1964. – Vol. 92, N 3. – P. 614 – 621.
15. De Hoop M.J., Gregg J.M. Overexpression of alcohol oxidase in *Pichia pastoris* // Lab. Biochem. – 1991. – Vol. 291, N 2. – P. 299 – 302.
16. Giuseppin M, Eijk H., Verduyn C., Bante J., Dijken J. Production of catalase-free alcohol oxidase by *Hansenula polymorpha* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1988. – Vol. 28, N 1. – P. 14 – 19.
17. Guillen F., Martinez A., Martinez M. Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1990. – Vol. 32, N 4. – P. 465 – 469.
18. Hopkins T.R., Muller F. Biochemistry of alcohol oxidase // Proceedings of the 5-th Int. Compounds. – 1987. – Netherlands. – P. 150 – 158.
19. Kato N., Omori Y., Tani Y., Ogata K. Alcohol oxidases of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha*. Catalytic properties and subunit structures // Eur. J. Biochem. – 1976. – Vol. 64, N 2. – P. 341 – 350.
20. Kierstan M. The enzymatic conversion of ethanol to acetaldehyde as model system // Biotechnol. Bioengin. – 1982. – Vol. 24. – P. 2275 – 2277.
21. Kulys J., Schmid K. Bionzyme sensors based on chemically modified electrodes // Biosensors-bioelectron. – 1991. – Vol. 6, N 1. – P. 43 – 48.
22. Mizuno S., Imada Y. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes // Biotechnol. Letters. – 1986. – Vol. 8, N 24. – P. 79 – 84.
23. Sakai Y., Tani Y. Formaldehyde production by cells of a mutant of *Candida boidinii* S2 grown in methanol-limited chemostat culture // Agric. Biol. Chem. – 1980. – Vol. 50, N 10. – P. 2615 – 2620.
24. Strechal N., Maskevich S., Artsukevich I., Kivach L., Chernikevich I. Study of structure and functional states of Alcohol oxidase by surface-enhanced Raman spectroscopy // Laser Application in Life Science. – 1994. – Vol. 2370. – P. 190 – 194.

Resume

ALCOHOL OXIDASE OF METHYLOTROPHIC YEAST: PURIFICATION, STABILIZATION AND PROPERTIES

I.M. Artsukevich, I.P. Chernikevich, A.A. Maskevich

A method for purification of catalase-free alcohol oxidase from various species of methylotrophic yeast was developed. It was established that formaldehyde had at least 2 binding sites in *Pichia pastoris*: the first in the active site with the apparent K of 3mM, where HCOH was a substrate. The second site possesses lower affinity. Sodium azide was an activator of alcohol oxidase enzyme activity. It simultaneously exerted a stabilizing effect. This ligand prevents the flavin adenine dinucleotide dissociation from the protein complex.