

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА

*На правах рукопису*

**ПРЕОБРАЖЕНСЬКА**  
**Олена Миколаївна**

**ОТРИМАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ І ЗАСТОСУВАННЯ**  
**ІММОБІЛІЗОВАНОЇ РИБОФЛАВІНКІНАЗИ ДРІЗДІВ**

03.00.04 - біохімія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1994



00778653 (-)

Робота виконана у відділі регуляції клітинного синтезу нивь-  
комолекулярних сполук і у відділі біохімічної генетики Відділення  
регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна  
АН України

**Науковий керівник** - кандидат біологічних наук **Кашніко В.Е.**

**Офіційні опоненти:** - доктор біологічних наук, професор  
**Кудінов С.А.**  
- кандидат біологічних наук **Закальської А.Є.**

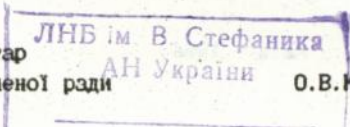
**Провідна установа** - Інститут мікробіології і вірусології  
ім.Д.К.Заболотного АН України (м.Київ)

Захист дисертації відбудеться "30" травня 1994 р. о  
"14" год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.016.07.01  
при Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна АН України за адресою:  
252030, м.Київ-30, вул.Леонтовича, 9

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інститута  
біохімії ім. О.В.Палладіна АН України

Автореферат розісланий "29" квітня 1994 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради



О.В.Кірсенко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

*Актуальність проблеми.* Останнім часом все більшого значення набуває розробка ферментативних способів синтезу складних за структурою органічних сполук. Ферментативний синтез, на відміну від методів хімічного синтезу, характеризується строгою специфічністю дії біологічних каталізаторів.

Важливе значення має розробка ферментативних способів синтезу флавінових нуклеотидів, а саме FMN. FMN (рибофлавін-5'-фосфат) - коферментна форма вітаміну B<sub>2</sub>, входить до складу ряду окисно-відновних ферментів клітини - флавопротеїнів. Як ефективний засіб метаболічної терапії FMN застосовують для лікування та профілактики захворювань в дерматології, офтальмології, гастроентерології. FMN є вихідною речовиною для синтезу FAD, використовується як реактив у наукових дослідженнях.

До цього часу препарати FMN одержують хімічним синтезом. Але, як стало нещодавно відомо, такі препарати містять до 60% ізомерних домішок, які за хімічною структурою відрізняються від рибофлавін-5'-фосфату, а їх біологічна активність практично не вивчена [Entsch et al., 1983; Nielsen et al., 1983]. Найкращі препарати провідних світових фірм при високій вартості містять від 25 до 40% ізомерних домішок. Мікробіологічне виробництво FMN на даний час відсутнє, оскільки мікроорганізми, що здатні нагромаджувати цей нуклеотид у культурах, не описані.

В клітині синтез FMN здійснюється за допомогою ферменту АТР: рибофлавін-5'-фосфотрансферази (рибофлавінкінази), який фосфорилує рибофлавін (РФ) строго по 5'-положенню бічного рибітильного ланцюга з утворенням РФ-5'-фосфату. У зв'язку з цим доцільно використання цього ферменту для розробки методу синтезу препаратів FMN високого ступеню чистоти, які б не містили ізомерних домішок.

*Мета та завдання дослідження.* Головною метою роботи було дослідити можливість використання РФ-кінази з мікроорганізмів у процесах ферментативного синтезу препаратів FMN. Для досягнення поставленої мети у роботі ставилися такі основні завдання:

1. пошук продуцентів ферменту серед мікроорганізмів;
2. розробка методів виділення і очищення ферменту;
3. отримання іммобілізованих препаратів РФ-кінази і дослідження їх властивостей;
4. розробка ферментативного методу синтезу FMN за допомогою отриманих препаратів РФ-кінази.

*Наукова новизна роботи.* В роботі розроблено два нових високочутливих метода визначення активності РФ-кінази. Досліджено активність РФ-кінази у 31 штаму мікроорганізмів різних систематичних груп. Найвищий рівень ферментативної активності виявлено у парафін- та метанолутилізуючих дріжджів - *Pichia guilliermondii*, *Candida maltosa* і *Hansenula polymorpha*. У цих дріжджів виявлено явище індукції синтезу РФ-кінази при вирощуванні на парафінах або метанолі. Серед мутантів *H. polymorpha* з конститутивним синтезом FAD-залежної алкогольоксидази знайдено суперпродуцент ферменту *H. polymorpha* ВКПМ У-926.

Розроблено процедури очистки РФ-кінази з дріжджів-продуцентів цього ферменту і детально досліджено її властивості.

Отримано іммобілізовані препарати дріжджової РФ-кінази включенням в структуру поліакриламідного гелю, ковалентним приєднанням до похідних агарози, поліакриламідну і сілохромів. Проведено порівняльне дослідження властивостей розчинної та іммобілізованої РФ-кінази. Встановлено, що іммобілізація ферменту суттєво не впливає на каталітичні характеристики, але значно стабілізує РФ-кіназу.

Розроблено методи синтезу FMN та його аналогів в реакторах періодичного та безперервного типу дії на основі розчинної та іммобілізованої РФ-кінази. Отримані таким способом препарати FMN практично не містять домішок і є виключно РФ-5'-фосфатом.

Метод визначення активності РФ-кінази та метод синтезу FMN і його аналогів захищені авторськими свідоцтвами.

*Науково-практичне значення роботи.* Дослідження ферментів, що синтезують флавінові нуклеотиди є важливе з точки зору фундаментальної науки, оскільки закономірності біосинтезу FMN і FAD у мікроорганізмів до цього часу вивчені недостатньо. Розробка методів іммобілізації РФ-кінази, отримання нерозчинних препаратів ферменту та дослідження їх властивостей вносять вагомий внесок в таку область біологічної науки, як інженерна ензимологія.

Дослідження процесів ферментативного синтезу FMN, проведене в роботі, може бути використане при масштабуванні і впровадженні в промисловість ферментативного методу синтезу коферментних форм вітаміну В<sub>2</sub>. Такий спосіб має суттєві переваги перед хімічним синтезом, оскільки дає можливість проводити трансформацію РФ зі 100% виходом FMN і отримувати препарати, які не містять ізомерних домішок з невизначеною біологічною активністю.

*Апробація роботи та публікації.* Матеріали дисертації доповідались і обговорювались на симпозиумі "Біохімія, фармакологія и медицинское применение производных витаминов

и других предшественников коферментов" (Иркутск, 1983), V Всесоюзному биохимическому з'їзду (Москва, 1986), III Всесоюзній конференції "Биосинтез ферментов микроорганизмами" (Пушино, 1986), V Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1987), IV Всесоюзній конференції "Биосинтез ферментов микроорганизмами" (Ташкент, 1988), VI з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Київ, 1989), Всесоюзній конференції "Проблеми мікробного синтеза вітамінів и их производных" (Ташкент, 1990), Всесоюзній конференції "Методи получения, анализа и применения ферментов" (Рига, 1990), Всесоюзній школі-семінарі "Био-термо-хемилюминесценция" (Москва, 1990), 15 Міжнародному симпозиумі по дріжджах (Рига, 1991), 7 Всесоюзному симпозиумі "Инженерная энзимология" (Москва, 1991), Всесоюзній конференції "Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу" (Чернівці, 1991), VI з'їзді Українського товариства генетиків і селекціонерів (Київ, 1992), 16 Міжнародній конференції по генетиці і молекулярній біології дріжджів (Відень, 1992), 7 Міжнародному симпозиумі по С<sub>1</sub> сполукам (Варвік, 1992), 7 Європейському конгресі по біотехнології (Флоренція, 1993).

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 2 статті та 18 тез доповідей, отримано 2 авторських свідоцтва.

*Структура та об'єм роботи.* Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, викладення результатів досліджень та їх обговорення, висновків і списку літератури (225 першоджерел). Робота викладена на 161 сторінці друкованого тексту, ілюстрована 42 малюнками і 17 таблицями.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В роботі використовували дріжджі: *Saccharomyces cerevisiae* раса XII, парафінутилізуючі дріжджі *Pichia guilliermondii* ATCC 9058 і мутант цього виду ВКПМ У-432 з дерепресованою РФ-пермеазою, промислові штами *Candida maltosa* 774, 777 і 899; штами метанолутилізуючих дріжджів *Candida boidii* іі T2A, ВСБ 719, *Pichia pinus* 1031, МН4 і *Hansenula polymorpha* 42a, а також МЛ3, МЛ8, МЛ9, ВКПМ У-201 (НДІ Генетика, м. Москва).

-бактерії: *Escherichia coli* K-12, *Bacillus licheniformis* 28KA, *Bacillus subtilis* ВКМ В-428 і Shgw, а також аукоотрофи по РФ ВКПМ В-5101 і D-107 (НДІ Генетика і кафедра мікробіології Львівського держуніверситету).

-міцеліальний гриб *Eremothecium ashbyii* 1906 (НДІ Генетика).

Мікроорганізми культивували на відповідних середовищах [Burkholder, 1943; Spizizen, 1958; Yagi, 1956].

Безклітинні екстракти отримували балістичним методом руйнування або екстракцією ацетонових порошоків клітин.

Активність РФ-кінази визначали за методом Кашенко і ін. [1976]. Визначення активності РФ-кінази у відношенні відновленого РФ проводили за модифікованим методом [Keagney et al., 1979].

Активність FAD-синтетази визначали за методом Schrecker і Kornberg [1950], активність лужної фосфатази - за модифікованим методом Струговшикової і ін. [1973], використовуючи в якості субстрату FMN.

Фракціонування безклітинних екстрактів сульфатом амонію і органічними розчинниками здійснювали за загальноприйнятими методиками [Скоупс, 1985].

Гель-хроматографію безклітинних екстрактів і препаратів РФкінази проводили на сефадексах G-75, G-100 і G-150, молселекті G-75; іонообмінну хроматографію - на КМ- і ДЕАЕ-целюлозах.

Для іммобілізації РФ-кінази включенням у поліакриламідний гель (ПААГ) використовували розчини з концентрацією акриламід у 20-40% і відносною концентрацією N,N'-метилен-бісакриламід у 2-4%.

Підготовку і активацію носіїв для іммобілізації РФ-кінази здійснювали за загальноприйнятими методиками [Вудворд, 1988; Березин и др., 1976; Туркова, 1980]. Аміногексилагарозу, акрилекси P-150 і П-200 активували 25%, а амінопропілсилохром - 12,5% глутаровим альдегідом. Акрилекси А-100, АНС<sub>4</sub> і С-100 обробляли спиртовим розчином дициклогексилкарбодіміду (0,5 мг/мл), акрилекс АН-100 - охолодженим 2%-ним розчином NaNO<sub>2</sub>. Бензохінонсилохром і епоксисилохром використовували без додаткової активації. В якості основного буфера при іммобілізації РФ-кінази на активованих бромціаном агарозі та сефарозі, акрилексах А-100, АНС<sub>4</sub>, С-100 і АН-100 використовували 10 mM фосфатний буфер, рН 8,0, на всіх інших носіях - 10 mM фосфатний буфер, рН 7,0.

Іммобілізацію фермента на активованих бромціаном агарозі та сефарозі проводили карбамідним методом; на аміногексилагарозі, акрилексах P-150, П-200, А-100, АНС<sub>4</sub> і С-100 і амінопропілсилохроми - амідним методом; на акрилексі АН-100 - азидним методом.

Концентрацію білку в препаратах визначали за методом Lowry і ін. [1951].

Константи Міхаеліса ( $K_m$ ) РФ-кінази для субстратів реакції визначали графічно за методом Lineweaver і Berk [1934]. Енергію активації реакції фосфорилування РФ визначали за тангенсом кута нахилу прямої на графіку залежності швидкості синтезу FMN від

температури в координатах Арреніуса [Диксон і Уэбб, 1982]. Константу швидкості процесу інактивації, операційну стабільність ферменту в процесі роботи реакторів безперервної дії, а також півперіод збереження активності розраховували за методами, описаними раніше [Варфоломеев і Березин, 1976].

Ефективність процесу іммобілізації оцінювали за виходом ферментативної активності, який виражали як процентне відношення активного ферменту, що зв'язався з носієм, до всієї кількості ферменту в препараті взятому для іммобілізації.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 1. Розробка нових методів визначення активності РФ-кінази.

Існуючі методи визначення РФ-кінази базуються на розділенні субстрату РФ-кіназної реакції - РФ і продукту - FMN за допомогою різних видів хроматографії [Кашенко и др., 1976; Brook et al., 1986; Eggeling et al., 1977; McCormick et al., 1962; Zak et al., 1982], є трудомісткими і багатоканальними.

Розробляли нові, прості у виконанні і високочутливі методи визначення активності ферменту. Перший метод базується на усуненні непрореагованого РФ із реакційної суміші за допомогою його транспорту в клітини мутантного штаму *P. guilliermondii* ВКПМ У-432. Процес здійснює РФ-пермеаза специфічна до РФ, але не до FMN [Сибирный и др., 1977]. Після поглинання РФ активність РФ-кінази можна вимірювати по кількості утвореного FMN прямою флуориметрією проби.

Визначено оптимальні умови для повного усунення РФ із реакційних сумішей (рис.1). Клітини в концентрації 10 мг/мл поглинали із реакційних сумішей практично весь РФ за 1,5 год інкубації.

Метод здійснювали по схемі: досліджувані аліквоти ферментного препарату змішували з реакційною сумішшю, яка містила РФ у концентрації 30  $\mu$ M, АТФ - 0,3 mM, MgSO<sub>4</sub> - 1 mM і 25 mM фосфатний буфер, рН 8,0, і інкубували при 37°C. Для зупинки реакції проби прогрівали на киплячій водяній бані протягом 4 хв. До охолоджених проб додавали суспензію дріжджових клітин в 0,5 M KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> із розрахунку 10 мг на 1 мл проби, після чого проводили інкубацію з перемішуванням 90 хв при 30°C. Осад усували центрифугуванням. В отриманому супернатанті визначали концентрацію FMN флуориметричним методом. Як видно з рис.2 інтенсивність флуоресценції досліджуваного препарату ферменту з *P. guilliermondii* зростає лінійно залежно від вмісту РФ-кінази в пробі в діапазоні від 40 до 240  $\mu$ Е/пробу.

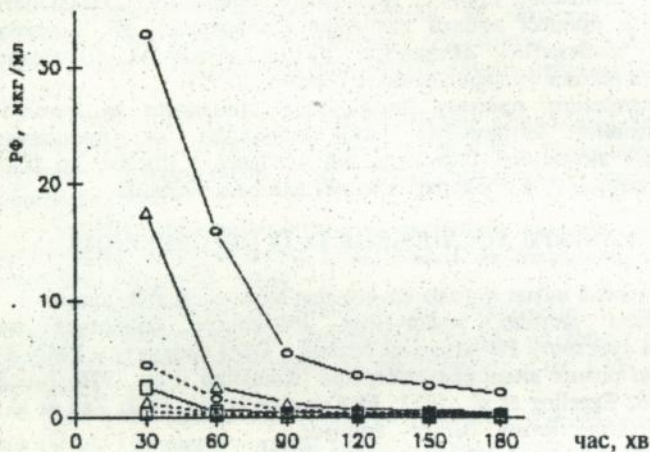


Рис.1. Залежність концентрації залишкового РФ в реакційній суміші від часу інкубації різних концентрацій клітин *P. guilliermondii* ВКПМ Y-432 з реакційною сумішшю. Вихідна концентрація РФ в реакційній суміші 0,1 mM (—) і 30 μM (- - -); концентрація клітин 3 мг/мл (○), 5 мг/мл (△) і 10 мг/мл (□).

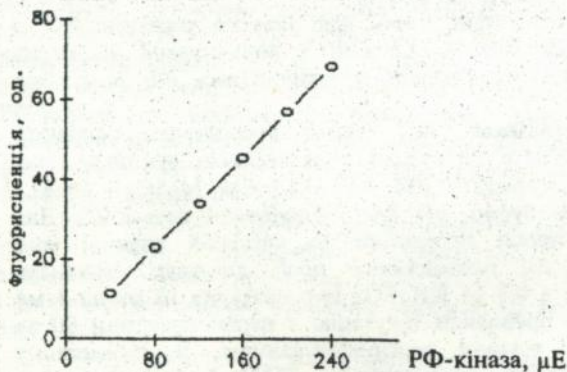


Рис.2. Залежність флуорисценції реакційної суміші після вилучення РФ клітинами *P. guilliermondii* ВКПМ Y-432 від активності РФ-кінази в пробі.

Другий метод - біоломінесцентний, ґрунтується на використанні ферментативної системи із світних бактерій люциферази/FMN-редуктази, в якій продукт РФ-кінасної реакції - FMN здійснює функції кофактора [Hastings et al., 1985]. При використанні набору реактивів для біоломінесцентного аналізу "КРАБ" (сектор біотехнології Інституту біофізики СВ АН Росії) і біоломінометра БЛМ-7801 (СКТБ "Наука", СВ АН Росії) метод здійснювали наступним чином: в кювету люмінометра вносили 50 мкл 0,01% розчину міристинового альдегіду, 20 мкл 1 mM розчину NADH, 40 мкл суміші "КРАБ", 370 мкл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,0 і 20 мкл досліджуваної проби. На рис.3, А представлено калібрувальний графік залежності інтенсивності біоломінесценції від активності РФ-кінази для препарату фермента із *H. polymorpha*.

З використанням біоломінесцентної реєстрації кількості утвореного FMN вперше для РФ-кінази розроблено метод безперервного контролю активності. У цьому випадку в термостатовану при 37°C кювету люмінометра вносили всі необхідні для біоломінометричного аналізу компоненти і 50 мкл реакційної суміші для визначення РФ-кінасної активності. Реакцію починали внесенням 50 мкл досліджуваного ферментного розчину. На рис.3, В представлено залежність біоломінесценції від активності РФ-кінази в пробі.

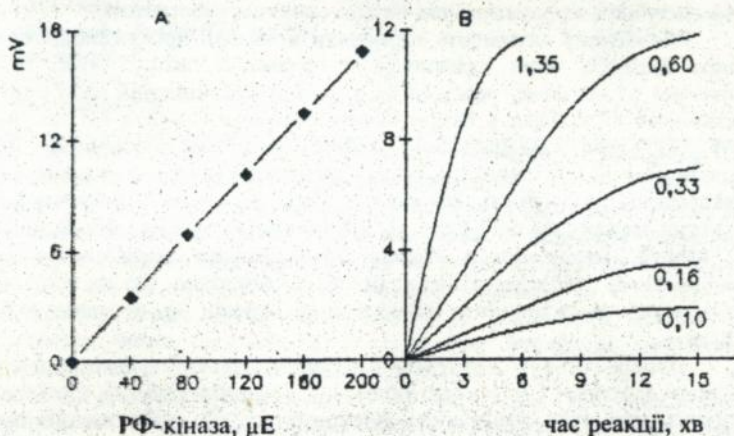


Рис.3. Визначення РФ-кінасної активності біоломінесцентним методом. А - метод з відбором проб; В - безперервний метод, цифрами на графіку показано активність РФ-кінази мЕ/пробу.

Опрацьовані в даній роботі методи визначення активності РФ-кінази дають добре відтворювані результати, характеризуються

високою чутливістю (до 0,01  $\mu\text{E}/\text{пробу}$ ) і можуть використовуватися у широкому діапазоні досліджень ферменту, в тому числі при проведенні кінетичних експериментів, а також для експрес-контролю процесу синтезу FMN у біохімічних реакторах.

## 2. Визначення РФ-кінази активності у деяких мікроорганізмів.

Проведено пошук джерел РФ-кінази серед мікроорганізмів різних систематичних груп (бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів) з використанням біомаси промислових штамів-продуцентів РФ *B. subtilis* і *E. ashbyii*, продуцентів білково-вітамінних концентратів *S. maltosa* і *H. polymorpha*.

Визначення РФ-кінази активності у бактерій *B. subtilis* Shgw, *B. subtilis* ВКПМ В-5101, *B. subtilis* ВКМ В-428, *B. subtilis* D-107 *V. licheniformis* 28 КА і *E. coli* K-12 показало, що активність ферменту у досліджених представників бактерій була низькою і коливалась в межах 9,5-57,1  $\mu\text{E}/\text{мг}$  білку. Ще нижчим рівнем ферментативної активності характеризуються *L. arabinosus* [Snoswell, 1957] *E. coli* [Katagiri et al., 1959] і *B. ammoniagenes* [Manstein et al., 1986]. На відміну від дослідженого Kearney і ін. [1979] штама *B. subtilis* H52, який проявляв РФ-кіназу активність тільки по відношенню до відновленого РФ, у двох із п'яти представників роду *Bacillus* (*B. subtilis* ВКПМ В-5101 і *V. licheniformis* 28 КА) виявлено активність ферменту як з окисленим, так і з відновленим субстратом.

РФ-кіназу активність визначали в міцелії дріжджеподібного гриба *E. ashbyii*. При культивуванні штама *E. ashbyii* 1906 НДІ Генетика на багатому середовищі в ранній стаціонарній фазі росту активність РФ-кінази в безклітинних екстрактах сягала 3,8  $\text{mE}/\text{мг}$ . Але культура відзначалась генетичною нестабільністю по флавіногенній активності і рівню ферментів синтезу флавінових нуклеотидів. Активність РФ-кінази в міцелії може змінюватися в значних межах (від 65  $\mu\text{E}/\text{мг}$  до 3,8  $\text{mE}/\text{мг}$ ). Дослідження біомаси *E. ashbyii*, вирощеної в умовах промислового виробництва на Біохімічному заводі (м. Пінськ, Білорусь) показало, що при такому культивуванні активність РФ-кінази в міцелії не перевищує 60  $\mu\text{E}/\text{мг}$ .

Перспективним джерелом для виділення рибофлавінкінази є біомаса парафін- і метанолутилізуєчих дріжджів (табл.1). Оскільки існують дані про стимуляцію флавіногенезу *P. guilliermondii* при вирощуванні на парафінах нафти [Nishio, 1970; Диканская, 1972], було досліджено вплив цього джерела вуглецю на активність РФ-кінази в безклітинних екстрактах парафінутилізуючих дріжджів. В результаті проведених експериментів у парафінутилізуючих дріжджів *P. guilliermondii* і *S. maltosa* виявлено явище зростання РФ-кінази активності в 1,3-1,5 рази при культивуванні клітин на

парафінах, порівнянно з рівнем ферментативної активності в клітинах, які виростили на цукрах.

Табл. 1. Активність РФ-кінази в безклітинних екстрактах деяких видів дріжджів при вирощуванні на різних джерелах вуглецю.

Вид дріжджів	Питома активність фермента (μЕ/мг)		
	Глюкоза	Парафіни	Метанол
<i>S. cerevisiae</i> раса XII	17,0		
<i>P. guilliermondii</i> ATCC 9058	122,1	155,3	
<i>P. guilliermondii</i> ВКПМ У-432	147,5		
<i>C. maltosa</i> 774	176,3	231,4	
<i>C. maltosa</i> 777	175,1	263,0	
<i>C. maltosa</i> 899	252,2	324,6	
<i>C. boidinii</i> T2A	78,0		180,2
<i>C. boidinii</i> ВСБ 719	81,1		161,4
<i>P. pinus</i> 1031	242,0		417,3
<i>P. pinus</i> МН4	300,4		453,2
<i>H. polymorpha</i> МL3	64,8		320,0
<i>H. polymorpha</i> МL8	116,4		371,6
<i>H. polymorpha</i> МL9	104,0		528,2
<i>H. polymorpha</i> ВКПМ У-201	128,7		1200,0
<i>H. polymorpha</i> 42a	231,9		285,0
<i>H. polymorpha</i> 2g (ВКПМ У-926)	192,3		3200,0
<i>H. polymorpha</i> 5g	380,4		663,9
<i>H. polymorpha</i> 7g	174,0		823,6
<i>H. polymorpha</i> 11g	240,6		476,9

Значно вища індукція синтезу РФ-кінази виявлена у метилотрофних дріжджів при культивуванні на метанолі як єдиному джерелі вуглецю (табл.1). Деякі автори відмічали суттєву (в 6-8 разів) індукцію синтезу FAD-синтетази і незначну індукцію синтезу РФ-кінази при вирощуванні на метанолі дріжджів *Kloeckera* sp. [Shimizu et al., 1977] і *C. boidinii* [Eggeling et al., 1977]. У досліджених нами промислових штамів *H. polymorpha* активність РФ-кінази може зростати у 9 разів при утилізації метанолу. Оскільки, як в окисленні парафінів [Kemp et al., 1988], так і в окисленні метанолу [Fuyii et al., 1972; Patel et al., 1981] дріжджами приймають участь FAD-залежні алкогольоксидази, при утилізації цих джерел вуглецю зростає потреба клітин у FAD, яка забезпечується збільшенням рівня активності ферментів синтезу флавінових нуклеотидів.

Надпродуценти РФ-кінази знайдено при дослідженні формальдегід-резистентних мутантів *H. polymorpha* з порушеною глюкозною катаболітною репресією синтезу ферментів метаболізму

метанолу [Kashchenko et al., 1992]. У одного з таких штамів (Н. polymorpha 2g) з конститутивним синтезом алкогольоксидази виявлено 17-кратне збільшення рівня РФ-кіназної активності при культивуванні на метанолі у порівнянні з клітинами, які вирощені на глюкозі. За величиною питомої активності РФ-кінази (більш ніж 3 мЕ/мг) Н. polymorpha 2g суттєво перевищує всі відомі джерела ферменту. Штам задепоновано Всеросійською колекцією промислових мікроорганізмів як продуцент рибофлавінкінази Н. polymorpha Y-926.

### 3. Виділення і очищення РФ-кінази з парафін- і метанолутилізуєчих дріжджів.

Досліджували можливість використання простих і оперативних методів очистки ферментів для отримання препаратів РФ-кінази з парафін- і метанолутилізуєчих дріжджів, які були б здатні ефективно трансформувати РФ у FMN. Особливу увагу було звернено на усунення з препаратів РФ-кінази ферментів, які приймають участь у перетворенні субстратів і продуктів РФ-кіназної реакції - лужної фосфатази і FAD-синтетази.

В роботі вперше розроблено процедури очистки для ферменту з *S. maltosa* і *H. polymorpha*. Показано, що РФ-кіназа цих дріжджів осаджується сульфатом амонію в межах насичення 0,4-0,8 чим нагадує фермент із *P. guilliermondii* [Кашенко и др., 1976], *V. ammono-niagenes* [Manstein et al., 1986] і печінки щура [McCormick, 1962].

Виявлено, що РФ-кіназа з *P. guilliermondii* і *H. polymorpha* може бути сконцентрована і очищена у 2-6 разів при осадженні етанолом або ацетоном в концентрації 50-90%, на відміну від ферменту з пивних дріжджів, який осаджувався при концентрації етанолу 18 - 35% [Kearney і England, 1951]. При фракціонуванні білків сульфатом амонію або органічними розчинниками разом зі значної частиною баластних білків усувалося до 95% лужної фосфатази. Крім цього відбувалось концентрування РФ-кінази.

При гелі-фільтрації на сефадексах G-100, G-75 і акрилексі Р-60, завдяки невеликій молекулярній масі (28 кДа) [Кашенко и др., 1976], РФ-кіназа відділяється від значної частини високомолекулярних білків, повністю від фосфатаз, а також низькомолекулярних сполук.

Для одержання більш очищених препаратів РФ-кінази використовували іонообмінну хроматографію. Встановлено, що за спорідненістю до іонообмінників ферменти із *H. polymorpha* і *S. maltosa* значно відрізняються від РФ-кінази з *P. guilliermondii* [Кашенко и др., 1976]. Остання міцно сорбувалася на КМ-сефадексі і не зв'язувалась з ДЕАЕ-сефадексом. РФ-кіназа з *H.*

polymorpha проявляла протилежні властивості - відсутність спорідненості до КМ-целюлози і добру сорбцію на ДЕАЕ-целюлозі, чим нагадувала фермент з печінки щура [McCormick, 1962], *B. ammoniagenes* [Manstein et al., 1986] і соєвих бобів [Mitsuda et al., 1963]. Фермент з парафінутилізуєчих дріжджів *S. maltosa* проявляв спорідненість як до катіоно-, так і до аніонообмінника.

Враховуючи властивості і поведінку РФ-кінази з парафін- і метанолутилізуєчих дріжджів при фракціонуванні на різних сорбентах і хроматографічних носіях, було розроблено 2-3-х етапні процедури виділення і очистки ферменту:

І. Дріжджі *P. guilliermondii* руйнували балістичним методом. Безклітинні екстракти фракціонували сульфатом амонію. Осад, отриманий при насиченні солі 0,4-0,9, розчиняли в 10 мМ фосфатному буфері, рН 6,0 і використовували для гель-хроматографії на сефадексі G-100 і наступної іонообмінної хроматографії на КМ-целюлозі. Після вилучення баластних білків стартовим буфером РФ-кіназу вимивали з колонки за допомогою градієнтного збільшення (0-0,5 М) концентрації NaCl в 10 мМ фосфатному буфері, рН 8,0 (табл. 2).

Табл.2. Очищення РФ-кінази з дріжджів *P. guilliermondii* ATCC 9058.

Етап	Процедура	Об'єм мл	Білок, мг	Активність РФ-кінази		Вихід, %	Очист- ка
				питома, тЕ/мг	загальна Е		
1	безклітинний екстракт	100	1980	0,12	0,244	100	
2	сульфат амонію 0,4-0,9	26	790,4	0,22	0,175	71,7	1,8
3	сефадекс G-100	96	24,2	2,31	0,056	23,0	19,3
4	КМ-целюлоза	21	1,3	29,50	0,039	16,0	245,8

II. Модифіковану процедуру використовували для одержання препаратів ферменту з *H. polymorpha* (табл.3). У цьому випадку безклітинний екстракт дріжджів фракціонували охолодженням етиловим спиртом. Фракцію білків, отриману осадженням при 50-90% концентрації етанолу використовували для гель-хроматографії на сефадексі G-75 і наступної іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі. Колонку промивали 10 мМ тріс-НСІ буфером, рН 8 для вилучення баластних білків і РФ-кіназу вимивали за допомогою градієнтного зростання (0-0,3 М) концентрації NaCl.

Табл.3. Очищення РФ-кінази з дріжджів *H. polymorpha* ВКПМ У-201.

Етап	Процедура	Об'єм, мл	Білок, мг	Активність РФ-кінази		Вихід, %	Очист- ка
				питома, тЕ/мг	загальна Е		
1	безклітинний екстракт	142	2357,0	0,30	0,712	100	
2	етанол 50-90%	20	707,2	0,71	0,498	70	2,4
3	сефадекс G-75	60	168,0	1,62	0,272	38	5,4
4	ДЕАЕ-целюлоза	30	26,7	3,91	0,104	14,6	13,0

III. Спрощену процедуру очистки використовували для одержання препаратів ферменту з *S. maltosa*. Безклітинний екстракт *S. maltosa* одержували екстракцією ацетонових порошоків клітин (40 мг/мл) протягом 40 хв при 0°C. До екстракту додавали сульфат амонію до насичення 0,9. Осад збирали, розчиняли в 10 mM фосфатному буфері, рН 7,0 і вносили в колонку із молселектом G-75. Після гел'єхроматографії відбирали фракції з питомою активністю не менше, ніж 1,7 тЕ/мг.

В результаті розроблених процедур очищення ферменту отримано препарати РФ-кінази з парафін- і метанолутилізуючих дріжджів, які володіють високою питомою активністю (1,6-30 тЕ/мг) і здатні ефективно трансформувати РФ у FMN. За величиною питомої активності отримані препарати ферменту з *P. guilliermondii*, *S. maltosa* і *H. polymorpha* значно перевищують очищені препарати РФ-кінази з інших мікроорганізмів [Katagiri et al., 1959; Manstein et al., 1986; Snoswell 1957]. За вмістом ферменту найбільш очищені препарати в 1,5 раза перевищували гомогенні препарати з *V. ammoniagenes*, які були отримані за допомогою афінної хроматографії [Manstein et al., 1986].

#### 4. Імобілізація дріжджової РФ-кінази на різних носіях.

При застосуванні біологічних каталізаторів для ферментативної трансформації органічних сполук найбільш перспективними є процеси, які здійснюють іммобілізовані ферменти. Імобілізацію дріжджової РФ-кінази проводили за такими методами, як включення в структуру гелю і ковалентне приєднання до носіїв, які широко використовуються для отримання біологічних каталізаторів в промисловості і наукових

дослідженнях [Chibata, 1978; Miyawaki et al., 1982; Уонг и др., 1983; Slegers et al., 1986].

При іммобілізації РФ-кінази включенням в структуру ПААГ використовували препарати ферменту з *H. polygrapha* з питомою активністю 1,6 мЕ/мг білка. Найбільш високий вихід ферментативної активності при іммобілізації сягав 18% і спостерігався при полімеризації ПААГ з концентрацією мономера в суміші 20% та відносною концентрацією зшиваючого агента 4%. Питома активність одержаних іммобілізованих препаратів ферменту складала 0,34 мЕ/мл гелю. При цьому 32% активності РФ-кінази втрачалось при подрібненні гелю і виявлялося в буферному розчині після промивки одержаного іммобілізованого препарату ферменту. Близько 50% ферменту інактивувалося у процесі іммобілізації, що, як виявилось, пов'язано з денатуруючою дією деяких компонентів полімеризаційної суміші.

Найбільш перспективні результати отримано при ковалентному приєднанні ферменту з *P. guilliermondii*, *S. maltosa* і *H. polygrapha* до похідних агарози, акрилексу і сілохрому (табл.4). Активність РФ-кінази в таких препаратах сягала 0,023 Е/г носія, ефективність процесу іммобілізації складала 71,6%, що в 2,4 рази вище, ніж для іммобілізованого на  $\omega$ -аміноалкіл-агарози високоочищеного ферменту з печінки щура [Merrill et al., 1979]. При роботі з такими розповсюдженими в промислових біотехнологічних процесах неорганічними носіями як модифіковані сілохроми вирішальним фактором для одержання оптимальних результатів при іммобілізації РФ-кінази виявився спосіб проведення цієї процедури. За рахунок інтенсифікації процесу активації носіїв і процесу зв'язування ферменту (циклічним прокачуванням розчину РФ-кінази через шар носія) вдалось досягнути 37% виходу активного ферменту при іммобілізації на амінопропілсілохромі.

Висока ефективність процесу ковалентної іммобілізації дріжджової РФ-кінази дає можливість одержати нерозчинні препарати, здатні за короткочасну інкубацію трансформувати весь наявний в реакційній суміші РФ у FMN.

##### 5. Дослідження властивостей іммобілізованої РФ-кінази.

На наступному етапі проводили порівняльне вивчення властивостей розчинної та іммобілізованої на різних носіях РФ-кінази (табл.5).

При іммобілізації фермента з метилотрофних дріжджів *H. polygrapha* в ПААГ практично не змінюються основні кінетичні властивості ферменту, що, цілком можливо, пов'язане зі збереженням молекулою білка своєї нативної конформації при

Табл.4. Імобілізація дріжджової РФ-кінази ковалентним приєднанням до носіїв.

Джерело ферменту	Носій	Функціональна група	Метод зв'язування	Активність іммобілізованої РФ-кінази		Вихід активного ферменту при іммобілізації, %
				мЕ/мг білка	мЕ/г носія	
P. guilliermondii	сефароза 4В	гідроксильна	BrCN	0,130	3,18	47,3
	сефароза 4В	<< -	- << -	3,210	22,50	10,6
	сефароза 4В	<< -	- << -	1,650	11,36	71,6
	агароза	<< -	- << -	1,392	9,70	61,0
	аміногексил-агароза	первинна аміно	глутаровий альдегід	0,528	0,30	18,3
	акрилєкс П-200	амідна	- << -	0,220	15,64	29,5
	акрилєкс Р-150	амідна	- << -	0,156	7,50	14,0
	акрилєкс А-100	первинна аміно	дициклогексил-карбодіімід	2,500	0,45	6,8
	акрилєкс С-100	карбоксільна	- << -	2,500	1,35	20,5
	акрилєкс АНС <sub>4</sub>	карбоксільна	- << -	2,080	1,50	22,7
	акрилєкс АН-100	гідрозид кислоти	NaNO <sub>2</sub>	1,250	0,08	2,1
	амінопропіл-силохром	первинна аміно	глутаровий альдегід	0,025	0,15	4,5
	амінопропіл-силохром	- << -	- << -	0,427	0,90	17,3
	амінопропіл-силохром	- << -	- << -	0,349	3,55	36,6
	епоксисилохром	епоксидна		0,062	0,18	13,0
	C. maltosa	амінопропіл-силохром	первинна аміно	глутаровий альдегід	0,083	3,19
H. polymorpha	сефароза 4В	гідроксильна	BrCN	0,252	3,90	36,7

Табл.5. Властивості розчинної та іммобілізованої дріжджової РФ-кінази

Препарати ферменту (джерело/носії)	Оптимиуми дії		Енергія активації, ккал/моль	K <sub>m</sub> , μM		Стабільність		
	темпера- турний	рН		РФ	АТР	зберігання при 0°C		прогрівання при 80°C
						K <sub>in</sub> , год <sup>-1</sup>	t <sub>1/2</sub> , доби	K <sub>in</sub> , хв <sup>-1</sup>
<i>H. polymorpha</i> нативний фермент	38	8,75	9,16	20	90	2,39 x 10 <sup>-2</sup>	1,2	
<i>H. polymorpha</i> включення в ПААГ	40	9,00	9,58	20	90	6,10 x 10 <sup>-3</sup> 1,67 x 10 <sup>-3</sup>	5,4 17,4	
<i>P. guilliermondii</i> нативний фермент	45	9,15	14,8	12	6,7	1,64 x 10 <sup>-2</sup>	2,0	4,1 x 10 <sup>-1</sup> 0,23 x 10 <sup>-2</sup>
<i>P. guilliermondii</i> сефароза	45	8,75	9,9	83	270	7,9 x 10 <sup>-4</sup>	56,0	2,5 x 10 <sup>-1</sup> 1,0 x 10 <sup>-1</sup>
<i>P. guilliermondii</i> акрилекс П-200	45	9,6	7,8	37	30	0,24 x 10 <sup>-2</sup>	12,0	4,8 x 10 <sup>-1</sup> 2,2 x 10 <sup>-1</sup>
<i>P. guilliermondii</i> амінопропіловий силохром	35-45	7,1 8,2	11,0	20	27	1,64 x 10 <sup>-3</sup> 9,50 x 10 <sup>-4</sup>	17,5	3,3 x 10 <sup>-1</sup> 1,8 x 10 <sup>-1</sup>

зазначеному способі іммобілізації [Тривен 1983; Khare et al., 1988; Tosa et al., 1973].

При вивченні властивостей ковалентно приєднаного до носія ферменту залежно від методу іммобілізації та носія дещо змінюються оптимальні дії і значення енергії активації реакції фосфорилювання РФ. Спорідненість до субстратів реакції знижується, що характерно для більшості ферментів при ковалентному зв'язуванні з носієм [Tosa et al., 1973; Gramper et al., 1979; Sudi et al., 1989], і відмічено для іммобілізованої на агарозі РФ-кінази з печінки щура [Merrill et al., 1979]. Проведений аналіз змін у величинах енергії активації, значеннях  $V_{max}$ , а також залежності  $1/V$  від  $1/S$  для іммобілізованого ферменту (в порівнянні з нативним) дозволяє, згідно теорії впливу дифузійних факторів на каталітичні процеси [Франк-Каменецкий, 1947], говорити про відсутність суттєвих зовнішніх дифузійних обмежень при каталітичній дії іммобілізованої дріжджової РФ-кінази. В цьому плані фермент вигідно відрізняється від іммобілізованого ферменту з печінки щура [Merrill et al., 1979].

З метою вивчення субстратної специфічності іммобілізованої РФ-кінази вивчали можливість фосфорилювання ряду синтетичних аналогів вітаміну B<sub>2</sub>. Одержані результати (табл.6) свідчать про те,

Табл.6. Субстратна специфічність розчинної та іммобілізованої на сефарозі РФ-кінази з *P.guilliermondii* по відношенню до аналогів РФ.

№	Положення замісника			Активність аналога в РФ-кіназній реакції	Значення $K_m$ , $\mu$ M	
	7	8	10		нативна РФ-кіназа	сефароза РФ-кіназа
1	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	D-рибітил	субстрат	12	83
2	Cl	CH <sub>3</sub>	- << -	- << -	33	330
3	CF <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	- << -	- << -	22	-
4	CH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	- << -	- << -	19	83
5	CF <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	- << -	- << -	55	-
6	Cl	CF <sub>3</sub>	- << -	- << -	45	21
7	CF <sub>3</sub>	Cl	- << -	- << -	50	-
8	CF <sub>3</sub>	H	- << -	- << -	42	-
9	CH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	- << -	- << -	66	133
10	Cl	CF <sub>3</sub>	D-галактил	не активний	н.ф.	н.ф.
11	Cl	CF <sub>3</sub>	L-рамнітил	- << -	н.ф.	н.ф.
12	Cl	CF <sub>3</sub>	2'-оксіетил	- << -	н.ф.	н.ф.

н.ф. - фосфорильований продукт не виявляється в реакційній суміші при 5-кратному збільшенні часу інкубації аналога з ферментом.

що іммобілізована РФ-кіназа за субстратною специфічністю не відрізняється від розчинного ферменту і здатна перетворювати у відповідні похідні FMN аналоги РФ з замінами метильних груп у 7 і 8 положеннях ізоалоксазину. При цьому спорідненість іммобілізованого ферменту до аналогів може змінюватися залежно від природи замісника в 7 і 8 положеннях. Таким чином, дріжджова РФ-кіназа при ковалентній іммобілізації зберігає свою субстратну специфічність, що свідчить про відсутність суттєвих конформаційних змін в активному центрі ферменту.

Всі отримані іммобілізовані препарати РФ-кінази набували більшої стійкості до дії високих температур і значної стабільності (табл.5). Найбільш суттєво (в 17-21 раз) фермент стабілізувався при іммобілізації на сефарозі і сілохромі. Через 90 діб зберігання на холоді іммобілізований фермент проявляв 20% вихідної активності, що є важливою передумовою для використання його у довготривалих процесах ферментативної трансформації РФ у FMN.

## 6. Дослідження процесів ферментативного синтезу FMN

Розробляли методи ферментативної трансформації РФ у FMN в реакторах періодичного і безперервного типу дії з розчинною і іммобілізованою РФ-кіназою.

Для оптимізації умов трансформації РФ у FMN в реакторах періодичної дії досліджували концентрації іонів  $Zn^{2+}$  і  $Mg^{2+}$ , які мають найбільший активуючий ефект на процес трансформації РФ у FMN. Активуєчий вплив цих іонів на фермент визначали при концентрації РФ і АТР в реакційній суміші 0,1 мМ і концентраціях активаторів 3  $\mu$ М - 1 мМ. Як видно з наведених даних (рис. 4), як для розчинної, так і для іммобілізованої РФ-кінази максимальний вихід FMN спостерігається при концентрації іонів-активаторів еквімолярній концентрації нуклеотидного субстрату - АТР. Більш високі концентрації активаторів знижували швидкість фосфорилювання РФ. Визначена спорідненість ферменту до цих іонів (нативний:  $Zn^{2+}$  - 13  $\mu$ М,  $Mg^{2+}$  - 12  $\mu$ М; іммобілізований:  $Zn^{2+}$  - 1,9  $\mu$ М,  $Mg^{2+}$  - 3,2  $\mu$ М).

Підібрано параметри (швидкість протікання реакційної суміші через реактор, концентрацію субстратів, активаторів і ферменту) за яких досягається повна трансформація субстрату, або 100% вихід цільового продукту. Для ферменту іммобілізованого на сефарозі при швидкості потоку 2 мл/год/г іммобілізованого препарату, активності 3,2 мЕ/г, концентрації АТР х Mg 0,2 мМ і РФ 0,2 мМ повна трансформація субстрату відбувалась за 61 хв.

При ступіні конверсії субстрату (0,7) і швидкості потоку (4,5 мл/год/г) час безвідмовної роботи реактора безперервного типу дії з іммобілізованим на сефарозі ферментом складав 10 діб

при продуктивності процесу синтезу FMN 2,4 ммоль/г білка за добу.

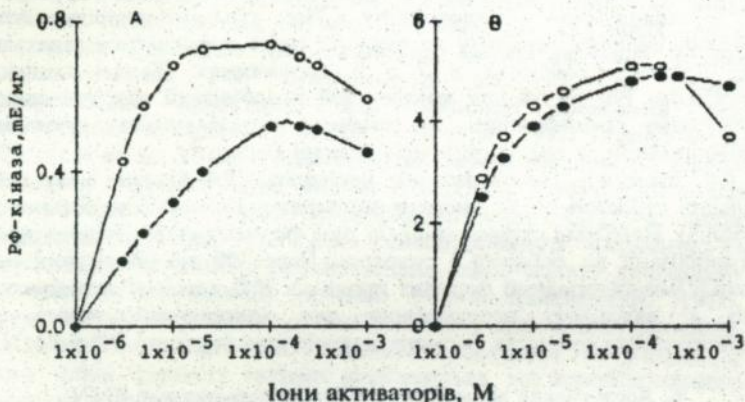


Рис. 4. Залежність швидкості синтезу FMN розчинною (А) і іммобілізованою (В) РФ-кіназою від концентрації іонів  $Zn^{2+}$ (O) і  $Mg^{2+}$ (●).

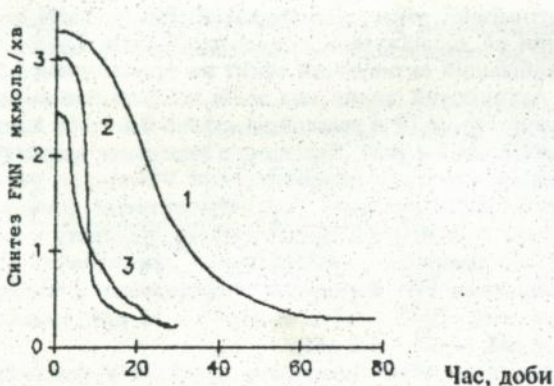


Рис.5. Синтез FMN у реакторі безперервної дії з РФ-кіназою, іммобілізованою на сефарозі (1), акрилексі П-200 (2) і амінопропілсилохромі (3).

Як встановлено в попередніх дослідженнях розчинна і іммобілізована дріжджова РФ-кіназа крім високої специфічності дії (фосфорилювання РФ тільки по 5'-гідроксильній групі) проявляє певну толерантність до замісників у положеннях 7 і 8 гідрофобної частини ізоалюксазинового кільця РФ. Ця властивість ферменту

відкриває можливість ферментативного синтезу аналогів FMN. В реакторі періодичної дії з розчинною РФ-кіназою проведено ферментативну трансформацію ряду аналогів РФ (табл.7).

Табл.7. Вміст аналогів FMN (в мікромолях) в реакторі періодичної дії з РФ-кіназою із дріжджів *P. guilliermondii*

№	Положення замісника		Час після початку інкубації, хв.					
	7	8	30	60	90	120	150	210
1	CH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	11,8	19,9	20,0	20,0	20,0	20,0
2	CF <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	5,6	10,6	15,0	18,4	20,0	20,0
3	CF <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	4,6	8,6	12,0	15,5	17,6	20,0
4	Cl	CF <sub>3</sub>	8,8	15,6	20,0	20,0	20,0	20,0
5	CF <sub>3</sub>	Cl	7,0	12,8	17,4	19,6	20,0	20,0
6	Cl	CH <sub>3</sub>	10,2	17,8	20,0	20,0	20,0	20,0
7	CF <sub>3</sub>	H	5,0	10,0	14,2	18,2	20,0	20,0
8	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	11,4	18,8	20,0	20,0	20,0	20,0
9	CH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5,4	10,4	15,6	18,2	20,0	20,0

Особливо чисті фосфорильовані по 5'-положенню аналоги FMN можуть використовуватися для наукових досліджень, у першу чергу, при вивченні тонких механізмів каталізу, який здійснюють флавопротеїни [Merrill et al., 1981; Ghisla et al., 1986] і при лікуванні деяких захворювань [Trachewsky et al., 1982; Becker et al., 1990; Bhaskar et al., 1990].

Основною характеристикою іммобілізованих ферментів при використанні їх в процесах ензиматичної трансформації є операційна стабільність. Цей параметр визначали в реакторах безперервного типу дії протягом 90 діб (рис.5). Півперіод збереження активності отриманих іммобілізованих препаратів досягав 27 діб ( $k_{in}=2,3 \times 10^{-3}$  і  $5,3 \times 10^{-4}$  год<sup>-1</sup>), що за величиною співрозмірно з операційною стабільністю таких іммобілізованих ферментів, як  $\beta$ -галактозидаза та глюкозоізомераза, які використовуються в промисловості [Wang et al., 1983].

Крім того, виявлено захисний вплив субстратів і активаторів на стабільність розчинного і іммобілізованого ферменту. Процес інактивації розчинного ферменту в присутності субстратів при 37°C відбувався двостадійно з константами  $6,5 \times 10^{-2}$  і  $1,3 \times 10^{-2}$  год<sup>-1</sup>. Інактивація в цих же умовах без субстратів характеризувалась значно вищою швидкістю ( $k_{in}=1,7 \times 10^{-1}$  год<sup>-1</sup>), в 10,5 раз більшою, ніж при зберіганні на холоді. У процесі безперервного синтезу FMN при 37°C іммобілізована РФ-кіназа проявляла у 31 раз більшу стабільність ( $k_{in}=2,3 \times 10^{-3}$  і  $5,3 \times 10^{-4}$  год<sup>-1</sup>), ніж розчинний фермент при зберіганні на холоді.

Проведено аналіз чистоти отриманих препаратів FMN за допомогою методу вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) (рис.6). Як видно, в препараті наявний винятково РФ-5'-фосфат, на відміну від комерційних препаратів провідних закордонних фірм [Nielsen et al.,1983], де в основному піку F містилося біля 70% РФ-5'-фосфату. Компоненти D і E були ідентифіковані як РФ-3'-фосфат і РФ-4'-фосфат. Компоненти А-С виявилися дифосфатами РФ, а компонент G - РФ, вміст якого складає від 4,5% (препарати FMN Sigma Grade II, Boehringer 15405) до 9,6% (препарати Serva 34360).

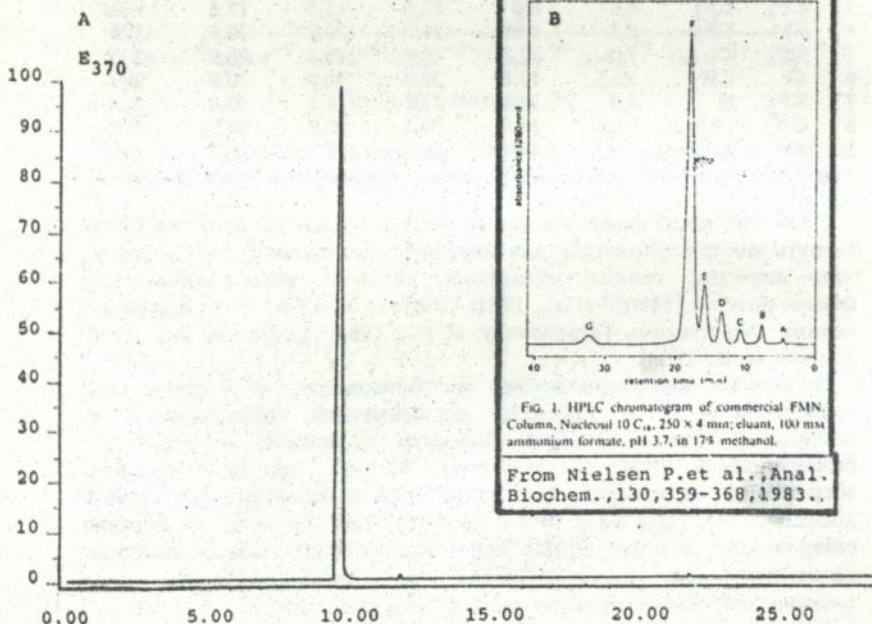


FIG. 1. HPLC chromatogram of commercial FMN. Column, Nucleosil 10 C<sub>18</sub>, 250 x 4 mm; eluant, 100 mM ammonium formate, pH 3.7, in 17% methanol.

From Nielsen P. et al., Anal. Biochem., 130, 359-368, 1983..

Рис.6. ВЕРХ аналіз препаратів FMN, одержаних в результаті ферментативної трансформації РФ (А). В - ВЕРХ аналіз комерційних препаратів FMN [Nielsen et al., 1983].

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено нові оперативні та високочутливі методи визначення активності РФ-кінази: прямий флуорометричний метод на основі усунення непрореагованого РФ клітинами штаму *P. guilliermondii* ВКПМ У-432 та біоломінесцентний метод на основі супряження РФ-кіназої реакції з FMN-редуктазною/люциферазною системою світних бактерій.
2. Проведено пошук джерел РФ-кінази серед мікроорганізмів. Встановлено, що перспективною сировиною для виділення цього ферменту є біомаса парафін- та метанолутилізуючих дріжджів *P. guilliermondii*, *S. maltosa* і *H. polymorpha*, серед яких винайдено суперпродуцент ферменту *H. polymorpha* ВКПМ У-926. У парафін і метанолутилізуючих дріжджів виявлено явище індукції РФ-кінази вуглецевими субстратами: парафінами або метанолом.
3. Розроблено прості та технологічно доступні процедури виділення та очищення РФ-кінази на основі фракціонування білків сульфатом амонію, органічними розчинниками (спиртом, ацетоном), гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії, за допомогою яких отримано високоактивні препарати ферменту придатні для трансформації РФ у FMN.
4. Досліджено можливість іммобілізації отриманих препаратів РФкінази різними методами: включенням в структуру ПААГ, ковалентним приєднанням до носіїв органічної (похідні агарози та ПААГ) і неорганічної (модифіковані силохроми) природи і вперше одержано іммобілізовані препарати РФ-кінази з мікроорганізмів. Найбільш активні препарати (до 0,023 Е/г носія) отримано при іммобілізації ковалентним приєднанням до CNBr-активованої сефарози та гранульованого ПААГ.
5. Досліджено властивості розчинних та іммобілізованих препаратів РФ-кінази. Показано, що такі каталітичні характеристики, як температурний і рН оптимуми дії, субстратна специфічність практично не змінюються при іммобілізації; енергія активації реакції фосфорилування РФ, спорідненість до субстратів і іонів активаторів можуть дещо змінюватися в залежності від джерела ферменту і способу іммобілізації. Нерозчинні препарати ферменту проявляли в 10-21 раз більшу стабільність, ніж розчинні.
6. Розроблено процесі синтезу FMN та аналогів цього коферменту на основі використання розчинної та іммобілізованої РФ-кінази. Проведено оптимізацію умов ферментативної трансформації РФ у реакторах періодичного та безперервного типу дії і встановлено, що оперативна стабільність іммобілізованого

ферменту у довготривалому процесі синтезу FMN сягає 27 діб. Показано можливість використання іммобілізованої дріжджової РФ-кінази для отримання препаратів FMN високого ступеню чистоти.

### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Кашенко В.Е., Преображенская Е.Н., Шавловский Г.М. Получение флавиновых коферментов путем энзиматической трансформации рибофлавина//Биохимия, фармакология и медицинское применение производных витаминов и других предшественников коферментов. Тезисы докл. симпозиума.-Иркутск, 1983.-с.58-59.
2. Кашенко В.Е., Преображенская Е.Н. Получение, свойства и применение иммобилизованной рибофлавинкиназы из дрожжей//Тезисы ст. сообщ. V Всесоюз. биохим. съезда.-М.:Наука,1986.-т.2.-с.153.
3. Шавловский Г.М., Кашенко В.Е., Струговищников Л.П., Преображенская Е.Н. Свойства рибофлавинкиназы и закономерности ее биосинтеза у различных видов дрожжей//Биосинтез ферментов микроорганизмами. Тезисы докл. III Всесоюз. конф.-Пушкино, 1986.-с.49.
4. Преображенська О.М., Кашенко В.Є. Іммобілізація дріжджової рибофлавінкінази на гелях агарози і дослідження властивостей іммобілізованого фермента// V Укр. біохім. з'їзд.Тези докл.-Київ, 1987.-ч.2.-с.170.
5. Кашенко В.Е., Преображенская Е.Н., Федорович Д.В., Погорилко Л.Р., Шавловский Г.М. Очистка, свойства, иммобилизации и применение ферментов, синтезирующих флавиновые нуклеотиды//Биосинтез ферментов микроорганизмами. Тезисы докл. IV Всесоюз. конф.-Ташкент, 1988.- с.83-84.
6. Кашенко В.Е., Преображенская Е.Н., Шавловский Г.М. Получение и свойства иммобилизованной рибофлавинкиназы из дрожжей *Pichia guilliermondii*//Укр. биохим. журн.-1989.-т.61, N 1.-с. 32-36.
7. Кашенко В.Е., Погорилко Л.Р., Преображенская Е.Н. Получение и свойства дрожжевой рибофлавинкиназы, иммобилизованной на гелях полиакриламида//VII съезд Укр. микробиол. об-ва. Тезисы докл.- Киев-Черновцы, 1989.-ч.1.-с.61.
8. Кашенко В.Е., Преображенская Е.Н., Шавловский Г.М. Способ получения флавиномононуклеотида и его аналогов. Авторское свидетельство СССР N 1531494, 1989.
9. Кашенко В.Е., Погорилко Л.Р., Преображенская Е.Н. Обнаружение и свойства термостабильной рибофлавинкиназы - нового фермента синтеза флавиномононуклеотида у дрожжей//Проблемы микробного синтеза витаминов и их производных. Тезисы докл. Всесоюз. конф.-Ташкент, 1990.-с.60-61.
10. Кашенко В.Е., Преображенская Е.Н., Погорилко Л.Р. Получение очищенных и иммобилизованных препаратов рибофлавинкиназы и их использование в процессе ферментативного синтеза

- флавінмононуклеотида//Методи получения, анализа и применения ферментов. Тезисы докл. Всесоюзн. конф.-Рига, 1990.-с.57-58.
11. Кашченко В.Е., Преображенская Е.Н., Сибирный А.А. Разработка нового биолюминесцентного метода определения концентраций АТФ//Био-термо-хемилюминесценция. Методические указания Всесоюзн. школы-семинара.-М.-Суздаль, 1990.-ч.2.-с.63-65.
  12. Кашченко В.Е., Преображенская Е.Н. Биолюминесцентный метод определения активности рибофлавинкиназы//Био-термо-хемилюминесценция. Методические указания Всесоюзн. школы-семинара.-М.- Суздаль, 1990.-ч.2.-с.65-67.
  13. Kashchenko V.E., Preobrazhenskaya E.N., Fayura L.R., Bryk R.M., Sibirny A.A. Enzymatic preparation of flavin mononucleotide using yeast riboflavin kinase//Proc. 15-th Internat. Specialized Symp. on Yeast.-Riga, 1991.-p.61.
  14. Kashchenko V.E., Preobrazhenskaya E.N., Fayura L.R., Bryk R.M., Sibirny A.A. Preparation of flavin mononucleotide by riboflavin enzymatic phosphorylation//Enzyme engineering. Proc. 7-th All-Union Symp.-Moscow, 1991.-p.37.
  15. Kashchenko V.E., Preobrazhenskaya E.N. New bioluminescence assay for ATP determination//Enzyme engineering. Proc. 7-th All-Union Symp.-Moscow, 1991.-p.127.
  16. Кашченко В.Е., Преображенская Е.Н., Сибирный А.А. Способ определения активности рибофлавинкиназы. Авторское свидетельство СССР N 1631089, 1990//Бюл. изобретений.-1991.- N 8.
  17. Кашченко В.Е., Преображенская Е.Н., Борецкий Ю.Р. Новые методы определения содержания витамина В<sub>2</sub> в пищевых и кормовых продуктах//Достижения биотехнологии агропромышленному комплексу. Тезисы докл. Всесоюзн. конф.-Черновцы, 1991.-т.2.-с.153-154.
  18. Кашченко В.Е., Преображенская Е.Н., Погорилко Л.Р. Имобилизация дрожевой рибофлавинкиназы включением в полиакриламидный гель//Приклад. биохим. и микробиол.-1991.-т.27, N 5.-с.711-719.
  19. Кашченко В., Преображенська О.М., Сибирний А.А. Селекція мутантів метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* - продуцентів рибофлавінкінази//VI З'їзд Укр. товариства генетиків і селекціонерів. Тези допов.-Київ, 1992.-т.1.-с.115.
  20. Kashchenko V.E., Preobrazhenskaya E.N., Ksheminska G.P., Sibirny A.A. The mutants of methylotrophic yeast as the producers of riboflavin kinase and FMN-adenyltransferase// Yeast.-1992.-v.8.-S.614, 14-52 B.
  21. Kashchenko V.E., Preobrazhenskaya E.N., Sibirny A.A. Selection of the methylotrophic yeast mutants: Novel producers of flavin nucleotides synthesizing enzymes//Proc. C1-Seventh Internat. Symp.-Warwick, 1992.-p.99.

22. Kashchenko V.E., Preobrazhenskaya E.N., Fayura L.R., Bryk R.M., Sibirny A.A. Preparation of flavinmononucleotide in batch and continuous flow enzyme reactors with soluble and immobilized riboflavin kinase//6-th European Cong. on Biotechnology, Abstract books.-Firenze, 1993.-v.II.-p.TU223.

## ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ РИБОФЛАВИНКИНАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ

### РЕЗЮМЕ

Исследована возможность применения иммобилизованной рибофлавинкиназы (АТР:рибофлавин-5'-фосфотрансферазы) для получения препаратов FMN, не содержащих изомерных примесей с неопределенной биологической активностью. Разработаны два новых высокочувствительных метода определения активности рибофлавинкиназы. Проведен поиск источников фермента среди ряда штаммов микроорганизмов, в том числе используемых в промышленности. Показано, что наиболее перспективным источником для выделения рибофлавинкиназы является биомасса парафин- и метанолутилизирующих дрожжей *Pichia guilliermondii*, *Candida maltosa* и *Hansenula polymorpha*. У этих дрожжей обнаружена индукция синтеза рибофлавинкиназы при выращивании на парафинах или метаноле. Среди мутантов *H. polymorpha* с нарушенной глюкозной катаболитной репрессией синтеза ферментов метаболизма метанола найден сверхпродуцент рибофлавинкиназы *H. polymorpha* ВКПМ У-926. Разработаны простые и эффективные процедуры очистки дрожжевой рибофлавинкиназы, позволяющие получать высокоактивные препараты. Получены иммобилизованные препараты фермента включением в структуру полиакриламидного геля и ковалентным присоединением к носителям органической (производные агарозы, полиакриламида) и неорганической (модифицированные силихромы) природы. Детально исследованы их свойства и показано, что при иммобилизации фермент сохраняет основные каталитические характеристики и значительно стабилизируется. Разработаны процессы синтеза FMN и его аналогов в реакторах периодического и непрерывного типа действия с использованием растворимой и иммобилизованной рибофлавинкиназы.

Підписано до друку 19.04.94 Формат 60x84/16 Друк офсет. Папір офсет.  
Умов.друк. арк. 1,63 Умов фарбо-відб. 1,63 Обл.-вид.арк 1,4 Тираж  
100 прим. Зам. 2485.

---

Обласна книжкова друкарня 290000, м.Львів, вул. Стефаника,II

11/24/2016

