

Національна Академія наук України
Відділення регуляторних систем клітини
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна

На правах рукопису

ФАНРА
ЛЮБОВ РОМАНІВНА

МНОЖИННІ МОЛЕКУЛЯРНІ ФОРМИ
РИБОФЛАВІНКІНАЗИ У ДРІЖДЖІВ

03.00.04 - біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Львів - 1997



Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі біохімічної генетики Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України

Науковий керівник - кандидат біологічних наук

Кащенко В.Є.

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук

Стойка Р.С.

кандидат біологічних наук, доцент

Кучерас Р.В.

Провідна організація - Інститут мікробіології та вірусології

ім. Д.К.Заболотного

Захист відбудеться 25 лютого 1997 року о 12 год на засіданні спеціалізованої Вченої ради Д.04.13.01 при Відділенні регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України (290005, вул. Драгоманова, 14/16).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України.

Автореферат розісланий "25" січня 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої Вченої ради
канд. біол. наук

М. В. Гончар

AB-36.932

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Особливе значення у метаболізмі клітини мають флавінові коферменти FMN і FAD, які входять до складу багатьох окисно-відновних біологічних каталізаторів - флавопротеїнів. флавінові коферменти утворюються з рибофлавіну (вітаміну B₂). Останнім часом досягнуті значні успіхи у дослідженні біосинтезу рибофлавіну (РФ) у мікроорганізмів, що привели до створення продуцентів цього вітаміну. У той самий час біосинтез флавінових коферментів вивчений недостатньо і це перешкоджає створенню теоретичної концепції координації синтезу алоферментів і коферментів у мікроорганізмів. Тому дослідження ферментів, що каталізують реакції синтезу флавінових нуклеотидів, є важливою проблемою сучасної біохімії.

Першу реакцію перетворення РФ до коферментних форм каталізує РФ-кіназа - фермент, який фосфорилює РФ з утворенням FMN. Хоча РФ-кіназа описана у деяких мікроорганізмів, проте не описані множинні молекулярні форми цього ферменту, не отримані його гомогенні препарати, відсутні відомості про термостабільні РФ-кінази.

Інтерес до дослідження РФ-кінази і можливості її використання в біотехнологічному процесі отримання FMN помітно зріс після публікації даних про неспроможність отримати чистий РФ-5'-фосфат за допомогою хімічного синтезу.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було вивчити процес фосфорилювання РФ у дріжджів та можливість використання іммобілізованої РФ-кінази для отримання чистих препаратів FMN. Для досягнення поставленої мети у роботі ставили такі основні завдання:

- дослідити термоінактивацію РФ-кінази у безклітинних екстрактах дріжджів *Pichia guilliermondii*;
- розробити методи розділення та очистки виявлених форм РФ-кінази та вивчити їх властивості;
- дослідити субстратну специфічність дигідро-РФ-кінази і РФ-кінази до ряду структурних аналогів РФ;
- вивчити наявність множинних молекулярних форм РФ-кінази у різних мікроорганізмів;
- дослідити можливі механізми регуляції синтезу виявлених форм РФ-кінази у дріжджовій клітині;
- отримати іммобілізовані препарати дріжджової РФ-кінази, вивчити їх властивості, а також можливості використання у процесі фермен-

ДІБ ім. В. Стефаніка
АН України

тативного синтезу FMN.

Наукова новизна роботи. Вперше показано, що у дріжджів процес фосфорильовання РФ є складним і каталізується двома суттєво відмінними за своїми властивостями ферментами - РФ-кіназою та дигідро-РФ-кіназою. Множинні молекулярні форми РФ-кінази виявлені у деяких представників різних систематичних груп мікроорганізмів. Науково-практичне значення. Дослідження ферментів, що синтезують флавінові нуклеотиди, є важливим з точки зору фундаментальної науки, оскільки закономірності біосинтезу FMN і FAD у мікроорганізмів вивчені недостатньо. З'ясування механізмів синтезу флавінових коферментів є необхідною умовою для створення продуцентів коферментних форм вітаміну B₂. Розробка методів іммобілізації РФ-кінази, отримання нерозчинних препаратів ферменту та дослідження їх властивостей може бути використане біотехнологічною промисловістю для ферментативного синтезу FMN.

Основні положення, які виносяться на захист.

1. У дріжджів, на відміну від існуючих раніше уявлень, процес фосфорильовання РФ є складним і каталізується двома суттєво відмінними за своїми властивостями ферментами - РФ-кіназою та дигідро-РФ-кіназою.
2. Множинні молекулярні форми РФ-кінази виявлені у представників мікроорганізмів різних систематичних груп.
3. Іммобілізована шляхом включення до структури поліакриламідного гелю РФ-кіназа може бути використана в реакторах періодичного і неперервного типу дії для отримання препаратів FMN високого ступеню чистоти.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідалися і обговорювалися на IV Всесоюзній конференції "Біосинтез ферментів мікроорганізмами" (Ташкент, 1988), VI зїзді Українського мікробіологічного товариства (Київ, 1989), Всесоюзній конференції "Проблеми мікробного синтезу вітамінів і їх производних" (Ташкент, 1990), Всесоюзній конференції "Методи получения, анализа и применения ферментов" (Рига, 1990), 15 Міжнародному симпозиумі по дріжджах (Рига, 1991), 7 Всесоюзному симпозиумі "Инженерная энзимология" (Москва, 1991), 6 Європейському конгресі по біотехнології (Флоренція, 1993), 35 Інтернаціональному конгресі по прикладній хімії (IUPAC) (Стамбул, 1995).

Публікації. Основні результати досліджень представлені в 11 друкованих працях.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, викладення результатів досліджень та їх обговорення, висновків і списку літератури (200 першоджерел). Робота викладена на сторінках друкованого тексту, ілюстрована 44 рисунками і 17 таблицями.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використовували:

- дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* паса XII, *S. cerevisiae* K1V-1116, *S. cerevisiae* 71B-1122, *S. bayanus* EC-1118, *Kluveromyces lactis*, *Candida famata* ВКМ 18, *Candida pseudotropicalis*, парафінутилізуючі дріжджі *Pichia guilliermondii* ATCC 9058, *Candida maltosa* ВСБ 774, штами метанолзасвоюючих дріжджів *Hansenula polymorpha* ВКПМ Y-201, *H. polymorpha* ML9, *Candida boidinii* T2A, *Pichia pinus* 1031;
- бактерії *Escherichia coli* K-12, аутокотрофні по РФ штами *Bacillus subtilis* ВКПМ В-5101, *Bacillus subtilis* R-32;
- актиноміцети *Streptomyces lividans* T2, *Sacharopolyspora erythraea* T1;
- гриби *Eremothecium ashbyi* 1906 - продуцент РФ, *Penicillium vitale* - продуцент глюкозооксидازی.

Мікроорганізми культивували на відповідних середовищах [Burkholder, 1943; Spizizen, 1958; Yagi, 1956]. Безклітинні екстракти отримували руйнуванням клітин за допомогою балістичного методу. Концентрацію білка у препаратах визначали за методом Lowry і ін. [1951].

Активність РФ-кінази визначали за методом Кащенко та ін. [1976]. Визначення активності РФ-кінази по відношенню до дигідро-РФ проводили за модифікованим методом [Kearney et al., 1979]. Активність FAD-синтетази визначали за методом Schrecker і Kohnberg [1950]. Активність лужної фосфатази визначали за модифікованим методом Струговщикової та ін. [1973].

Фракціонування безклітинних екстрактів сульфатом амонію та органічними розчинниками здійснювали за загальноприйнятими методиками [Скоупс, 1995]. Гель-хроматографію безклітинного екстракту проводили на колонках, наповнених сефадексами G-25, G-75, G-100. Для іонообмінної хроматографії використовували CM-сефадекс C-50, а для афінної - синю сефарозу CL-6B (Pharmacia, Швеція).

Вертикальний електрофорез за неденатуруючих умов проводили на пластинках у 7% поліакриламідному гелі (ПААГ) у тріс-гліциново-

му буфері, рН 8,3 при температурі 4°C протягом 4 год при напрузі 200В. Електрофорез у присутності 0,1% DS-На проводили в 15% ПААГ у тріс-гліциновому буфері рН 8,3 за методом Лемлі [1970].

Молекулярну масу ферментів визначали методом гель-фільтрації на сефадексі G-75 [Детерман, 1970] і електрофорезу в 15% ПААГ [Laemmly, 1970].

Імобілізацію РФ-кінази шляхом її включення до структури ПААГ проводили при концентрації мономерів в гелі від 10-20% та відносній концентрації біс-акриламиду від 2 до 4%.

Константи Міхаеліса (K_m) визначали за методом Lineweaver і Burk [1934]. Енергію активації реакції фосфорилювання РФ визначали за величиною кута нахилу прямої на графіку залежності швидкості синтезу FMN від температури [Диксон, Уебб, 1982]. Константу швидкості термоінактивації (K_{1n}) визначали графічно за кутом нахилу кривих залежності $\ln V_0/V$ від тривалості преінкубації ферменту. Енергію активації процесу інактивації (E_a^*) розраховували графічно за кутом нахилу прямих залежності $\ln K_{1n}$ від оберненої величини температури $1/T$. Розрахунок термодинамічних параметрів активації процесу теплової інактивації ферменту (ΔH^* , ΔS^* , ΔF^*) проводили на основі отриманих величин K_{1n} за раніше описаним методом [Березин, 1976].

Константу швидкості процесу інактивації, операційну стабільність РФ-кінази під час роботи реактора безперервної дії, а також півперіод збереження активності розраховували за методом Варфоломєєва і Березіна [1976]. Ефективність імобілізації оцінювали за величиною ферментативної активності в кінці процесу. Цей показник виражали як процентне співвідношення кількості ферменту, що зв'язався з носієм, до всієї кількості ферменту в препараті, використаному для імобілізації.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Виявлення двох форм РФ-кінази у дріжджів

Досліджували процес термоінактивації РФ-кінази в безклітинних екстрактах дріжджів *P. guilliermondii*. На рис.1 наведені кінетичні криві термоінактивації фермента при різних фіксованих температурах. Вирахувані значення K_{1n} для обидвох стадій інактивації РФ-кінази є суттєво відмінними (табл.1). Виходячи з чітко вираженого двофазного характеру інактиваційних кривих припустили, що в клітинах цих дріжджів присутні два ферменти, що каталізують реак-

цію фосфорилювання РФ, інактивація яких описується відповідно швидкою і повільною стадіями. На користь цього припущення свідчить відсутність впливу субстратів (РФ і АТР), активаторів (Mg^{2+}) та речовин білкової природи на двостадійний характер інактиваційних кривих, а також агрегації чи автолізу РФ-кінази в процесі термоінактивації.

Розраховані ефективні активаційні параметри процесу теплової інактивації для двох форм фермента також вказують на існування двох форм РФ-кінази (табл. 2). На підставі цих даних можна стверджувати, що інактивація двох форм РФ-кінази відбувається за різни-

Рис. 1. Напівлогарифмічні анаморфози залежності активності РФ-кінази від часу термоінактивації безклітинного екстракту дріжджів *P. guilliermondii* при температурах 75°C (1), 80°C (2), 85°C (3), 90°C (4).

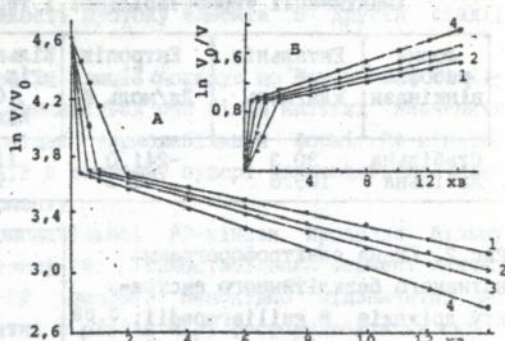


Табл. 1. Залежність величини K_{1H} від температури для двох стадій термоінактивації РФ-кінази

Температура °C	$K_{1H} \times 10^4 \text{ c}^{-1}$	
	Швидка стадія	Повільна стадія
75	82	7.2
80	135	7.8
85	225	9.1
90	400	11.2

ми механізмами [Жоли, 1968], що, в свою чергу, могло свідчити про певні відмінності у структурі термостабільного і термолабільного ферментів.

При електрофорезі нативного безклітинного екстракту, попе-

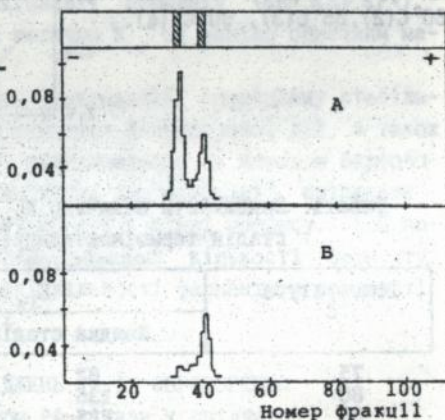
редньо очищеного від низькомолекулярних речовин шляхом гель-фільтрації на сефадексі G-25, виявлено два відмінних за електрофоретичною рухливістю компоненти, що володіють РФ-кіназною активністю (рис.2). "Швидкий" РФ-кіназний компонент відповідає термостабільній формі ферменту, "повільний" - ідентичний термолабільній РФ-кіназі.

Вивчення РФ-кіназної активності під час фосфорилування окисленої і повністю відновленої форми РФ (1,5-дигідрорибофлавіну) у

Табл.2. Активаційні термодинамічні параметри процесу термоінактивації термостабільної і термолабільної РФ-кінази

Форма рибофлавінкінази	Ентальпія ΔH° кДж/моль	Ентропія ΔS° Дж/моль К	Вільна енергія Гібса ΔG° кДж/моль	Енергія активації E_a кДж/моль
Стабільна	30.3	-241.0	114.3	33.2
Лабільна	109.6	30.3	98.8	112.5

Рис.2. Схема електрофореграми нативного безклітинного екстракту дріжджів *P.guilliermondii*; активність РФ-кінази до (А) і після (Б) термоінактивації.



безклітинних екстрактах термоінактивованих різні проміжки часу при 90°C показало, що на кінетичній кривій термоінактивації при визначенні активності РФ-кінази за дигідро-РФ чітко виражена лише повільна стадія інактивації ферменту.

Аналіз отриманих результатів дозволив зробити припущення, що термостабільна РФ-кіназа є більш специфічна до дигідро-РФ, тоді як термолабільний фермент - до окисленої форми флавінового субс-

трату. Виходячи із субстратної специфічності, термостабільну форму ферменту можна назвати дигідро-РФ-кіназою.

2. Розділення та очистка РФ-кінази та дигідро-РФ-кінази

Досліджували можливість розділення та очистки термостабільної і термолабільної форм РФ-кінази за допомогою різних методів. Цієї мети вдалося досягти при афінній хроматографії попередньо очищеного від низькомолекулярних речовин безклітинного екстракту на синій сефарозі CL-6B, що містить у якості ліганду цибакрон синій F3 GA. Найбільш оптимальний результат з розділення двох форм ферменту та їх компактній елюції був отриманий при градієнтній елюції АТР із зміною швидкості потоку елюента в другій стадії десорбції (рис.3А).

Термоінактивація профілю елюції показує, що перший пік РФ-кіназної активності, який вимивається при більш низьких значеннях концентрації АТР, відповідає термолабільній формі РФ-кінази. Збільшення концентрації АТР в елюючому буфері призводить до елюції термостабільного ферменту.

При цьому фракція термолабільної РФ-кінази проявляє більшу активність при фосфорилуванні РФ. Термостабільний фермент значно краще фосфорилує дигідро-РФ (рис.3Б). Необхідно відзначити, що обидві форми ферменту здатні в різній мірі фосфорилувати як окислений, так і відновлений флавіновий субстрат. У пікових точках ферментативної активності на профілі елюції білків активність термолабільної РФ-кінази по відношенню до дигідро-РФ складала 45-50% від активності по відношенню до РФ. Здатність термостабільного ферменту фосфорилувати дигідро-РФ на 30-35% перевищувала здатність до фосфорилування окисленої форми РФ. Таким чином, метод афінної хроматографії дозволив розділити дві форми ферменту та отримати високоактивні препарати РФ-кінази (1,5 МЕ/мг) і дигідро-РФ-кінази (0,9 МЕ/мг).

Результати гель-хроматографії безклітинного екстракту дріжджів *P. guilliermondii* на колонці 1,5 x 120 см, заповненій сефадексом G-75, наведені на рис.4А. При дослідженні здатності елюованих білків фосфорилувати дигідро-РФ виявлено пік ферментативної активності, який не співпадає з піком активності РФ-кінази.

З метою збільшення роздільної здатності методу було використано поєднання нисхідної і висхідної гель-хроматографії за допомогою двох колонок (2 x 200 см), заповнених сефадексом G - 75. Як

видно з рис. 4Б основні піки РФ-кіназої і дигідро-РФ-кіназої активностей відповідають білкам відповідно з більшою і меншою молекулярними масами.

Вклад активностей цих ферментів у загальну РФ-кіназну активність цитозолу складає 65-70% для РФ-кінази і 30-35% для дигідро-РФ-кінази. Тоді як дигідро-РФ-кіназна активність цитозолу клітини *P. guilliermondii* на 75-80% представлена активністю дигідро-РФ-кінази і 20-25% - активністю РФ-кінази.

Молекулярні маси РФ-кінази і дигідро-РФ-кінази визначені ме-

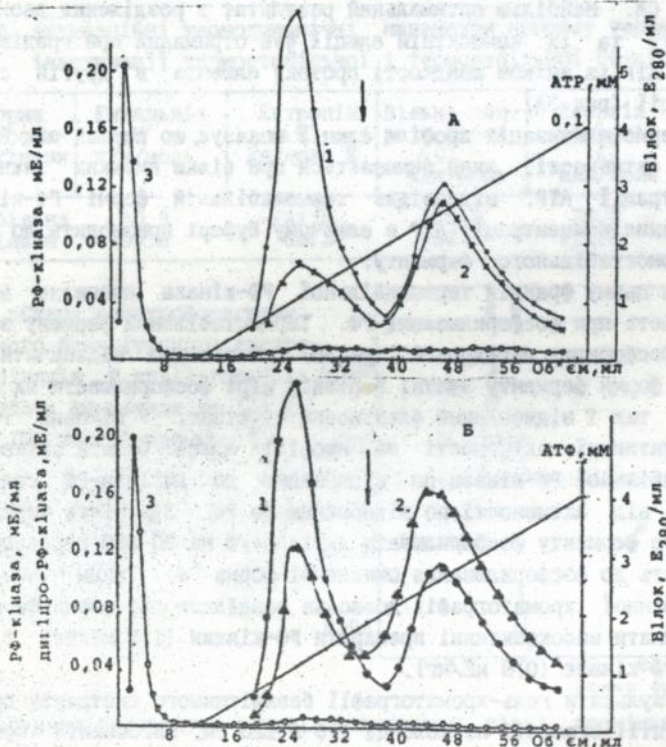


Рис. 3. Афинна хроматографія на синій сефарозі CL-6B препарату РФ-кінази після гел-фільтрації на сефадексі G-25: А - активність у фракціях до (1) і після (2) їх прогрівання при 80°С на протязі 3 хв. Б - активність у фракціях за РФ (1) і за дигідро-РФ (2); концентрація білку (3). Стрілкою відмічено зміну швидкості елції з 30 до 6 мл/год.

тодом гель-фільтрації становлять відповідно 28 і 24 кДа.

З метою отримання високоочищених препаратів дигідро-РФ-кінази проводили очистку ферменту за схемою представленою в табл. 3.

При нативному електрофорезі отриманого препарату дигідро-РФ-кінази нами виявлено лише один компонент, що володів дигідро-РФ-кіназною активністю в 1.35 раз більшою, ніж РФ-кіназною ($R_f = 0.36$). При електрофорезі очищеного препарату ферменту в ПААГ у присутності DS-Na ми не виявили супутніх білків (рис. 5). Молекулярна маса дигідро-РФ-кінази, визначена за допомогою методу електрофорезу, становить 24 кДа.

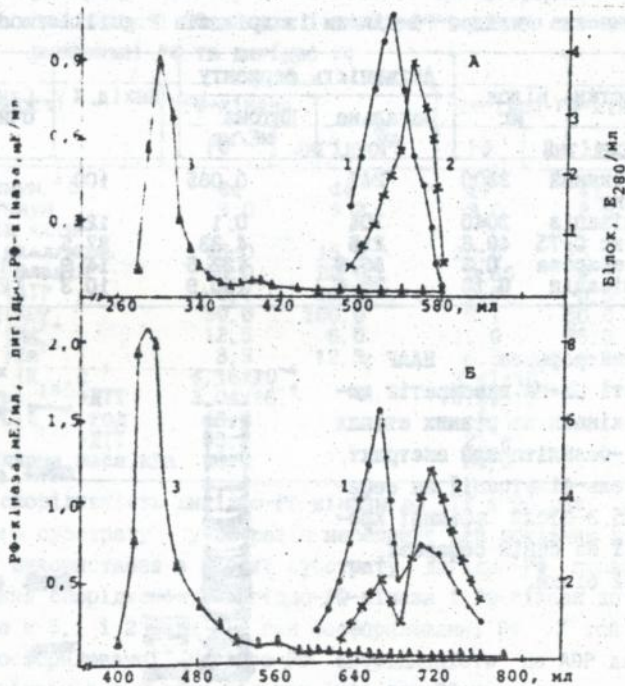


Рис. 4. Гель-хроматографія безклітинного екстракту дріждів *P. guilliermondii* на сефадексі G-75 на колонці 1,5x120 см - А. 2x400см - Б; 1-активність РФ-кінази, 2 - активність дигідро-РФ-кінази; 3-концентрація білку.

3. Вивчення властивостей двох форм РФ-кінази

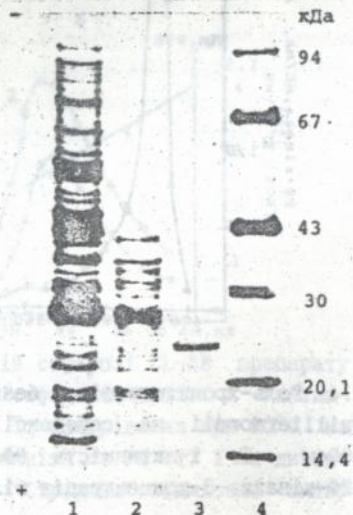
Отримані препарати ферментів використовували для дослідження властивостей двох форм РФ-кінази при фосфорилуванні РФ та дигідро-РФ.

Досліджені значення температурних оптимумів дії для РФ-кінази і дигідро-РФ-кінази дещо відмінні і не залежать від форми флавінового субстрату ферментативної реакції (табл.4). Енергія активації реакції фосфорилування дигідро-РФ дигідро-РФ-кіназою в 1,3 рази є нижчою, ніж при фосфорилуванні РФ, тоді як цей параметр для РФ-кінази при фосфорилуванні дигідро-РФ дещо зростає порівня-

Табл.3. Очистка дигідро-РФ-кінази із дріжджів *P.guilliermondii*

Етап очистки	Білок, мг	Активність ферменту		Вихід, %	Ступінь очистки
		Загальна МЕ	Питома МЕ/мг		
1. Безклітинний екстракт	3800	247	0,065	100	1
2. Ліофілізація	3040	304	0,1	123	1,54
3. Сефадекс G-75	49,8	216	4,33	87,5	66,7
4. Синя сефароза	0,3	36,8	122,5	14,9	1884,6
5. Ліофілізація	0,18	25,4	140,9	10,3	2168,0

Рис.5. Електрофорез у ПААГ у присутності DS-Na препаратів дигідро-РФ-кінази на різних етапах очистки: 1-безклітинний екстракт, 2-після гель-фільтрації на сефадексі G-75, 3-після афінної хроматографії на синій сефарозі, 4-маркерні білки.



но із РФ. Спостерігається незначний зсув рН-оптимуму дії у лужну сторону для дигідро-РФ-кінази і - у кислу для РФ-кінази при заміні відновленої форми флавінового субстрату на окислену.

Особливий інтерес становлять дані, отримані при вивченні спорідненості дигідро-РФ-кінази до субстратів, а також активаторів ферменту - іонів Mg^{2+} і Zn^{2+} . Значення K_m , виявлені для дигідро-РФ-кінази як до РФ, і, особливо, до дигідро-РФ, є дуже низькими і знаходяться на рівні значення K_m для РФ-кінази із *B. subtilis*, яка здатна фосфорилувати лише відновлену форму флавінового субстрату [Keagney et al., 1979]. При фосфорилуванні дигідро-РФ та дигідро-РФ.

Властивості	РФ-кіназа		Дигідро-РФ-кіназа	
	РФ	ДигідроРФ	РФ	ДигідроРФ
t-оптимум, °C	44	44	47	47
pH-оптимум	9.0	9.2	9.0	8.8
Енергія активації, ккал/моль	15.0	15.9	20.0	15.5
флавін	10.0	20.0	0.65	0.5
АТР	6.7	10.0	0.7	0.5
K_m , мкМ	50.0	100.0	9.1	50.0
для Mg^{2+}	12.5	6.0	11.0	26.0
Zn^{2+}	3.5	12.5	3.3	2.8
Стабільність при 0°C	$K_{1/2}$, год	4.16×10^{-6}	3.47×10^{-5}	
$+DTI$	3.04×10^{-6}		8.89×10^{-6}	
$t_{1/2}$, год	48.0		5.5	
$+DTI$	63.0		21.8	
Молекулярна маса, кДа	28.0		24.0	

ро-РФ спорідненість дигідро-РФ-кінази до АТР в 20 раз, а до флавінового субстрату - у 40 разів перевищує цей показник для РФ-кінази. Використання в якості субстрату дигідро-РФ приводить до зменшення спорідненості дигідро-РФ-кінази і РФ-кінази до АТР відповідно в 5.1 і 2 рази, ніж при фосфорилуванні РФ. У той же час при фосфорилуванні дигідро-РФ спорідненість до АТР для дигідро-РФ-кінази є в 2 рази більшою, ніж для РФ-кінази.

Дослідження активуючого впливу активаторів ферментативної реакції на дві форми РФ-кінази показало, що ферменти при фосфорилуванні дигідро-РФ значно відрізняються за спорідненістю до каті-

онів Zn^{2+} і Mg^{2+} .

Вивчення стабільності досліджуваних ферментів при $0^{\circ}C$ показало, що півперіод збереження активності ($t_{1/2}$) РФ-кінази в 8,6 раз перевищує цей показник для дигідро-РФ-кінази. Останній фермент значно краще зберігав свою активність у присутності відновлюючого агента - 4 мМ дитіотреїтолу (ДТТ).

Отже, показано, що у дріжджів, на відміну від існуючих раніше уявлень [Keagney et al., 1951; Кащенко і ін., 1976.], процес фосфорилування РФ є складним і каталізується двома суттєво відмінними за своїми властивостями ферментами - РФ-кіназою та дигідро-РФ-кіназою.

Відомо, що у клітинах дріжджів за різних умов культивування концентрація попередників флавінових коферментів може змінюватись у значних межах [Шавловський і ін., 1969; Cancedo et al., 1989]. Очевидно, що присутність у дріжджів двох РФ-кіназ, які значно відрізняються специфічністю дії і спорідненістю до субстратів, забезпечує постачання метаболічного апарату клітини флавіновими коферментами: по-перше - незалежно від форми, в якій флавіновий субстрат присутній у клітині; по-друге - у широкому діапазоні концентрацій флавінового і нуклеотидного субстратів.

4. Дослідження субстратної специфічності РФ-кінази і дигідро-РФ-кінази

Ензиматичне фосфорилування РФ-кіназою відновлених форм аналогів РФ до теперішнього часу не вивчалось. Для дослідження субстратної специфічності РФ-кінази і дигідро-РФ-кінази використовували аналоги РФ, структурні характеристики яких приведені в табл. 5.

Високою субстратною активністю для обох форм ферменту володіли окислені і відновлені аналоги, що містили в положенні 8 Cl-, CF_3 -, диметиламіно-, диетиламіно-, карбоксипентиламіно-, карбоксиметиламіногрупи.

Обидва ферменти перетворювали у відповідні похідні окислені та відновлені аналоги РФ із заміщеннями одночасно обох CH_3 -груп у 7 і 8 положеннях на CF_3 - і Cl-замісники. Досліджувані ферменти не фосфорильовали похідні ізоалоксазину та дигідроізоалоксазину, що містили при N10 залишок метилу, оксметилу, аміноетилу.

Відомо, що субстратами РФ-кінази є D-рибітильні аналоги вітаміну B₂, які не містять у положенні 8 ізоалоксазинового кільця

об'ємних замісників, причому наявність 5-вуглецевого поліольного залишку при N 10 вважалась обов'язковою умовою для каталітичного перетворення аналогу з утворенням 5'-фосфорильованого похідного [McCogrick et al., 1962; Каценко і ін., 1978].

Табл. 5. Субстратна специфічність РФ-кінази та дигідро-РФ-кінази по відношенню до аналогів РФ у формі хінону та дигідро-хінону

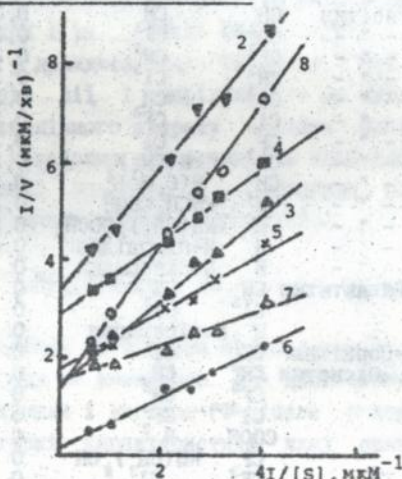
N п/п	Положення замісника			Швидкість фосфорильовання, мкм/хв			
	10	7	8	РФ-кіназа		дигідро-РФ-кіназа	
				хінон	гідрохінон	хінон	гідрохінон
1. D-Рибітил	CH	CH	CH	0.38	0.13	0.37	0.43
2. - " -	CH ³	CF ³	CF ³	0.25	0.26	0.27	0.28
3. - " -	CF ³	CH ³	CH ³	0.29	0.14	0.30	0.38
4. - " -	CH ³	Cl	Cl	0.31	0.17	0.32	0.35
5. - " -	Cl ³	CH	CH	0.35	0.27	0.34	0.40
6. - " -	Cl	CF ³	CF ³	0.22	0.30	0.23	0.25
7. - " -	CF	Cl	Cl	0.30	0.37	0.31	0.37
8. - " -	CH ³	N(CH ₂) ₂	N(CH ₂) ₂	0.23	0.17	0.21	0.23
9. - " -	CH ³	N(C H ₃) ₂	N(C H ₃) ₂	0.22	0.17	0.13	0.20
10. - " -	H ³	NHCH ₂ COOH	NHCH ₂ COOH	0.24	0.15	0.15	0.16
11. - " -	H	NH(CH ₂) ₂ COOH	NH(CH ₂) ₂ COOH	0.22	0.14	0.12	0.16
12. - " -	H	N-піролідил	N-піролідил	0.07	0.20	0.06	0.08
13. - " -	H	N-піперидил	N-піперидил	0	0.03	0	0.03
14D-Галактитил	CH ₃	CH	CH	0	0.03	0	0.03
15. - " -	Cl ³	CF ³	CF ³	0	0.25	0	0.22
16. - " -	H	N-піперидил	N-піперидил	0	0	0	0.15
17. D-Сорбітил	CF	Cl	Cl	0	0.15	0	0.11
18. 2'-Оксиетил	CH ³	CH	CH	0	0	0	0
19. - " -	CF ³	CH ³	CH ³	0	0	0	0
20. - " -	Cl ³	CF ³	CF ³	0	0	0	0
21. - " -	COOH	H ³	H ³	0	0	0	0
22. - " -	CF ³	NH(CH ₂) ₂ OH	NH(CH ₂) ₂ OH	0	0	0	0
23. CH ₃	CF ³	Cl ³	Cl ³	0	0	0	0
24. CH ³	CH ³	Cl	Cl	0	0	0	0
25. 2'-Аміноетил	Cl	CF ₃	CF ₃	0	0	0	0

Дослідження субстратної активності 10-D-галактитильних і 10-D-сорбітильного аналогів у формі гідрохінону показало, що ці дигідроізоалоксазини є в більшій чи меншій мірі активними субстратами як РФ-кінази, так і дигідро-РФ-кінази. Швидкість фосфорильовання гідрохінонної форми аналогу РФ, що містив у положенні 8 об'ємний замісник - N-піролідил теж була більшою, ніж для окисленої форми цього аналогу. Тоді як N-піперидильний аналог РФ фосфорильовався виключно у формі гідрохінону.

Табл. 6. Значення K_m РФ-кінази до аналогів і похідних дигідро-РФ.

№ п/п	Положення замісника			Значення K_m , мкМ
	10	7	8	
1.	Рибітил	CH ₃	CH ₃	20,0
2.	" "	CH ₃	N(CH ₃) ₂	36,0
3.	" "	CH ₃	N(C ₂ H ₅) ₂	41,0
4.	" "	H	NHCH ₂ COOH	25,0
5.	" "	H	NH(CH ₂) ₂ COOH	31,0
6.	" "	H	піролідил	250,0
7.	" "	Cl	CF ₃	22,0
8.	Галактитил	Cl	CF ₃	67,0

Рис. 6. Залежність швидкості фосфорилування РФ-кіназою 7-, 8- і 10-заміщених дигідроізоалоксазинів від концентрації аналогів (в обернених координатах); номери аналогів наведені в табл. 6.



Відомо, що для 1,5-дигідрофлавінів характерна непланарна структура молекули, яка складена по осі 5-N - 10-N під кутом 140-160° між площинами бензольного і піримідинового циклів [Nemserich et al., 1975]. Можна припустити, що взаємодія ферменту з більш об'ємними замісниками у положеннях 8 і 10 дигідроізоалоксазинів є полегшена внаслідок усунення стеричних перепон за рахунок зміни конфігурації молекули дигідрофлавінів.

Дослідження фосфорилування РФ-кіназою відновлених форм деяких аналогів вітаміну B₂ (рис. 6) показало, що воно відповідає кі-

нетиці Міхаеліса-Ментена Спорідненість РФ-кінази до похідних дигідроізоалоксазинів (табл.6) залежить від наявності та характеру замісників у положеннях 7,8 і 10. Величина K_m для 8-заміщених субстратів зростає в ряду: CF_3- , $-NH-CH_2-COOH$, $-NH-(CH_2)_5-COOH$, $-N(CH_3)_2$, $-N(C_2H_5)_2$, $-N$ -піролідил.

5. Дослідження активності РФ-кінази та дигідро-РФ-кінази у дріжджів різної видової належності та інших мікроорганізмів

Всі досліджені види і штами дріжджів (табл.7) та інших мікро-

Табл.7. Активність РФ-кінази і дигідро-РФ-кінази у безклітинних екстрактах деяких видів і штамів дріжджів

Вид дріжджів	РФ-кіназа, мкЕ/мг	дигідро-РФ-кіназа, мкЕ/мг
<i>P. guilliermondii</i>		
ATCC 9058	124.0	96.0
<i>S. cerevisiae</i>	34.0	18.0
раса XII		
<i>S. cerevisiae</i> 71B-1122	9.0	6.8
<i>S. cerevisiae</i> KIV-1116	11.0	7.8
<i>C. maltosa</i> ВСБ 774	186.0	178.0
<i>H. polymorpha</i> ВКПМ Y-201	135.0	116.0
<i>H. polymorpha</i> ML-9	94.0	86.0
<i>C. boidinii</i> T 2A	84.0	68.0
<i>P. pinus</i> 1031	85.0	74.0
<i>S. bayanus</i> EC-1118	16.0	9.8
<i>C. lamata</i> ВКМ-18	75.0	39.0
<i>K. lactis</i>	10.5	9.5
<i>C. pseudotropicalis</i>	18.5	18.5

організмів (табл.8) володіли як РФ-кіназою, так і дигідро-РФ-кіназою активностями. При цьому треба відзначити, що у дріжджів, актиноміцетів та грибів рівень РФ-кіназої активності переважає рівень активності дигідро-РФ-кінази.

До цього часу практично не виявлено наявності дигідро-РФ-кіназої активності у мікроорганізмів. У *B. subtilis* було описано лише РФ-кіназну активність [Бреслер і ін., 1977], а згодом - лише дигідро-РФ-кіназну [Кеагней, 1979]. У безклітинних екстрактах досліджених нами двох представників роду *Bacillus* визначили РФ-кіназну та дигідро-РФ-кіназну активності (табл.8). Слід зазначити, що дигідро-РФ-кіназна активність у цих штамів в 1,3-1,6 разів перевищувала РФ-кіназну. У *E. coli* активність дигідро-РФ-кінази в 3,5 рази перевищувала активність РФ-кінази. Таким чином, показано, що у

бактерій дигідро-РФ-кіназна активність є вищою, ніж РФ-кіназна.

При афінній хроматографії безклітинних екстрактів дріжджів *S. cerevisiae* раса XII, Н. polyomorpha ВКПМ У-201, *S. hoidinii* T2A та бактерій *B. subtilis* R-32 виявлено дві форми РФ-кінази, одна з яких була більш специфічною до РФ, а друга - до дигідро-РФ.

Дослідження рівнів РФ-кіназної та дигідро-РФ-кіназної активностей у безклітинних екстрактах дріжджів *P. guilliermondii* в різних фази росту не виявило їх суттєвих змін, що свідчить про збереження у процесі росту цих дріжджів постійної швидкості синтезу цих ферментів.

Табл. 8. Активність РФ-кінази та дигідро-РФ-кінази у безклітинних екстрактах деяких видів і штамів бактерій, актиноміцетів та грибів.

Штамі	РФ-кіназа, мкЕ/мг	дигідро-РФ-кіназа, мкЕ/мг
<i>B. subtilis</i> ВКПМ В-5101	14.9	25.0
<i>B. subtilis</i> R-32	3.2	4.3
<i>E. coli</i> K-12	2.0	7.0
<i>St. lividans</i> T2	51.0	37.0
<i>S. erythraea</i> T1	209.9	172.5
<i>P. vitale</i>	173.0	137.0
<i>E. ashbyii</i> 1906	185.0	128.0

P. guilliermondii відноситься до дріжджів, у яких біосинтез РФ значно зростає при вирощуванні на середовищі з низьким вмістом заліза [Шавловський та ін., 1969]. Проте ми не виявили впливу концентрації іонів Fe^{2+} у культуральному середовищі на синтез і співвідношення в клітині двох форм РФ-кінази.

Досліджували РФ-кіназну та дигідро-РФ-кіназну активності у безклітинних екстрактах дріжджів *P. guilliermondii* в залежності від концентрації кисню у культуральному середовищі. Культивування дріжджів *P. guilliermondii* в умовах лімітування кисню приводило до зростання в 2,5-3,0 рази дигідро-РФ-кіназної активності.

Вивчали також вплив джерел вуглецевого живлення на рівні РФ-кіназної і дигідро-РФ-кіназної активностей у деяких видів дріжджів. У парафіназасвоюючих дріжджів *P. guilliermondii* та *S. maltosa* заміна джерела вуглецю з глюкози на парафіни в культу-

ральному середовищі приводила до майже пропорційного зростання обох видів РФ-кіназної активності (табл.9).

При використанні як джерела вуглецю глюкози у всіх досліджуваних штамів метанолутилізуєчих дріжджів *Hansenula polymorpha* ВКПМ У-201, *H. polymorpha* ML9, *Candida boidinii* T2A, *Pichia pinus* 1031 рівень питомої активності РФ-кінази перевищував дигідро-РФ-кіназний, тоді як у клітин, культивованих на метанолі, дигідро-РФ-кіназна активність у деяких штамів майже в 1,5 рази була

Табл.9. РФ-кіназна і дигідро-РФ-кіназна активності в безклітинних екстрактах деяких видів і штамів дріжджів у залежності від джерела вуглецевого живлення

Штами	РФ-кіназа, мкЕ/мг			дигідро-РФ-кіназа, мкЕ/мг		
	глюкоза	парафіни	метанол	глюкоза	парафіни	метанол
<i>P. guilliermondii</i>						
ATCC 9058	124,0	164,0		76,0	98,0	
<i>C. maltosa</i> ВСБ 774	186,0	226,0		178,0	194,0	
<i>H. polymorpha</i> ВКПМУ-201	135,0		301,0	116,0		384,0
<i>H. polymorpha</i> ML-9	94,0		428,0	86,0		567,0
<i>C. boidinii</i> T 2A	84,0		172,0	68,0		244,0
<i>P. pinus</i> 1031	85,0		136,0	74,0		142,0

більшою від РФ-кіназної. Розділення двох форм РФ-кінази із дріжджів *H. polymorpha* ВКПМ У-201 за допомогою методу афінної хроматографії на колонці, наповненій синьою сефарозою СL-6В показало, що загальне зростання РФ-фосфорилюючої активності у клітинах дріжджів, вирощених на метанолі, головним чином відбувається за рахунок збільшення кількості дигідро-РФ-кінази.

6. Використання іммобілізованої РФ-кінази в процесі синтезу FMN

Досліджували можливість використання розчинних та іммобілізованих препаратів РФ-кінази з дріжджів для отримання препаратів FMN. Як джерело РФ-кінази використовували біомасу промислового штаму метанолутилізуєчих дріжджів *H. polymorpha* ВКПМ У-201. Препарати РФ-кінази (1,6 мЕ/мг) отримували шляхом фракціонування безклітинних екстрактів сульфатом амонію.

Найвищий вихід ферментативної активності при іммобілізації РФ-кінази шляхом включення в структуру ПААГ досягав 18% і спостерігався при концентрації мономерів у полімеризаційній суміші 20% і відносній концентрації зшивачого агенту 4%. Питома активність

одержаних іммобілізованих препаратів ферменту складала 0,34 МЕ/мл гелю.

Вивчали властивості як іммобілізованої (ПААГ-РФ-кіназа), так і нативної форми ферменту. Отримані експериментальні дані вказують на те, що при іммобілізації РФ-кінази з Н. polytrophus включенням у ПААГ практично не змінюються основні властивості ферменту (температурний та рН-оптимуми дії, енергія активації реакції фосфорильовання Р^h, спорідненість ферменту до субстратів реакції - РФ і АТР. Розчинна та іммобілізована РФ-кінази володіють високою спорідненістю до РФ (20 мкМ) і АТР (90 мкМ), що дає можливість у процесі ферментативної трансформації РФ здійснювати глибоке перетворення субстрату в продукт - FMN.

При вивченні стабільності розчинної та іммобілізованої РФ-кінази при зберіганні препаратів на холоді (0-4°C) встановлено, що за таких умов для розчинного ферменту півперіод збереження активності складає 29 год. Для ПААГ-РФ-кінази виявлено появу двох стадій інактивації - швидку і повільну з півперіодами збереження активності 13 і 17,4 діб, що значно перевищує ці параметри для розчинного ферменту.

Операційну стабільність ПААГ-РФ-кінази досліджували у реакторах періодичного і неперервного типу дії. У реакторах періодичного типу дії при інкубації ПААГ-РФ-кінази в умовах різних температур і концентрацій флавінового субстрату виявлено, що оптимальна трансформація субстратів в продукт реакції спостерігалась при температурі 37°C і концентрації РФ 0,2 мМ (рис.7). У цьому випадку продуктивність реактора складала 34 нмоль/год х мл на протязі 4 год роботи реактора. При пониженні температури інкубації час безвідмовної роботи реактора, коли ступінь конверсії субстрату залишається постійним, збільшувався до 14 год, але при цьому продуктивність реактора падала. Швидкість нагромадження FMN у реакторах періодичної дії починала зменшуватись при трансформації не менше 2/3 всього РФ суміші.

Операційну стабільність ПААГ-РФ-кінази при постійних концентраціях флавінового і нуклеотидного субстратів вивчали у реакторі безперервної дії (табл.10). При ступені конверсії 0,6 і швидкості потоку 1мл/год через реактор (об'єм 8 мл) швидкість синтезу FMN на протязі 12 год залишалась незмінною, зменшувалась у 3 рази на протязі наступних 28 год роботи реактора; в наступні 60 год - швидкість синтезу FMN впала лише на 5,6 % (рис.8). Півпе-

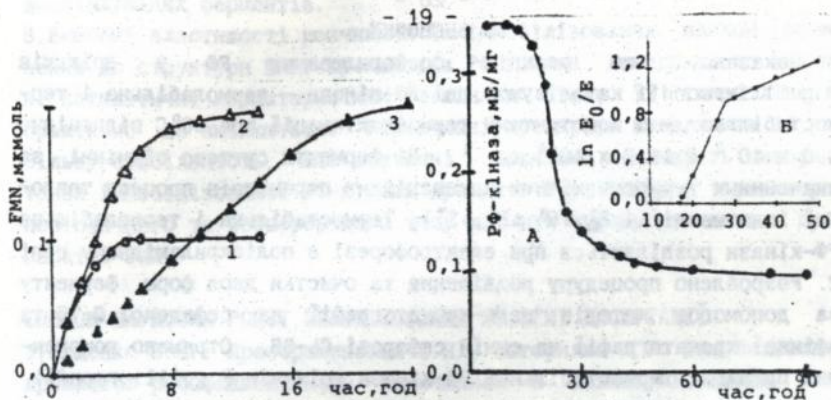


Рис. 7. Синтез FMN у реакторі періодичної дії з іммобілізованою в ПААГ РФ-кіназою при температурі 37° (1,2) і 20°С (3). Концентрація РФ - 0,1 мМ (1), 0,2 мМ (2,3).

Рис. 8. Зміна активності ферменту у реакторі безперервної дії з ПААГ-РФ-кіназою. А - в прямих координатах; Б - в координатах залежності $\ln E_0/E$ від часу роботи реактора.

Табл. 10. Інактивація ПААГ-РФ-кінази при зберіганні і в процесі синтезу FMN у реакторі безперервного типу дії

Інактивація препарату ферменту в процесі	Значення констант інактивації, год ⁻¹		Відношення $K_{in I}/K_{in II}$
	швидка стадія $K_{in I}$	повільна стадія $K_{in II}$	
Зберігання на холоді	$6,10 \times 10^{-3}$	$1,67 \times 10^{-3}$	3,7
Безперервний синтез FMN	$7,72 \times 10^{-2}$	$1,58 \times 10^{-2}$	4,9

ріод збереження активності ПААГ-РФ-кінази склав 26,6 год.

Отже, включення РФ-кінази в ПААГ створює можливості застосування цього ферменту в безперервному процесі синтезу FMN.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що реакцію фосфорилювання РФ у дріжджів *P. guilliermondii* каталізують дві РФ-кінази - термолабільна і термостабільна - з константами термоінактивації при 90°С відповідно $4,0 \times 10^{-2}$ і $11,2 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. Ці ферменти суттєво відмінні за значеннями термодинамічних активаційних параметрів процесу теплової інактивації ($E_a, \Delta G', \Delta H', \Delta S'$). Термостабільна і термолабільна РФ-кінази розділяються при електрофорезі в поліакриламідному гелі.
2. Розроблено процедуру розділення та очистки двох форм ферменту за допомогою методів гель-хроматографії на сефадексі G-75 та афінної хроматографії на синій сефарозі CL-6B. Отримано гомогенний препарат термостабільної РФ-кінази дріжджів *P. guilliermondii*.
3. Вивчені властивості двох форм РФ-кінази у процесах фосфорилювання РФ і дигідро-РФ. Термостабільний і термолабільний ферменти різняться між собою за температурним і рН-оптimumами, енергією активації реакції фосфорилювання РФ, спорідненістю до активаторів (Mg^{2+} і Zn^{2+}). Термостабільна РФ-кіназа має значно вищу, ніж термолабільний фермент, спорідненість до субстратів реакції - РФ ($K_m=0,65 \text{ мкМ}$), дигідро-РФ ($K_m=0,5 \text{ мкМ}$) і АТФ ($K_m=0,7 \text{ мкМ}$, $K_m=0,5 \text{ мкМ}$). Молекулярна маса термостабільного ферменту становить 24 кДа, а термолабільного - 28 кДа.
4. Термолабільна РФ-кіназа за своїми властивостями та пріоритетним субстратом відповідає раніше описаній РФ-кіназі дріжджів *P. guilliermondii*. Термостабільна РФ-кіназа відповідно до своєї субстратної специфічності названа дигідро-РФ-кіназою.
5. Досліджена субстратна специфічність дигідро-РФ-кінази і РФ-кінази до ряду аналогів РФ з замісниками у положеннях 7, 8 і 10 ізоалоксазинового кільця у формі кінону і дигідрокінону. Виявлений факт розширення субстратної специфічності двох ферментів під час фосфорилювання похідних дигідро-РФ.
6. Показана наявність множинних молекулярних форм РФ-кінази у представників дріжджів різної видової належності та деяких інших мікроорганізмів.
7. Встановлено, що рівень активності РФ-кінази і дигідро-РФ-кінази не залежить від фази росту і вмісту Fe^{2+} у культуральному середовищі. Культивування дріжджів за умов лімітування кисню супроводжується зростанням дигідро-РФ-кіназної активності. Вирощування метанол- та парафінзасвоюючих дріжджів на альтернативних джерелах вуглецю (метанол, парафіни) веде до зростання активності обох

досліджуваних ферментів.

8. Вивчені властивості розчинних та іммобілізованих шляхом включення до структури ПААГ препаратів РФ-кінази. Доведено, що основні каталітичні характеристики РФ-кінази після її іммобілізації практично не змінюються. Нерозчинні препарати виявляли в 14 раз більшу стабільність, ніж розчинні. Показана можливість використання іммобілізованої РФ-кінази дріжджів *H. polymorpha* у реакторах періодичного та безперервного типу дії для отримання чистих препаратів FMN.

СПИСОК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Кащенко В. Е., Преображенская Е. Н., Погорилко Л. Р. Иммобилизация дрожжевой рибофлавинкиназы включением в полиакриламидный гель // Прикл. биохим. микробиол., 1991, 27, 5, 789-796
2. Кащенко В. Е., Фаюра Л. Р., Сибирный А. А. Обнаружение у дрожжей *Pichia guilliermondii* термостабильной рибофлавинкиназы и исследование ее свойств // Биохимия, 1996, 61, 9, 1586-1595.
3. Фаюра Л. Р., Кащенко В. Е., Термостабильна рибофлавінкіназа у дріжджів *Pichia guilliermondii* // Укр. біохім. журн., 1997, 69, 1, 21-25.
4. Кащенко В. Е., Преображенская Е. Н., Федорович Д. В., Погорилко Л. Р., Шавловский Г. М. Очистка, свойства, иммобилизация и применение ферментов, синтезирующих флавиновые нуклеотиды // Биосинтез ферментов микроорганизмами. Тезисы докл. IV Всесоюзн. конф. - Ташкент, 1988. - с. 83-84.
5. Кащенко 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.
6. Кащенко 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. Всесоюзн. Конф. - Ташкент, 1990. - с. 60-61.
7. Кащенко В. Е., Преображенская Е. Н., Погорилко Л. Р. Получение очищенных и иммобилизованных препаратов рибофлавинкиназы и их использование в процессе ферментативного синтеза флавиномононуклеотида // Методы получения, анализа и применения ферментов. Тезисы

- докл. Всесоюзн. конф. - Рига, 1990. - с. 57-58.
8. Kashchenko V.E., Preobrazhenskay 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.
9. Kashchenko V.E., Preobrazhenskay 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. 17.
10. Kashchenko V.E., Preobrazhenskaya E.N., Fayura L.R., Bryk R.M., Sibirny A.A. Preparation of flavin mononucleotide 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
11. Kashchenko V.E., Preobrazhenskay E.N., Fayura L.R., Bryk R.M., Sibirny A.A. Preparation of flavin mononucleotide by riboflavin enzymatic phosphorylation // Abstracts 1 of 35th IUPAC Congress, 14-19 Aug., 1995, Istanbul, Turkey, section 1-3, P. 112.

Fayura L.R. Multiple molecular forms of riboflavin kinase in yeasts. The Candidate Thesis for a Master's Degree of Biological Science in the speciality 03.00.04 - biochemistry, Div. of Inst. of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 1997. 11 published works including 3 full-length articles on enzymatic phosphorylation of riboflavin in yeasts have been presented to obtain the candidate degree. It has been shown that in contrast to the widespread opinion, yeasts possess a complicated system for phosphorylation of riboflavin which consists of two functionally different forms of the enzyme, named riboflavin kinase and dihydroriboflavin kinase. These forms of enzyme have been shown to be present in many taxonomic groups of microorganisms. The possibility of the use of immobilized form of riboflavin kinase in batch and continuous flow enzyme reactors to produce FMN preparation of high purity has been demonstrated.

Файура Л.Р. Множественные молекулярные формы рибофлавинкиназы у дрожжей. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия, Отд. регуляторных систем клетки Ин-та биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины,

Львов, 1997. Защищаются 11 работ, которые содержат результаты изучения процесса фосфорилирования рибофлавина у дрожжей. Показано, что в отличие от существующих представлений, у дрожжей процесс фосфорилирования рибофлавина является сложным и катализируется двумя существенно отличающимися по своим свойствам ферментами - рибофлавинкиназой и дигидрорибофлавинкиназой. Множественные молекулярные формы рибофлавинкиназы обнаружены у представителей разных систематических групп микроорганизмов. Показана возможность использования иммобилизованной рибофлавинкиназы в реакторах периодического и непрерывного типа действия для получения препаратов FMN высокой степени чистоты.

Ключові слова: рибофлавін, флавінмононуклеотид, рибофлавінкіназа, множинні молекулярні форми ферментів.

Львівський національний університет імені Лесі Українки
Інститут біології та екології
Львів, Україна
2017

...riboflavin kinase... multiple molecular forms... yeast... Candidate Thesis... Biological Sciences... speciality 03.00.04 - Biochemistry... National Academy of Sciences of Ukraine... published... phosphorylation... riboflavin kinase and dihydro-riboflavin kinase... immobilized form of... flow enzyme reactors...

Зам. № 135. Підписано до друку 5 січня 1997 р.
Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 1,0. Тираж 100 пр.

Ротапринт Львівської наукової бібліотеки ім. В.Стофаника
НАН України. Львів, вул. Лермонтова, 15.

441650

AB 36.932

AB 36.932