



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Milda Gumbytė

**ALKOHOLOKSIDAZĖ IŠ MIELIŲ *PICHIA PASTORIS*. GRYNINIMAS IR
SAVYBĖS**

**ALCOHOL OXIDASE FROM THE YEAST *PICHIA PASTORIS*.
PURIFICATION AND PROPERTIES**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerija, valstybinis kodas 62105T201

Darbo vadovai: prof. G. Dienys,

m. d. V. Michailovienė

VILNIUS, 2006

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

(Vardas, pavardė)

(Data)

Milda Gumbytė

**ALKOHOLOKSIDAZĖ IŠ MIELIŲ *PICHIA PASTORIS*. GRYNINIMAS IR
SAVYBĖS**

**ALCOHOL OXIDASE FROM THE YEAST *PICHIA PASTORIS*.
PURIFICATION AND PROPERTIES**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerija, valstybinis kodas 62105T201

Vadovas _____

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vadovas _____

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas _____

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas _____

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

VILNIUS, 2006

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN
Egz. sk. 3
Data 2006 06 05

Magistratūros studijų baigiamasis darbas

Alkoholoksidazė iš mielių *Pichia pastoris*. Gryninimas ir savybės

Milda Gumbytė

Kalba

Lietuvių

Užsienio

ANOTACIJA

Šiame baigiamajame magistro darbe buvo parinkta alkoholoksidazės (AO) iš mielių *Pichia pastoris* gryninimo schema: biomasės suardymas, centrifugavimas, pašalinių baltymų nusodinimas amonio sulfatu ir jonų mainų chromatografija. Po chromatografinio gryninimo NaDS – PAGE elektroforezėje gaunama viena juostelė pagal molekulinį masių standartus atitinka AO monomerui.

Išgrynintam baltymui buvo ištirtos šios savybės: aktyvumo priklausomybė nuo pH, temperatūrinis optimumas, pH stabilumas ir temperatūrinis stabilumas. Izoelektrinio fokusavimo metodu nustatyta, kad AO susideda iš trijų izofermentų, kurių izoelektriniai taškai yra 5,27, 5,18, 5,16. Taip pat tirtas subvienetų susiuvimas trifunkciniu susiuvančiu agentu 1,3,5-triakriiloil-heksahidro-s-triazinu.

Atlikta fermento imobilizacija ant dviejų nešiklių: modifikuoto poliuretano ir modifikuoto chitozano. Ištirtos imobilizuotų preparatų savybės: aktyvumo priklausomybė nuo pH, temperatūrinis optimumas, pH stabilumas ir temperatūrinis stabilumas.

Darbą sudaro 6 dalys: įvadas, analitinė dalis, eksperimentinė dalis, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 52 p. teksto be priedų, 20 iliustr., 17 lent., 32 bibliografiniai šaltiniai.

Reikšminiai žodžiai:

Alkoholoksidazė, mielės *Pichia pastoris*, imobilizacija, izofermentai

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of fundamental sciences
Department of chemistry and bioengineering

ISBN
Numbers of copys 3
Data 2006 06 05

Magistratūros studijų baigiamasis darbas

Alcohol oxidase from the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties

Milda Gumbytė

Language

Lithuanian

English

SUMMARY

Alcohol oxidase (AO) from the methylotropic yeast *Pichia pastoris* was purified by ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. The purified enzyme gave one band by SDS – PAGE electrophoresis with molecular weight expected for AO monomer.

Optimal pH and temperature were found for the purified enzyme. pH and temperature stability were determined. By the method of isoelectric focusing was established that AO consist of three isoenzymes with isoelectric points 5,27, 5,18, 5,16. Cross – linking of AO subunits by 1,3,5-triacryloyl-hexahydro-s-triazine was investigated.

AO was immobilized on polyurethane carrier and on modified chitozan. Properties of the immobilized AO were investigated.

Keywords:

Alcohol Oxidase, yeast *Pichia pastoris*, immobilization, isoenzymes

TURINYS

| | |
|--|----|
| SANTRUMPOS..... | 7 |
| PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS..... | 9 |
| LENTELIŲ SĄRAŠAS..... | 10 |
| ĮVADAS..... | 11 |
| 1. ANALITINĖ DALIS..... | 12 |
| 1.1. Metilotrofinės mielės..... | 12 |
| 1.2. Metilotrofinių mielių metabolizmas..... | 12 |
| 1.3. Alkoholoksidazių gryninimas..... | 13 |
| 1.4. Alkoholoksidazių sudėtis ir savybės..... | 14 |
| 1.4.1. Alkoholoksidazių molekulinės masės ir ketvirtinė struktūra..... | 14 |
| 1.4.2. Alkoholoksidazių aminorūgščių sudėtis..... | 15 |
| 1.4.3. FAD – AO prostetinė grupė..... | 17 |
| 1.4.4. Alkoholoksidazių pI reikšmės..... | 18 |
| 1.4.5. Alkoholoksidazių aktyvumo pH optimumas..... | 18 |
| 1.4.6. Alkoholoksidazių aktyvumo temperatūrinis optimumas..... | 19 |
| 1.4.7. Alkoholoksidazių pH stabilumas..... | 19 |
| 1.4.8. Alkoholoksidazių temperatūrinis stabilumas..... | 20 |
| 1.4.9. Alkoholoksidazių laikymo sąlygos..... | 21 |
| 1.5. Alkoholoksidazių Michaelio konstantų reikšmės..... | 21 |
| 1.6. Alkoholoksidazių substratinis specifiškumas..... | 22 |
| 2. EKSPERIMENTINĖ DALIS..... | 25 |
| 2.1. MEDŽIAGOS IR APARATŪRA..... | 25 |
| 2.1.1. Medžiagos | 25 |
| 2.1.2. Aparatūra..... | 26 |
| 2.1.3. Tirpalai..... | 27 |
| 2.1.4. Terpės..... | 28 |
| 2.2. TYRIMO METODAI..... | 29 |
| 2.2.1. Mielių <i>Pichia pastoris</i> auginimo metodika..... | 29 |
| 2.2.2. Fermento alkoholoksidazės (AO) išskyrimas ir gryninimas..... | 29 |
| 2.2.2.1. Mielių <i>Pichia pastoris</i> ląstelių ardymo metodika..... | 29 |
| 2.2.2.2. Pašalinių baltymų nusodinimas amonio sulfatu..... | 30 |
| 2.2.2.3. Jonų mainų chromatografija..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.3. Baltymų analizė | 31 |
| 2.2.4. Alkoholoksidazės aktyvumo nustatymo metodika..... | 31 |
| 2.2.4.1. Kalibracinio grafiko gavimas | 31 |
| 2.2.4.2. Fermento aktyvumo nustatymas..... | 31 |
| 2.2.5. pH optimumo nustatymas..... | 32 |
| 2.2.6. pH stabilumo nustatymas..... | 32 |
| 2.2.7. Temperatūrinio optimumo nustatymas..... | 32 |
| 2.2.8. Temperatūrinio stabilumo nustatymas..... | 33 |
| 2.2.9. Oligomerinės struktūros tyrimas..... | 33 |
| 2.2.10. AO imobilizacija..... | 33 |
| 2.2.10.1. AO imobilizavimas ant poliuretaninio nešiklio..... | 33 |
| 2.2.10.2. AO imobilizavimas ant modifikuoto chitozano..... | 33 |
| 2.2.11. Imobilizuotos AO aktyvumo nustatymas..... | 34 |
| 2.2.12. Imobilizuotos AO pH optimumo nustatymas..... | 34 |
| 2.2.13. Imobilizuotos AO pH stabilumo nustatymas..... | 34 |
| 2.2.14. Imobilizuotos AO temperatūrinio optimumo nustatymas..... | 35 |
| 2.2.15. Imobilizuotos AO temperatūrinio stabilumo nustatymas..... | 35 |
| 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS..... | 36 |
| 3.1. Mielių <i>Pichia pastoris</i> auginimas..... | 36 |
| 3.2. Alkoholoksidazės gryninimas..... | 36 |
| 3.3. AO imobilizacija..... | 38 |
| 3.4. AO savybės..... | 40 |
| 3.4.1. AO aktyvumo priklausomybė nuo pH..... | 40 |
| 3.4.2. Alkoholoksidazės temperatūrinis optimumas..... | 41 |
| 3.4.3. Alkoholoksidazės pH stabilumas..... | 42 |
| 3.4.4. Alkoholoksidazės temperatūrinis stabilumas..... | 43 |
| 3.4.5. Alkoholoksidazės stabilumas laikant..... | 44 |
| 3.4.6. Alkoholoksidazės izoelektrinis fokusavimas..... | 45 |
| 3.5. AO oligomerinės struktūros tyrimas..... | 46 |
| IŠVADOS..... | 49 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS..... | 51 |

SANTRUMPOS

| | |
|-------------------|---|
| AO | Alkoholoksidazė |
| FAD | Flavinadenindinukleotidas (oksiduotas) |
| FADH ₂ | Flavinadenindinukleotidas (redukuotas) |
| NAD | Nikotinamidadenindinukleotidas |
| NADH | Nikotinamidadenindinukleotidas (redukuotas) |
| AOX1 | Alkoholoksidazės pirmasis genas |
| AOX2 | Alkoholoksidazės antrasis genas |
| kDa | Kilo daltonai |
| Lys | Lizinas |
| His | Histidinas |
| Arg | Argininas |
| Asp | Asparto rūgštis |
| Asn | Asparaginas |
| Thr | Treoninas |
| Ser | Serinas |
| Glu | Glutaro rūgštis |
| Gln | Glutaminas |
| Pro | Prolinas |
| Gly | Glicinas |
| Ala | Alaninas |
| Val | Valinas |
| Met | Metioninas |
| Ile | Izoleucinas |
| Leu | Leucinas |
| Tyr | Tirozinas |
| Phe | Fenilalaninas |
| Cys | Cisteinas |
| Trp | Triptofanas |
| DEAE | Dietilaminoetil |
| Mr | Molekulinė masė |
| YNB | Mielių ekstraktas be aminorūgščių ir amonio sulfato |

| | | |
|-------------|---|----------------------|
| PMSF | Fenilmetilsulfonilfluoridas | $C_7H_7FO_2S$ |
| YEPD | Pilna mielių kultūros palaikymo terpė | |
| NaDS | Natrio dodecilsulfatas | $C_{12}H_{25}NaO_4S$ |
| β -ME | β - Merkaptioetanolis | $HSCH_2CH_2OH$ |
| TAT | 1,3,5 – triakriiloil – heksahidro – s – triazinas | $C_{12}H_{15}O_3N_3$ |
| IP | Imobilizuotas fermentas | |
| RT | Reagento tirpalas formaldehido nustatymui | |
| ST | Substrato tirpalas | |
| BTI | Biotechnologijos institutas | |
| VU | Vilniaus universitetas | |
| CHF | Chemijos fakultetas | |
| MCHZ | Modifikuotas chitozanas | |
| GA | Glutaro aldehidas | $C_5H_8O_2$ |
| U | Alkoholoksidazės aktyvumo vienetas | |

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

| | |
|---|-----------|
| 1 pav. Metanolio oksidacija mielėse schema..... | 13 |
| 2 pav. AOX1 ir AOX2 genų sekų palyginys..... | 16 |
| 3 pav. Fermentinio aktyvumo ir Trp fluorescencijos emisijos kitimai..... | 17 |
| 4 pav. AO pH stabilumas..... | 20 |
| 5 pav. AO jonų mainų chromatografija NaDS elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje vaizdas..... | 37 |
| 6 pav. Baltymo AO grynimo stadijų 12% NaDS elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje vaizdas..... | 37 |
| 7 pav. AO imobilizacijos ant poliuretaninio nešiklio schema..... | 38 |
| 8 pav. AO imobilizacijos ant modifikuoto chitozano schema..... | 39 |
| 9 pav. AO aktyvumo priklausomybė nuo pH..... | 41 |
| 10 pav. AO aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros..... | 42 |
| 11 pav. AO pH stabilumas..... | 43 |
| 12 pav. AO temperatūrinis stabilumas..... | 43 |
| 13 pav. AO tirpalo aktyvumo priklausomybė nuo laikymo sąlygų ir trukmės..... | 44 |
| 14 pav. IP aktyvumo priklausomybė nuo laikymo trukmės +4°C temperatūroje..... | 45 |
| 15 pav. AO izoelektrinio fokusavimo vaizdas..... | 45 |
| 16 pav. Izoelektrinio fokusavimo kalibracinis grafikas..... | 46 |
| 17 pav. 1,3,5-triakriloil-heksahidro-s-triazinas..... | 47 |
| 18 pav. Amino grupių modifikavimas TAT..... | 47 |
| 19 pav. Susiuvimo schema veikiant TAT..... | 47 |
| 20 pav. Baltymo AO susiūtų formų identifikacijos 6 % NaDS elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje vaizdas..... | 48 |

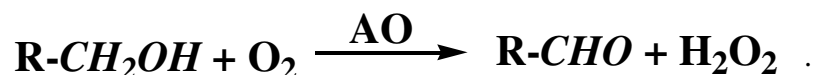
LENTELIŲ SĄRAŠAS

| | |
|---|--------------|
| 1 lentelė. AO gryninimo schemas..... | 14 |
| 2 lentelė. Alkoholoksidazių (AO) molekulinės masės..... | 14 |
| 3 lentelė. AO aminorūgščių sudėtis..... | 15-16 |
| 4 lentelė. AO pI reikšmės..... | 18 |
| 5 lentelė. AO pH optimumai..... | 18 |
| 6 lentelė. AO aktyvumo pH intervalai..... | 19 |
| 7 lentelė. AO temperatūrinis optimumas..... | 19 |
| 8 lentelė. AO temperatūrinis stabilumas..... | 20-21 |
| 9 lentelė. AO laikymo sąlygos..... | 21 |
| 10 lentelė. AO savitasis aktyvumas..... | 21 |
| 11 lentelė. AO K_M reikšmės..... | 22 |
| 12 lentelė. AO iš <i>Torulopsis</i> ir <i>Hansenula polymorpha</i> substratinis specifiškumas..... | 22 |
| 13 lentelė. AO iš <i>Pichia sp.</i> substratinis specifiškumas..... | 23 |
| 14 lentelė. <i>Candida boidinii</i> AO komplekso su azidu substratinis specifiškumas..... | 23-24 |
| 15 lentelė. AO iš <i>Candida boidinii</i> substratinis specifiškumas..... | 24 |
| 16 lentelė. AO grynimo rezultatai..... | 38 |
| 17 lentelė. AO imobilizacijos rezultatai..... | 40 |

IVADAS

Šiuo metu viena iš svarbių biotechnologijos kryptių yra fermentų panaudojimas organinėje sintezėje. Labai perspektyvūs organinėje sintezėje yra oksidazių klasės fermentai, pavyzdžiui, alkoholoksidazės.

Alkoholoksidazė (AO) – tai didelės molekulinės masės (~675 kDa) homooktamerinis flavoproteinas, susidedantis iš aštuonių ~80 kDa identiškų subvienetų. Alkoholoksidazė yra svarbus metilotrofinių mielių metabolizmo fermentas. Augant mielėms metanolio terpėje, AO tampa pagrindiniu pagal kiekį ląstelės baltymu. Metilotrofinės mielės išsiskiria iš kitų mielių šeimų tuo, kad augdamos kaip anglies šaltinį gali naudoti organinius junginius, turinčius savo sudėtyje vieną anglies atomą, pvz., metanolį. Alkoholoksidazė katalizuoja pirminių alkoholių oksidaciją iki aldehidų, panaudodami molekulinį deguonį:



Alkoholoksidazės geriausiai oksiduoja metanolį, blogiau etanolį ir dar silpniau aukštesnius alkoholius. Šiam darbui buvo pasirinkta mielių *Pichia pastoris* kultūra, produkuojanti ypač plataus specifiškumo alkoholoksidazę.

Prieš kelerius metus VU Chemijos fakulteto Polimerų chemijos katedroje, bendradarbiaujant su Biotechnologijos institutu ir VU Gamtos mokslų fakultetu, buvo pradėta tirti alkoholoksidazę iš metilotrofinių mielių *Pichia pastoris*. Tyrimų tikslas buvo nustatyti galimybes panaudoti šį fermentą organinėje sintezėje aldehidams gauti iš atitinkamų alkoholių. Šis magistro darbas yra anksčiau paminėtų tyrimų tęsinys. Darbo tikslas buvo sukurti AO gryninimo schemą, iširti pagrindines natyvaus ir imobilizuoto fermento savybes.

Pagrindinė eksperimentinio darbo dalis buvo atlikta Biotechnologijos instituto Biotermodynamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje. Pradiniai mielių *Pichia pastoris* auginimo bandymai buvo atlikti VU Gamtos mokslų fakulteto Augalų fiziologijos ir mikrobiologijos katedroje. AO imobilizacija atlikta VU Chemijos fakulteto Polimerų chemijos katedroje.

1. Analitinė dalis

1.1 Metilotrofinės mielės

Mielės – eukariotiniai mikroorganizmai, kurie dauginasi vegetatyviniu būdu: pumpuravimosi ir dalijimosi. Jie giminingi pelėsiams ir mikrogrybams [31].

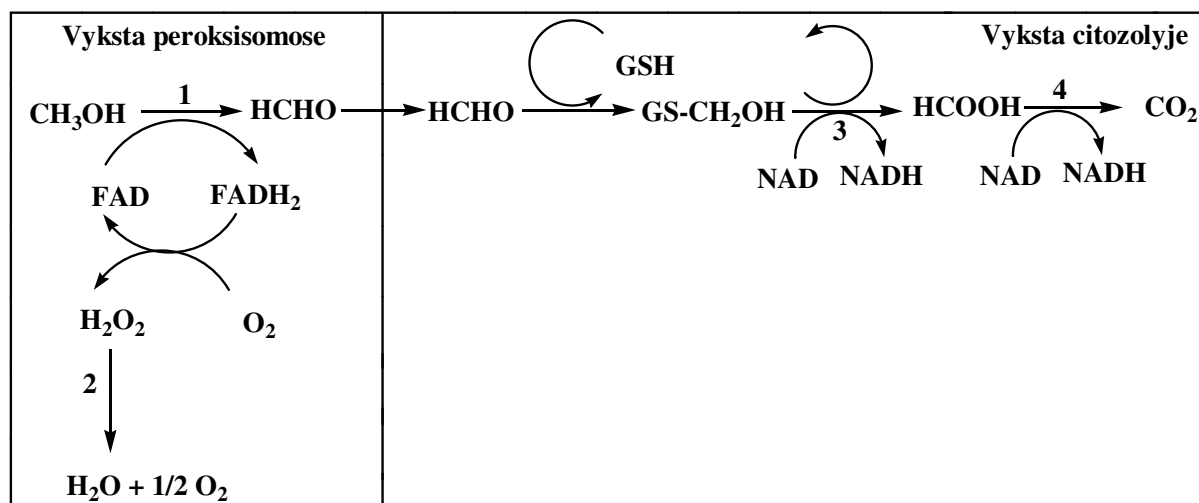
Gamtoje mielių įvairovė labai didelė. Šiuo metu yra aprašyta apie 700 jų rūšių. Jos yra chemoorganotrofai, kurių augimui reikalinga anglis yra organinės formos (pvz., organinės ir riebiosios rūgštys, angliavandeniai, polioliai, įvairūs heterocikliniai ir polimeriniai junginiai, alifatiniai alkoholiai). Mielės randamos augaluose, gyvūnuose (keletas nepatogeninių mielių yra susijusios su virškinimo traktu, tačiau yra ir kenksmingų). Jų aptinkama vandenyje (kai kurios mielių rūšys randamos esant temperatūrai nuo - 3 iki + 13°C, 35 % druskingumui, 4000 metrų gylyje), dirvožemyje, atmosferoje (virš dirvožemio paviršiaus) ir net tokiose ekstremaliose vietose kaip Antarktida. Mielės plačiai naudojamos maisto pramonėje (pvz., kepimui, alaus pramonėje, etanolio gamyboje), medicininiais tyrimams (pvz., vėžio, AIDS vaistų metabolizmo, įvairių genetinių ligų tyrimui), vaistų pramonėje (pvz., įvairių vakcinų, hormonų gamybai) ir kt. [27].

Metilotrofinės mielės išsiskiria iš kitų mielių šeimų tuo, kad augimui kaip anglies šaltinį gali naudoti organinius junginius, turinčius savo sudėtyje vieną anglies atomą, pvz., metanolį. Metilotrofinių mielių gentys: *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, *Torulopsis* (ankstesnis pavadinimas *Kloeckera*), *Ascomycetous*, *Asporogenous* [3].

1.2 Metilotrofinių mielių metabolizmas

Metilotrofinių mielių, auginamų metanolinėje terpėje, ląstelėse gaminasi didelis kiekis fermento alkoholoksidazės (AO). Mielėse *Pichia* ir *Candida* AO subvienetai yra sintetinami citozolyje, po to įvedami į peroksisomas. Peroksisomose subvienetai susijungia į aktyvų homooktamerą. Kai organelėse yra didelė oktamerinės AO koncentracija, fermentas gali suformuoti tarpinius kūnelius. Mielėse *Hansenula* aktyvi AO oktamerinė forma susidaro citozolyje, o ne peroksisomose [26].

Alkoholoksidazė katalizuoja pradinį metanolio metabolizmo etapą mielėse: metanolis oksiduojamas iki formaldehido ir vandenilio peroksido. Metanolio metabolizmas vyksta pagal tą pačią schemą (1 pav.) visose metilotrofinėse mielėse.



1 pav. Metanolio oksidacija mielėse schema:

1 – alkoholoksidazė, 2 – katalazė, 3 – formaldehidodehidrogenazė, 4 – formatdehidrogenazė, GSH – redukuotas glutationas [5]

Dėl vandenilio peroksido toksiškumo pradinės stadijos vyksta specialiose organelėse – peroksisomose [3]. Peroksisomos – plonasluoksne membrana atskirtos organelės, turinčios katalazę ir vieną ar kelias vandenilio peroksidą gaminančias oksidazes. Šių organelių skaičius, dydis ir baltymų kiekis jose gali būti labai įvairus, tai priklauso nuo mielių augimo sąlygų, nes kai kurie fermentai, dalyvaujantys anglies ir azoto šaltinių metabolizme, kaupiasi šiose organelėse. Peroksisomų dauginimasis vyksta metilotrofinėse mielėse gliukozę pakeitus į metanolį kaip anglies ir energijos šaltinį. Šiose sąlygose peroksisomos gali užimti iki 80 % citozolio tūrio [5]. Be AO dar yra ir kitų fermentų, dalyvaujančių metanolio metabolizme: katalazė, dihidroksiacetono sintazė, formaldehidodehidrogenazė, S-formilglutationo hidrolazė, formatdehidrogenazė [5].

1.3 Alkoholoksidazių gryninimas

Alkoholoksidazių, išskirtų iš įvairių mielių rūšių, gryninimo schemas pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. AO gryninimo schemos

| Etapo Nr. | Literatūra | | | |
|-----------|---|--|--------------------------|-------------------------------------|
| | [2] | [14] | [23] | [11] |
| 1. | Mielių ląstelių suardymas | | | |
| 2. | Nusodinimas amonio sulfatu iki 40 % | Nusodinimas amonio sulfatu (50 ~ 80 %) | Veikimas polietileniminu | Nusodinimas amonio sulfatu iki 40 % |
| 3. | Nusodinimas amonio sulfatu iki 60 % | DEAE-Celiuliozė | DEAE-Sefarozė | Nusodinimas amonio sulfatu iki 60 % |
| 4. | DEAE-Sefadeks | Išsodinimas amonio sulfatu (50 ~ 60 %) | DEAE-Toyopearl | DEAE-Celiuliozė |
| 5. | Filtracija per Ultrigel ACA 34 kolonėlę | SefadeksG-200 | Sefakrilas-S300 | - |
| 6. | - | Kristalizacija | - | |

1.4 Alkoholoksidazių sudėtis ir savybės

1.4.1 Alkoholoksidazių molekulinės masės ir ketvirtinė struktūra

Alkoholoksidazių, išskirtų iš skirtingų mielių rūšių, molekulinė masė skiriasi (2 lentelė). Subvienetų skaičius išlieka tas pats – 8. Vienos rūšies mielių AO subvienetai tarpusavyje identiški. Subvieneto prostetinė grupė – FAD (flavinadenindinukleotidas).

2 lentelė. Alkoholoksidazių (AO) molekulinės masės

| | <i>Pichia pastoris</i> [2] | <i>Hansenula polymorpha</i> [15] | <i>Candida boidinii</i> [21] |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| AO molekulinė masė, kDa | 675 | 670 | 600 |
| Subvienetų skaičius | 8 | 8 | 8 |
| Subvieneto molekulinė masė, kDa | 80 | 83 | 74 |
| Prostetinė grupė | FAD | FAD | FAD |

Veikiant AO iš *Hansenula polymorpha* ląsteles cianidu, kofaktorių FAD disocijuoja iš fermento, bet AO oktamerą nedisocijuoja į subvienetus [28]. Iš AO (*Candida boidinii*) FAD galima pašalinti šildant 2 min. arba pridėjus 0,1 % natrio dodecilsulfato. Tai įrodo, kad FAD nėra kovalentiškai sujungtas su fermento baltymu [21].

Laikant 80 % glicerolyje, AO inaktyvuojasi, nes oktomerinė AO forma disocijuoja į subvienetus, kurie išlaiko FAD, bet neturi katalitinio aktyvumo. Inaktyvuotos AO tirpalo 80 % glicerolyje skiedimas fosfatiniu buferiniu tirpalu reaktyvuoja AO. Reaktyvavimas, laikant lede, buvo efektyvesnis nei kambario temperatūroje [26].

1.4.2 Alkoholoksidazių aminorūgščių sudėtis

3 lentelė. AO aminorūgščių sudėtis

| Aminorūgštis | <i>Pichia pastoris</i> | <i>Hansenula polymorpha</i> | <i>Torulopsis</i> |
|--------------|------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Lys | 41 | 39 | 44 |
| His | 23 | 21 | 19 |
| Arg | 35 | 39 | 38 |
| Asx* | 88 | 106 | 94 |
| Thr | 43 | 50 | 43 |
| Ser | 41 | 56 | 53 |
| Glx** | 63 | 64 | 73 |
| Pro | 46 | 50 | 47 |
| Gly | 69 | 64 | 66 |
| Ala | 48 | 41 | 48 |
| Val | 40 | 35 | 29 |
| Met | 17 | 12 | 13 |
| Ile | 37 | 29 | 24 |
| Leu | 60 | 52 | 48 |
| Tyr | 33 | 31 | 38 |
| Phe | 30 | 36 | 32 |
| ½ Cys | 11 | 15 | 13 |
| Trp | 8 | 11 | 17 |

* - Asx = Asn + Asp; ** - Glx = Glu + Gln

AO iš *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* ir *Torulopsis* aminorūgščių sudėtis ir jų kiekis subvienete yra pateikta 3 lentelėje. Didelių skirtumų tarp jų nėra. Alkoholoksidazėje iš *Pichia pastoris* kiek didesnis hidrofobinių aminorūgščių kiekis, ypač metionino [2].

Buvo nustatyta, kad visose AO N galinė aminorūgštis yra alaninas. Automatinio sekvenavimo, panaudojant Edmano degradaciją, rasta N galo aminorūgščių seka: Ala-Ile-Pro-Glu-Asp-Ile-Leu-Val-Leu-Gly- [2]. *Hansenula polymorpha* fermento C galo aminorūgščių seka: -Val-Thr-Ala-Phe. Fermento iš *Hansenula polymorpha* ir *Torulopsis* aminorūgščių sudėtis panaši, tik vienas pagrindinis skirtumas yra triptofano kiekis [15].

```

AOX1 MAIPEEFDILVLGGGSSGSC IAGRLANLDHSLKVG LIEAGENLNPNPWVYLPGIYPRNMK 60
AOX2 MAIPEEFDILVLGGGSSGSC IAGRLANLDHSLKVG LIEAGENLNPNPWVYLPGIYPRNMK 60
*****
AOX1 LDSKTASFYTSNPSPHLNGRRRAIVP CANVLGGGSS INFMMYTRGS ASDYDDFQAE GWRTK 120
AOX2 LDSKTASFYTSNPSPHLNGRRRAIVP CANILGGGSS INFMMYTRGS ASDYDDFEAE GWRTK 120
*****:*****:*****
AOX1 DLLPLMKKTETYQRA CNMPE IHGFE GPIKVS FGNYYTPVC QDFLRASESQGIPYVDDLED 180
AOX2 DLLPLMKKTETYQRA CNMPE IHGFE GPIKVS FGNYYTPVC QDFLRATESQGIPYVDDLED 180
*****:*****:*****
AOX1 LVTAHGAEHWLKW INRDTGRRSDSAHAFVHSTMRNHDNLY LICNTKVDKI IVEDGRAAAV 240
AOX2 LVTAHGAEHWLKW INRDTGRRSDSAHAFVHSTMRNHDNLY LICNTKVDKI IVEDGRAAAV 240
*****
AOX1 RTVPSKPLMPKPKPSHKIYRARKQIVLSCGT ISSPLVLQRS GFGDP IKLRAAGVKPLVNL P 300
AOX2 RTVPSKPLMAKPKPTHKVYRARTQIVLSCGT ISSPLVLQRS GFGDP IKLRAAGVKPLVNL P 300
*****.***:***:*****.*****
AOX1 GVGGRNFQDHYC FFSPIRIKPQYESFDDFVRGDAEI QKRQVFDQWYANGTGPLATNG IEAGV 360
AOX2 GVGGRNFQDHYC FFSPIRIKPQYESFDDFVRGDANI QKQVFDQWYANGTGPLATNG IEAGV 360
*****:***:*****
AOX1 KIRPTPEELSQMDES FQEGYREYFEDKPKD PVMHY SIIAGFFGDHTKIPP GK YMTMFHFL 420
AOX2 KIRPTPEELSQMDES FQEGYREYFEDKPKD PVMHY SIIAGFFGDHTKIPP GK YMTMFHFL 420
*****
AOX1 EYPFSRGS IHI TSPD PYAAPDFDPG FMNDE RDMAPMVWAYKKSRE TARRMDHFAGEVTSH 480
AOX2 EYPFSRGS IHI TSPD PYATPDFDPG FMNDE RDMAPMVWSYKKSRE TARKMDHFAGEVTSH 480
*****:*****:*****
AOX1 HPLFPYSSEARALEMD LETSNAYGG PLNLSAGLAHGSWTQ PLKKPTAKNE GHVTSNQVEL 540
AOX2 HPLFPYSSEARAYEMD LETSNAYGG PLNLTAGLAHGSWTQ PLKKPAGRNE GHVTSNQVEL 540
*****:*****:*****
AOX1 HPDIEYDEEDDKAIE NYIREHTETTWHCLGTCSIG PREGSKIVKWGGVLDHRSNVYGVKG 600
AOX2 HPDIEYDEEDDKAIE NYIREHTETTWHCLGTCSIG PREGSKIVKWGGVLDHRSNVYGVKG 600
*****
AOX1 LKVGDL SVCPDNVGCNTYTT ALLIGEK TATLVGED LGYSGEALDMTVPQFKLGTYEKTGL 660
AOX2 LKVGDL SVCPDNVGCNTYTT ALLIGEK TATLVGED LGYTGEALDMTVPQFKLGTYEKTGL 660
*****:*****
AOX1 ARF 663
AOX2 ARF 663
***

```

2 pav. AOX1 ir AOX2 genų sekų palyginys

Mielių *Pichia pastoris* genomą sudaro du AO genai: AOX1 ir AOX2. Bet tik AOX1 genas yra atsakingas už didžiąją dalį alkoholoksidazės aktyvumo ląstelėje [3]. Sekvenavimo analizės parodė, kad kiekvienas genas koduoja panašius baltymus iš 663 aminorūgščių. Šių baltymų aminorūgščių sekos turi 97 % homologiją [16].

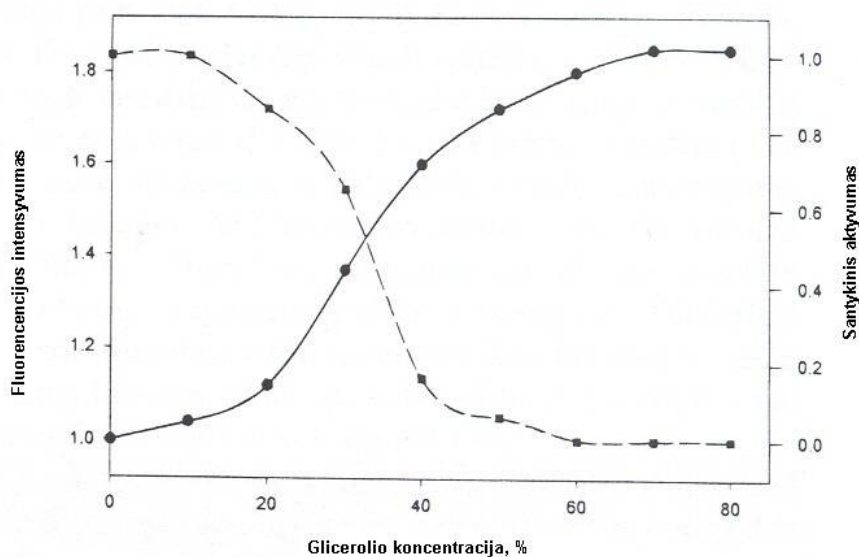
Naudojantis ClustalW programa [8], sulygininti abu AO genai (2 pav.). Pateikti rezultatai rodo, kad abu genai yra panašūs (identiškas yra 97 %, o panašumas – 99 %).

Pateiktame palyginyje papildomi įrankiai surasti:

- ✓ konservuoti rajonai pažymėti simboliais “*”, “:” ir “.”;
- ✓ **žalia** spalva pažymėtos polinės aminorūgštys;
- ✓ **mėlyna** – neigiamai įkrautos aminorūgštys;
- ✓ **raudona** – hidrofobinės aminorūgštys;
- ✓ **rožinė** – teigiamai įkrautos aminorūgštys.

1.4.3 FAD – AO prostetinė grupė

AO oksidacinę funkciją atlieka kofaktorius flavinadenindinukleotidas (FAD). Oksiduojantis alkoholiui, kofaktorius pereina į redukuotą formą FADH₂, kuri grįžta į FAD reaguodama su molekulinio deguonimi (1 pav.).



3 pav. Fermentinio aktyvumo (●) ir Trp fluorescencijos emisijos (■) kitimai, inkubuojant natyvę AO iš *Pichia pastoris*, turinčią FAD, 2 val. 37°C temperatūroje skirtingomis glicerolio koncentracijoms [1]

Fluorescenciniai tyrimai parodė, kad Trp (triptofanas) ir FAD yra tinkami žymekliai AO konformacijos ir oligomerinės būsenos tyrimams. Buvo nustatyta tiesioginė priklausomybė tarp AO oktamerų ir Trp fluorescencinės išeišos padidėjimo ir vidutinė fluorescencijos pusėjimo trukmė [1]. Remiantis aminorūgščių seka, AO (*Hansenula polymorpha*) turi 9 Trp ir 31 Tyr liekanas, o homologinė AO iš *Pichia pastoris* turi 8 Trp ir 33 Tyr liekanas. Nustatyta, kad, didinant glicerolio

koncentraciją, didėja Trp fluorescencija, paraleliai mažėja AO aktyvumas. Abu procesai baigiasi, kai glicerolio koncentracija pasiekia 60 % (3 pav.). Taigi egzistuoja tiesinė koreliacija tarp fermento inaktyvacijos ir Trp fluorescencijos didėjimo. Autorių nuomone, tai vyksta dėl AO oktamerų disociacijos į subvienetus. Glicerolio koncentraciją padidinus iki 80 % AO oktamerai disocijuoja į subvienetus ir įvyksta drastiški pasikeitimai antrinėje fermento struktūroje [1].

1.4.4 Alkoholoksidazių pI reikšmės

Alkoholoksidazių, išskirtų iš įvairių mielių rūšių, izoelektrinių taškų reikšmės pateiktos 4 lentelėje.

4 lentelė. AO pI reikšmės

| Mielių rūšis | pI | Literatūra |
|-------------------------------|-----|------------|
| <i>Candida methanosorbosa</i> | 4,3 | [20] |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 6,2 | [2] |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 6,1 | [32] |
| <i>Pichia pastoris</i> | 6,3 | [2] |

1.4.5 Alkoholoksidazių aktyvumo pH optimumas

Alkoholoksidazių, išskirtų iš įvairių mielių rūšių, pH optimumai pasislinkę į šarminę pusę nuo pH 7,0 (5 lentelė).

5 lentelė. AO pH optimumai

| Mielių rūšis | AO pH optimumai | Literatūra |
|-----------------------------|-----------------|------------|
| <i>Pichia sp.</i> | 9,0 | [18] |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 8,5 | [2] |
| <i>Candida sp.</i> | 7,5 | [14] |
| <i>Pichia pastoris</i> | 7,5 | [2] |
| <i>Candida boidinii</i> | 7,5 | [20] |

AO iš *Hansenula polymorpha* pH optimumas skirtingose gryninimo stadijose skirtingas: pačiose mielių ląstelėse 8,5 [2], kai AO yra peroksisomų matricose – 6,0, o kai AO yra išvalyta – 5,5 [25]. Nustatyti ir aktyvumo pH intervalai (6 lentelė).

6 lentelė. AO aktyvumo pH intervalai

| Mielių rūšis | pH intervalai | Literatūra |
|-----------------------------|---------------|------------|
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 6,7 – 9,8 | [2] |
| <i>Pichia pastoris</i> | 6,5 – 8,3 | [2] |
| <i>Pichia sp.</i> | 6,0 – 10,0 | [18] |

Dideli pH svyravimai į rūgštinę ar šarminę pusę sukelia AO aktyvumo kritimą.

1.4.6 Alkoholoksidazių aktyvumo temperatūrinis optimumas

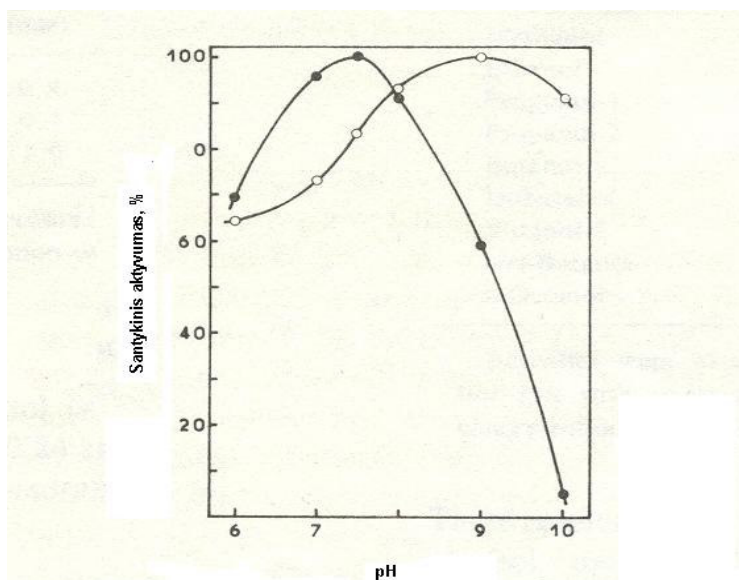
Nustatyti temperatūriniai optimumai svyruoja nuo 25 iki 45°C (7 lentelė). Tai atspindi gana žemą AO temperatūrinį stabilumą. Daugumai fermentų temperatūriniai optimumai aukštesni.

7 lentelė. AO temperatūrinis optimumas

| Mielių rūšis | Temperatūrinis optimumas, °C | Literatūra |
|-------------------------------|------------------------------|------------|
| <i>Candida sp.</i> | 37,5 | [21] |
| <i>Pichia pastoris</i> | 37,0 | [2] |
| <i>Candida boidinii</i> | 30,0 | [20] |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 45,0 | [2] |
| <i>Candida methanosorbosa</i> | Nuo 25,0 iki 37,0 | [24] |

1.4.7 Alkoholoksidazių pH stabilumas

Alkoholoksidazių stabilumas labai priklauso nuo pH. Nustatyta, kad AO iš *Pichia pastoris* stabiliausia, esant pH 7,0. Virš pH 9,0 fermentas inaktyvuojasi, rūgštiniame pH jis taip pat nėra stabilus (4 pav.) [2]. AO iš *Candida boidinii* stabilus, esant pH 7,0 [20], žemiau pH 6,5 aktyvumas mažėja [4]. Kai pH 6,0 AO iš *Candida sp.* stabilus tik 45 min. [21]. AO iš *Hansenula polymorpha* stabiliausia, esant pH 8,0 (4 pav.) [2].



4 pav. AO pH stabilumas:

●—● - AO iš *Pichia pastoris*, ○—○ - AO iš *Hansenula polymorpha* [2]

1.4.8 Alkoholoksidazių temperatūrinis stabilumas

Alkoholoksidazių, išskirtų iš įvairių mielių rūšių, temperatūrinis stabilumas pateikta 8 lentelėje. Stabiliausi AO iš mielių *Hansenula polymorpha*.

8 lentelė. AO temperatūrinis stabilumas

| Mielių rūšis | Temperatūra, °C | pH | Komentarai | Literatūra |
|-----------------------------|-----------------|-----|-----------------------------------|------------|
| <i>Candida sp.</i> | 60 | 7,5 | Visa inaktyvacija po 10 min. | [21] |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 45 | 7,5 | 1 val. stabili | [25] |
| <i>Pichia pastoris</i> | 38 | 7,5 | 50 % aktyvumo sumažėja po 10 min. | [2] |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 38 | 7,5 | 50 % aktyvumo sumažėja po 10 min. | [2] |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 50 | 7,4 | 50 % aktyvumo sumažėja po 10 min. | [15] |
| <i>Torulopsis</i> | 43 | 7,4 | 50 % aktyvumo sumažėja po 10 min. | [15] |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 20 | 7,5 | 24 val. stabili | [25] |

1.4.9 Alkoholoksidazių laikymo sąlygos

Laikymo sąlygos, užtikrinančios AO bendrąjį stabilumą, pateiktos 9 lentelėje.

9 lentelė. AO laikymo sąlygos

| Mielių rūšis | Komentariai | Literatūra |
|-----------------------------|------------------------|------------|
| <i>Candida boidinii</i> | -20°C, stabili | [20] |
| <i>Candida boidinii</i> | 0°C, pH 6,5 – 8,5 | [4] |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | Stabilizuoja sacharozę | [25] |
| <i>Pichia pastoris</i> | Liofilizacija | [2] |

1.5 Alkoholoksidazių Michaelio konstantų reikšmės

Alkoholoksidazės yra gana lėtai veikiantys fermentai. Literatūroje nurodytas specifinis AO aktyvumas yra 2,8 – 23 U/mg baltymo (10 lentelė).

10 lentelė. AO specifinis aktyvumas

| Mielių rūšis | Specifinis aktyvumas, U/mg | Literatūra |
|-----------------------------|----------------------------|------------|
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 23,2 | [25] |
| <i>Pichia pastoris</i> | 11,9 | [2] |
| <i>Candida boidinii</i> | 10,9 – 4,5 | [20], [9] |
| <i>Pichia sp.</i> | 6,6 | [18] |
| <i>Candida sp.</i> | 2,8 | [15] |

11 lentelė. AO K_M reikšmės (substratas – metanolis, $[O_2]= 0,25$ mM)

| Mielių rūšis | K_M , mM | Literatūra |
|-----------------------------|------------|------------|
| <i>Candida boidinii</i> | 3,0 | [10] |
| <i>Pichia pastoris</i> * | 1,4 | [5] |
| <i>Pichia pastoris</i> ** | 3,1 | [5] |
| <i>Pichia sp.</i> | 0,5 | [2] |
| <i>Torulopsis</i> | 0,44 | [16] |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 0,23 | [16] |

*- esant O_2 koncentracijai 0,19 mM

** - esant O_2 koncentracijai 0,93 mM

K_M – Michaelio konstanta parodo fermento ir substrato giminingumą. Žinant K_M , galima numatyti, kaip vienomis ar kitomis sąlygomis funkcionuos fermentas, kaip parinkti optimalias substratų koncentracijas [10]. AO iš skirtingų mielių rūšių K_M reikšmės metanolii pateiktos 11 lentelėje.

1.6 Alkoholoksidazių substratinis specifiškumas

Paprastai alkoholoksidazės gerai oksiduoja metanolį, blogiau etanolį ir labai silpnai aukštesnius alkoholius iki aldehidų. Tačiau kai kurios mielių rūšys gamina specifiškesnes alkoholoksidazes, katalizuojančias aukštesniųjų alkoholių oksidaciją. Pavyzdžiui, AO iš *Torulopsis* ir *Hansenula polymorpha* buvo aktyvios (12 lentelė) metanolyje, etanolyje, 1-propanolyje, 1-butanolyje, 2-propen-1-olyje, 2-buten-1-olyje, 2-chloretanolyje ir 2-brometanolyje, bet neaktyvios alkoholiuose, turinčiuose alkilinę grandinę ilgesnę nei C_5 , antriniuose, tretiniuose ir aromatinuose alkoholiuose [15].

12 lentelė. AO iš *Torulopsis* ir *Hansenula polymorpha* substratinis specifiškumas

| Substratas | Santykiniis oksidacijos reakcijos greitis, % | |
|-----------------|--|-----------------------------|
| | <i>Torulopsis</i> | <i>Hansenula polymorpha</i> |
| Metanolis | 100 | 100 |
| Etanolis | 96,0 | 49,8 |
| 1-Propanolis | 79,0 | 44,2 |
| 1-Butanolis | 69,1 | 31,9 |
| 2-Propen-1-olis | 89,3 | 49,2 |
| 2-Buten-1-olis | 72,8 | 38,5 |
| 2-Chloretanolis | 71,4 | 37,7 |

pH 7,4, 30° temperatūroje, substrato koncentracija 3,5 mM

Valyta AO iš *Pichia sp.* panaudota pirminių alkoholių (nuo C_1 iki C_6) oksidacijai katalizuoti (13 lentelė). Fermento aktyvumas mažėja, didėjant alkilinės grandinės ilgiui [18].

Buvo pastebėta, kad AO iš *Hansenula polymorpha*, *Torulopsis* ir *Candida boidinii* katalizuoja formaldehido oksidaciją, tačiau aktyvumas yra 1/10, palyginti su metanolii. AO iš *Pichia sp.* taip pat katalizuoja formaldehido oksidaciją (santykiniis oksidacijos greitis – 15 %). Formaldehido oksidacija priklauso nuo formaldehido hidratacijos (99 %) vandens tirpale [18].

13 lentelė. AO iš *Pichia sp.* substratinis specifiškumas

| Substratas | Santykinis oksidacijos reakcijos greitis, % |
|-----------------------|---|
| Metanolis | 100 |
| Etanolis | 92 |
| 1-Propanolis | 74 |
| 1-Butanolis | 52 |
| 1-Pentanolis | 30 |
| 1-Heksanolis | 4 |
| 2-Chloretanolis | 70 |
| 3-Chloro-1-propanolis | 22 |
| 4-Chloro-1-butanolis | 11 |
| 2-Merkaptoetanolis | 25 |
| 2-Metoksietanolis | 15 |
| 2-Metil-1-butanolis | 22 |
| Izobutanolis | 2 |

pH 7,0, 30° temperatūroje, substrato koncentracija 100 μmol

Tyrinėjant mieles *Candida boidinii* pastebėta, kad vykdant etanolio oksidaciją ir mažinant pH, reakcijos greitis žymiai sumažėja, palyginti su metanolio oksidacija. Fermento aktyvumas nepriklauso nuo fosfatinio buferinio tirpalo molinės koncentracijos intervalu 0,05-0,5 M [30]. *Candida boidinii* S2 atveju buvo tirtas substratų specifiškumas AO-azido kompleksui (14 lentelė).

14 lentelė. *Candida boidinii* AO komplekso su azidu substratinis specifiškumas

| Substratas | Santykinis oksidacijos reakcijos greitis, % |
|-----------------|---|
| Metanolis | 100 |
| Etanolis | 75 |
| n-Propanolis | 32 |
| Alilo alkoholis | 45 |
| Formaldehidas | 27 |
| Acetaldehidas | 5 |

pH 7,5, 30° temperatūroje, substrato koncentracija 5 mM

Azidas surištas greta AO katalitinio centro [22]. Be to, didelis kiekis azido alkoholoksidazę veikia kaip inhibitorius [30].

AO iš *Candida boidinii* katalizuojamos alkoholių oksidacijos greičiai parodyti 15 lentelėje [21].

15 lentelė. AO iš *Candida boidinii* substratinis specifiškumas

| Substratas | Santykinis oksidacijos reakcijos greitis, % |
|-------------------|---|
| Metanolis | 100 |
| Etanolis | 75 |
| n-Propanolis | 25 |
| Izopropanolis | 5 |
| n-Amilo alkoholis | 15 |
| Alilo alkoholis | 65 |

pH 7,0, 30° temperatūroje, substrato koncentracija 5 mM

2. EKSPERIMENTINĖ DALIS

2.1 MEDŽIAGOS IR APARATŪRA

2.1.1 Medžiagos

L-D-Gliukozė, SIGMA, Mr = 180,2; C₆H₁₂O₆

Peptonas, MERCK

Agar – agaras, ROTH

YNB (Yeast Nitrogen Base) – mielių ekstraktas be aminorūgščių ir amonio sulfato, AMRESCO

Amonio sulfatas, SIGMA, Mr = 132,13; (NH₄)₂SO₄

Glicerolis, ROTH, Mr = 92,11; d²⁰ = 1,256-1,261 g/cm³, C₃H₈O₃

Biotinas (vit. H), FLUKA, Mr = 244,32; C₁₀H₁₆N₂O₃S

Metanolis, SIGMA, Mr = 32,04; d²⁰ = 0,79 g/cm³; CH₃OH

Kalio šarmas, MERCK, Mr = 56,11; KOH

Kalio dihidrofosfatas, MALLINCKROD, Mr = 136,13; KH₂PO₄

Mielių ekstraktas, ROTH

Natrio šarmas, MERCK, Mr = 40; NaOH

β - Merkaptoetanolis, FLUKA, Mr = 78,13; d²⁰ = 1,115 g/cm³; HSCH₂CH₂OH

Fenilmetilsulfonilfluoridas, SERVA, Mr = 174,2; C₇H₇FO₂S

Etanolis 96%, PEAXИM, Mr = 46,07; C₂H₅OH

Fosforo rūgštis 85%, FLUKA, Mr=98; d²⁰ = 1,70 g/cm³; H₃PO₄

Natrio chloridas, PEAXИM, Mr =58,5; NaCl

Druskos rūgštis, 37%, MERCK, Mr = 36,5; d²⁰ = 1,185 g/cm³; HCl

Formaldehidas, 10,3%, Vilniaus Universiteto vaistinė, Mr =30; d¹⁸ = 1,029 g/cm³; HCOH

Amonio acetatas, SIGMA, Mr = 77,08; CH₃COONH₄

Acto rūgštis,99,8%, PENTA, Mr = 60,05; d²⁰ = 1,12 g/cm³; CH₃COOH

Acetilacetonas, MERCK, Mr = 100,12 ; d²⁰ = 0,97 g/cm³; CH₃COCH₂COCH₃

DEAE (dietilaminoetil) – Sefarozė Fast Flow, PHARMACIA FINE CHEMICALS

Santykinės molekulinės masės standartai: žinomos molekulinės masės baltymų intervalas 14,4 – 116 kDa, FERMENTAS

Boro rūgštis, PEAXИM, Mr = 61,83; H₃BO₃

1,3,5 – triakriloil – heksahidro – s – triazinas, susintetintas BTI ,Mr = 250; C₁₂H₁₅O₃N₃

Natrio tetraboratas, PEAXИM, Mr = 381,37; Na₂B₄O₇·10H₂O

Karbamidas, FLUKA, Mr = 60,06; NH₂CONH₂

Poliuretaninis nešiklis, susintetintas VUCHF, Polimerų chemijos katedroje

Modifikuotas chitozanas, susintetintas VUCHF, Polimerų chemijos katedroje

Glutaro aldehidas (pentan-1,5-dialis), 25%, SERVA, Mr = 100,1g/mol; T_{lyd} = 329,5 K; d²⁰ = 1062 kg/m³; C₅H₈O₂

2.1.2 Aparatūra

Centrifuga "Beckman"

Centrifuga "Eppendorf"

Kompiuterinės programos: *MS Word, MS Excel, MS Power Point, Origin 6.0, SigmaPlot 8.0, Paint, Acrobat Reader.*

Kompiuteris "Low Radiation"

Magnetinė maišyklė "MM-5"

Pastovios srovės elektroforezės šaltinis (0-500mA, 0-250 V)

pH-metras "MP220"

Skaneris "SHIMAZDU CS - 930"

Spausdintuvas "Ip Laser Jet 2200"

Spektrofotometras "CΦ-46"

Svarstyklės "SARTORIUS N-2024 MP"

Vandens termostatas "JASCO TC-100"

Vertikaliuos elektroforezės aparatas "BIOMETRA"

Ultragarsinis dezintegratorius „УЗДН-2Т“

Šaldymo kamera +4°C „Cold-Box“

Peristaltinis siurblys „2120-Varioperpex“

UV-monitorius bei dvikanalis saviraštis „2210 Recorder“

2.1.3 Tirpalai

2.1.3.1 Buferinis tirpalas A (1 M KH_2PO_4 , pH 6,0)

12,76 g KH_2PO_4 ištirpinama 80 ml distiliuoto vandens. Lašinama 1 M KOH tirpalo, kol pH tampa 6,0. Tirpalas supilamas į 100 ml matavimo kolbutę ir skiedžiama distiliuotu vandeniu iki brūkšnio.

2.1.3.2 Ardymo buferinis tirpalas (0,1 M KH_2PO_4 , pH 8,0, 100 mM β – ME, 50 mM

NaCl, 1 mM PMSF)

13,61 g KH_2PO_4 ištirpinama 80 ml distiliuoto vandens. Lašinama 1 M NaOH tirpalo, kol pH tampa 8,0. Tirpalas supilamas į 100 ml matavimo kolbutę ir skiedžiama distiliuotu vandeniu iki brūkšnio. Prieš naudojimą įpilama β – ME (781 μl), 50 mM NaCl (0,29 g), 1 mM PMSF (1 ml 100 mM).

2.1.3.3 Buferinis tirpalas B (30 mM KH_2PO_4 , pH 7,5, 5 mM β – ME)

4,08 g KH_2PO_4 ištirpinama 800 ml distiliuoto vandens. Lašinama 1 M NaOH tirpalo, kol pH tampa 7,5. Tirpalas supilamas į 1000 ml matavimo cilindrą ir skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1000 ml. Prieš naudojimą įpilama β – ME (391 μl).

2.1.3.4 Buferinis tirpalas C (30 mM KH_2PO_4 , pH 7,5)

4,08 g KH_2PO_4 ištirpinama 800 ml distiliuoto vandens. Lašinama 1 M NaOH tirpalo, kol pH tampa 7,5. Tirpalas supilamas į 1000 ml matavimo cilindrą ir skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1000 ml.

2.1.3.5 Buferinis tirpalas D (30 mM KH_2PO_4 , pH 6,5)

4,08 g KH_2PO_4 ištirpinama 800 ml distiliuoto vandens. Lašinama 1 M NaOH tirpalo, kol pH tampa 6,5. Tirpalas supilamas į 1000 ml matavimo cilindrą ir skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1000 ml.

2.1.3.6 Buferinis tirpalas E (30 mM KH_2PO_4 , pH 6,0)

4,08 g KH_2PO_4 ištirpinama 800 ml distiliuoto vandens. Lašinama 1 M NaOH tirpalo, kol pH tampa 6,0. Tirpalas supilamas į 1000 ml matavimo cilindrą ir skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1000 ml.

2.1.3.7 Briton – Robson (universalusis) buferinis tirpalas

Gaminami 0,04 M acto, fosforo ir boro rūgšties tirpalai, kurie po to sumaišomi vienodais tūrio santykiais. Reikiamo pH (5÷11) buferiniai tirpalai gaunami, pasigaminantą rūgščių mišinį titruojant 1 M NaOH [29].

2.1.3.8 Buferinis tirpalas F (50 mM borato, pH 9,2, 3 M karbamidas)

1 L distiliuoto vandens ištirpinama 19,07 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Ir jame ištirpinama 180,18 g karbamido.

2.1.3.9 Buferinis tirpalas G (0,1 M KH_2PO_4 , pH 7,5)

13,61 g KH_2PO_4 ištirpinama 800 ml distiliuoto vandens. Lašinama 1 M NaOH tirpalo, kol pH tampa 7,5. Tirpalas supilamas į 1000 ml matavimo cilindrą ir skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1000 ml.

2.1.3.10 Biotinas (0,00004%)

1 L distiliuoto vandens ištirpinama 0,04 g biotino. Gautą tirpalą reikia skiesti 1000 kartų.

2.1.3.11 Substrato tirpalas (ST)

Gaminamas 3% (svorio %) metanolio tirpalas buferiniame tirpale.

2.1.3.12 Reagento tirpalas formaldehido nustatymui (RT)

Į 250 ml talpos matavimo kolbą dedama 37,5 g amonio acetato, 0,75 ml koncentruotos acto rūgšties, 0,5 ml acetilacetono. Medžiagos tirpinamos, praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 250 ml bendro tūrio [17].

2.1.4 Terpės

2.1.4.1 YEPD terpė

150 ml terpės gamybai imama 3 g gliukozės, 3 g peptono, 1,5 g mielių ekstrakto, 3 g agar – agaro [19].

2.1.4.2 Buferinta minimali glicerolio terpė

300 ml terpės gamybai imama 30 ml buferinio tirpalo A (2.1.3.1 metodika), 0,4 g YNB, 3 g glicerolio, 3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 ml biotino tirpalo (2.1.3.10 metodika). Gautą tirpalą supilama į 2 L kūginę kolbą [19].

2.1.4.3 Buferinta minimali metanolio terpė

300 ml terpės gamybai imama 30 ml buferinio tirpalo A (2.1.3.1 metodika), 0,4 g YNB, 0,5 % metanolio, 3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 ml biotino tirpalo (2.1.3.10 metodika). Gautą tirpalą supilama į 2 L kūginę kolbą [19].

2.2 TYRIMO METODAI

2.2.1 Mielių *Pichia pastoris* auginimo metodika

Mielių kultūra *Pichia pastoris* "atgaivinama" pasėjant YEPD terpėje (2.1.4.1 terpė) ant Petri lėkštelių, auginama 72 val. 30°C temperatūroje.

Po 72 val. mielės perkeliama į buferintą minimalią glicerolio terpę (2.1.4.2 terpė). Kultūra auginama purtyklėje 24 val. 30°C temperatūroje. Po 24 val. mielės centrifuguojamos (4000 aps./min.), ląstelės dekantuojamos ir suspenduojamos buferintoje minimalioje metanolio terpėje (2.1.4.3 terpė). Auginama purtyklėje 48 val. 30°C temperatūroje. Metanolio dedama po 0,5 % kas 12 val.. Ląstelės po 48 val. nucentrifuguojamos, plaunamos steriliu vandeniu, kad būtų pašalinti terpių likučiai, po to vėl centrifuguojamos. Vandeninė terpė dekantuojama, ląstelės užšaldomos.

Kad nebūtų užkrėtimo pašaliniais mikroorganizmais, visos terpės ir indai turi būti sterilūs, tam jie sterilizuojami autoklavuose. Užsėjama steriliose sąlygose (per liepsną, mikrobiologiniame bokse).

2.2.2 Fermento alkoholoksidazės (AO) išskyrimas ir gryninimas

2.2.2.1 Mielių *Pichia pastoris* ląstelių ardymo metodika

2.2.2.1.1 Nedidelio biomasės kiekio ardymas

1 g ląstelių biomasės užpilama 4 ml ardymo buferinio tirpalo (2.1.3.2 tirpalas) ir 5 ml stiklo rutuliukų (skersmuo 450 – 500 µm). Ardoma maišikliniu kratytuvu 0,5 min., po to 0,5 min. šaldoma ledo vonioje. Operacijos trukmė 10 min. Tirpalas perkeliama į centrifuginius mėgintuvėlius. Centrifuguojama Ependorfo tipo centrifuga 11000 aps./min. 10 min., temperatūra - +4°C. Tirpalas atsargiai nupilamas ir naudojamas tyrimams.

2.2.2.1.2 Didesnio biomasės kiekio ardymas

6 g ląstelių biomasės užpilama 30 ml ardymo buferinio tirpalo (2.1.3.2 tirpalas). Masė homogenizuojama Poterio homogenizatoriumi iki vienalytiškumo ir gauta suspensija 60 min. maišoma ant magnetinės maišyklės +4°C temperatūroje. Homogenizuota ląstelių suspensija,

pridėjus 40 ml stiklo rutuliukų (skersmuo 450-500 μm), ardoma ultragarsiniu dezintegratoriumi (22 kHz) šaldant ledo vonioje. Dezintegratoriumi ardoma 1 min., po to daroma 1 min. pertrauka, kad tirpalas atvėstų. Tokia procedūra kartojama 15 kartų. Gautas tirpalas nupilamas, stiklo rutuliukai praplaunami nedideliu kiekiu ardymo buferiniu tirpalu ir sumaišomas su tuo pačiu tirpalu. Susidariusios ląstelių membranų nuolaužos ir netirpūs baltymai atskiriami lizatai centrifuguojant 19.000 aps/min. greičiu 35 min.

2.2.2.2 Pašalinių baltymų nusodinimas amonio sulfatu

Pašaliniai baltymai nusodinami į pirminį baltyminį ekstraktą pridėdant amonio sulfato iki galutinės koncentracijos 40 %. Reikalingas amonio sulfato kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$m = \frac{0,515 \cdot V \cdot (C_2 - C_1)}{1 - 0,272 \cdot C_2} \quad [],$$

kur m – amonio sulfato masė, g,

V – pirminio ekstrakto tūris, ml,

C_1 – pradinė amonio sulfato koncentracija (0), %

C_2 – galutinė amonio sulfato koncentracija (40), %

Druska pilama į pirminį baltyminį ekstraktą mažomis porcijomis intensyviai maišant. Supylus visą druską, dar maišoma ~ 60 min. ant magnetinės maišyklės +4°C temperatūroje, po to centrifuguojama 19000 aps./min. 35 min. Centrifugatas dializuojamas prieš buferinį tirpalą B (2.1.3.3 tirpalas) +4°C temperatūroje per naktį.

2.2.2.3 Jonų mainų chromatografija

Jonų mainų chromatografijoje naudojama kolonėlė 1,6 x 20 cm, kuri yra užpildyta DEAE – Sefarozės sorbentu. Kai sudaroma kolonėlės pusiausvyra buferiniu tirpalu B (2.1.3.3 tirpalas), kurio greitis 80 ml/val., pasitelkus peristaltinį siurbli, įvedamas baltymas. Nesisorbavę baltymai iš kolonėlės išplaunami praleidžiant 10 kolonėlės tūrių tuo pačiu buferiniu tirpalu B. Sorbuotas baltymas desorbuojamas linijiniu NaCl koncentracijos gradientu nuo 0 M iki 0,5 M. Iš kolonėlės išplaunami baltymai renkami į frakcijas. Gautos frakcijos analizuojamos baltymų elektroforezės metodu, baltymo koncentracija nustatoma Bradfordo metodu ir nustatomas fermentinis aktyvumas. Remiantis elektroforezės duomenimis, sujungiamos tos frakcijos, kuriose yra tikslinio baltymo. Baltymas buvo pakankamai grynas, todėl jis išpilstomas ir laikomas -20°C tolesniems darbams.

2.2.3 Baltymų analizė

Baltymų koncentracijos tirpaluose buvo nustatomos Bradfordo metodu, naudojant dažą Kumasi Briliantinis Mėlynasis G-250 pagal metodiką pateikta literatūroje [12].

Baltymų elektroforezė buvo atliekama 12 % poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis pagal Leammli metodiką [12]. Molekulinių masių standartais buvo naudojamas žinomos molekulinės masės baltymų intervalas 116.000 – 14.400 kDa: β -galaktozidazė (116.000 kDa), jaučio serumo albuminas (66.200 kDa), ovalbuminas (45.000 kDa), laktatdehidrogenazė (35.000 kDa), restrikcijos endonukleazė Bsp 981 (25.000 kDa), β -laktoglobulinas (18.400 kDa), lizocimas (14.400 kDa).

2.2.4 Alkoholoksidazės aktyvumo nustatymo metodika

2.2.4.1 Kalibracinio grafiko gavimas

Ruošiami 0,1 – 0,5 $\mu\text{mol/ml}$ koncentracijų formaldehido tirpalai, analizei imama po 0,5 ml kiekvienos koncentracijos formaldehido tirpalo ir 3 ml reagento tirpalo formaldehido nustatymui (2.1.3.12 tirpalas). Mėgintuvėliai laikomi termostate 40 min. 37°C temperatūroje. Spektrofotometru matuojama absorbcija, kai bangos ilgis $\lambda = 412 \text{ nm}$. Į kontrolinį mišinį vietoje formaldehido dedama 0,5 ml buferinio tirpalo. Išmatavus žinomos koncentracijos formaldehido tirpalų sugėrtį, brėžiamas optinio tankio priklausomybės nuo formaldehido koncentracijos grafikas. Gaunama tiesės lygtis $y = ax$, kur y – tirpalo optinis tankis, x – formaldehido koncentracija ($\mu\text{mol/ml}$), a – koeficientas (polinkio kampo tangentas). Pagal šią lygtį apskaičiuojama formaldehido koncentracija tirpale.

2.2.4.2 Fermento aktyvumo nustatymas

Fermento aktyvumas nustatomas į mėgintuvėlius įpylus po 0,5 ml fermento tirpalo ir 1,5 ml substrato tirpalo (2.1.3.11 tirpalas). Į kontrolinį tirpalą vietoje fermento dedama 0,5 ml buferinio tirpalo. Mėgintuvėliai laikomi termostate 15 min., 30°C temperatūroje. Reakcija stabdoma, pridedant 140 μl 4 N HCl. Susidaręs formaldehido kiekis nustatomas pagal 2.2.4.1 metodiką.

Fermento aktyvumo vienetas – tai toks fermento kiekis, kuris nurodytose sąlygose (30 °C, 15 min.) oksiduoja 1 μmol substrato (metanolio) į formaldehidą per 1 minutę.

Specifinis aktyvumas – tai fermento aktyvumo vienetų skaičius viename mg baltymo (U/mg).

$$\text{Specifinis aktyvumas} = \frac{c_F \cdot V_B}{t \cdot c_B \cdot V_2},$$

Kur c_F – susidariusio formaldehido koncentracija, μmol/ml;

V_B – reakcijos bendras tūris, ml;

t – reakcijos trukmė, min.;

c_B – baltymo koncentracija, mg/ml;

V_2 – reakcijai paimto fermento tūris, ml.

2.2.5 pH optimumo nustatymas

AO pH optimumas nustatomas universaliajame buferiniame tirpale (2.1.3.7 tirpalas). Fermentinis aktyvumas matuojamas įprastomis sąlygomis (2.2.4.2 metodika), tik čia naudojami substrato paruošimui skirtingų pH (5÷11) reikšmių buferiniai tirpalai.

2.2.6 pH stabilumo nustatymas

AO pH stabilumas nustatomas pH privedant iki reikiamos reikšmės (5÷11). Mišinys laikomas kambario temperatūroje 30 min. ir matuojamas aktyvumas pagal 2.2.4.2 metodiką, kai ST – buferinis tirpalas G (2.1.3.9 tirpalas).

2.2.7 Temperatūrinio optimumo nustatymas

AO fermentinis aktyvumas matuojamas įprastomis sąlygomis (2.2.4.2 metodika), tik vietoje standartinės 30°C temperatūros, aktyvumas nustatomas 23–70°C temperatūrų intervale, kas 10°C.

2.2.8 Temperatūrinio stabilumo nustatymas

AO fermentinis aktyvumas matuojamas įprastomis sąlygomis (2.2.4.2 metodika), tik prieš reakciją fermento tirpalas 30 min. termostatuojamas pasirinktoje temperatūroje ($23 \pm 70^\circ\text{C}$).

2.2.9 Oligomerinės struktūros tyrimas

0,014 mM baltymas buferiniame tirpale F (2.1.3.8 tirpalas) inkubuojamas 5 min., 30°C , tuomet įpilama TAT tirpalo iki 1,5 mM koncentracijos. Reakcijos mišinys inkubuojamas 30°C , ir mėginiai analizei imami po 0,5, 5, 15, 30, 60, 120 ir 180 min. Reakcija stabdoma, parūgštinant pavyzdžius iki pH 5,0 5 % acto rūgštimi. Susiūtų formų identifikacijai atliekama elektroforezė 6 % NaDS – PAGE.

2.2.10 AO imobilizacija

2.2.10.1 AO imobilizavimas ant poliuretaninio nešiklio

Kūginėje kolbutėje 1 g drėgno, ką tik pagaminto poliuretaninio nešiklio užpilama 3,9 ml AO buferiniame tirpale E (2.1.3.6 tirpalas). Imobilizacija vykdoma 30 min. maišant mechanine maišykle 40°C temperatūroje (vandens termostate). Po to dedama į šaldytuvą ir laikoma per naktį. Imobilizuotas fermentas (IP) filtruojamas stiklo filtru, praplaunamas buferiniu tirpalu C (2.1.3.4 tirpalas) ir laikomas šaldytuve ($+4^\circ\text{C}$), užpylus tuo pačiu buferiu. Taip pat išmatuojamas filtrato, gauto po fermento imobilizacijos, tūris, baltymo koncentracija (2.2.3 metodika) bei fermentinis aktyvumas (2.2.4.2 metodika).

2.2.10.2 AO imobilizavimas ant modifikuoto chitozano

Į 50 ml 1 % modifikuoto chitozano suspensijos įpilama 0,42 ml 25% glutaro aldehido tirpalo. Reakcijos mišinys maišomas 30 min. 50°C temperatūroje. Gautos susiūtos ir aktyvuotos modifikuoto chitozano mikrosferos nufiltruojamos, plaunamos dideliu vandens kiekiu, po to buferiniu tirpalu D (2.1.3.5 tirpalas).

Kūginėje kolbutėje 1 g drėgno, ką tik pagaminto aktyvuoto nešiklio užpilama 8,0 ml AO buferiniame tirpale D. Imobilizacija vykdoma 30 min. maišant mechanine maišykle 40°C temperatūroje (vandens termostate). Po to dedama į šaldytuvą ir laikoma per naktį. Imobilizuotas

fermentas (IP) filtruojamas stiklo filtru, praplaunamas buferiniu tirpalu C (2.1.3.4 tirpalas) ir laikomas šaldytuve (+4°C), užpylus tuo pačiu buferiniu tirpalu. Taip pat išmatuojamas filtrato, gauto po fermento imobilizacijos, tūris, baltymo koncentracija (2.2.3 metodika) bei fermentinis aktyvumas (2.2.4.2 metodika).

2.2.11 Imobilizuotos AO aktyvumo nustatymas

Imama 3 ml 3 % metanolio tirpalo ir 20 – 50 mg drėgno IP. Laikoma vandens termostate 15 min., 30°C temperatūroje, reakcijos mišinį maišant mechanine maišykle. Reakcija stabdoma, įdedant 0,210 ml 4 N HCl. Filtruojama ir pagal 2.2.4.1 metodiką filtrate nustatomas susidaręs formaldehido kiekis. Kontrolei imamas inaktyvuotas rūgštimi imobilizuotas fermentas. AO aktyvumas viename grame drėgno IP (U/g) apskaičiuojamas naudojantis formule:

$$\text{Aktyvumas} = \frac{c_F \cdot V_B}{t \cdot m};$$

kur: V_B – bendras reakcijos tūris, ml;

c_F – susidariusio formaldehido koncentracija, $\mu\text{mol/ml}$;

t – reakcijos trukmė, min.;

m – paimto reakcijai IP kiekis, g.

2.2.12 Imobilizuotos AO pH optimumo nustatymas

IP pH optimumas nustatomas naudojant 2.2.5 ir 2.2.11 metodikas.

2.2.13 Imobilizuotos AO pH stabilumo nustatymas

20 – 50 mg IP praplaunama 10 kartų skiestu buferiniu tirpalu C (2.1.3.4 tirpalas), užpilama 0,3 ml įvairių pH reikšmių universaliojo buferinio tirpalo (5÷11) (2.1.3.7 tirpalas) ir mišinys palaikomas 30 min., toliau IP aktyvumas nustatomas pagal 2.2.11 metodiką, kai ST – buferiniame tirpale G (2.1.3.9 tirpalas).

2.2.14 Imobilizuotos AO temperatūrinio optimumo nustatymas

IP temperatūrinis optimumas nustatomas naudojant 2.2.7 ir 2.2.11 metodikas.

2.2.15 Imobilizuotos AO temperatūrinio stabilumo nustatymas

Ant 20 – 50 mg IP yra užpilama 0,3 ml buferinio tirpalo C (2.1.3.4 tirpalas) ir mišinys laikomas 30 min. įvairiose temperatūrose ($30 \pm 70^{\circ}\text{C}$). Toliau IP aktyvumas nustatomas pagal 2.2.11 metodiką.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Mielių *Pichia pastoris* auginimas

Iš viso yra atlikta 10 mielių *Pichia pastoris* auginimų, panaudojant vienodą metodiką (2.2.1 metodika). Pirmiausia muziejinė mielių kultūra užsėjama ant agarizuotos YEPD terpės Petri lėkštelėje ir auginama termostate 30°C temperatūroje 72 val. Ši stadija vadinama atgaivinimu. Po 72 val. sterilia bakteriologine lazdele mielių ląstelės nuo YEPD terpės perkeliamos į 3 kolbas su minimalia buferinta glicerolio terpe, auginama purtyklėje 24 val. 30°C temperatūroje. Po paros ląstelės centrifuguojamos ir perkeliamos į minimalią buferintą metanolio terpę, turinčią 0,5 % metanolio. Metanolio pridama papildomai kas 12 val. po 0,5 %. Auginama purtyklėje 48 val. 30°C temperatūroje. Užaugintos mielės centrifuguojamos, praplaunamos steriliu vandeniu ir dar kartą centrifuguojamos. Biomasė užšaldoma -20°C temperatūroje. Gaunamas mielių *Pichia pastoris* biomasės kiekis 18 ± 2 g. Visas biomasės auginimo procesas užima 6 dienas.

Panaudotoji metodika yra modifikuota metodika iš literatūros [7]. Modifikuotoje metodikoje mielių ląstelės nuo Petri lėkštelių yra iš karto perkeliamos į glicerolinę terpę, o tuo tarpu metodikoje [30] mielių ląsteles perkeliamos į glicerolinę terpę per tarpines stadijas (kieta agarozinė palaikymo terpė, 2-4 mėgintuvėliai su gliceroline terpe). Modifikuojant atsisakyta šių tarpinių stadijų ir reikiamas metanolio kiekis dedamas ne visas iš karto į auginimo terpę, o po 0,5 % kas 12 valandų. Todėl biomasės auginimo trukmė sumažėja nuo 10 dienų iki 6.

Mielių *Pichia pastoris* biomasė užšaldyta -20°C temperatūroje gali būti laikoma ilgą laiką beveik nesikeičiant alkoholo oksidazės aktyvumui.

3.2 Alkoholo oksidazės gryninimas

AO iš mielių *Pichia pastoris* išgryninti buvo pasirinkta tokia grynimo schema:

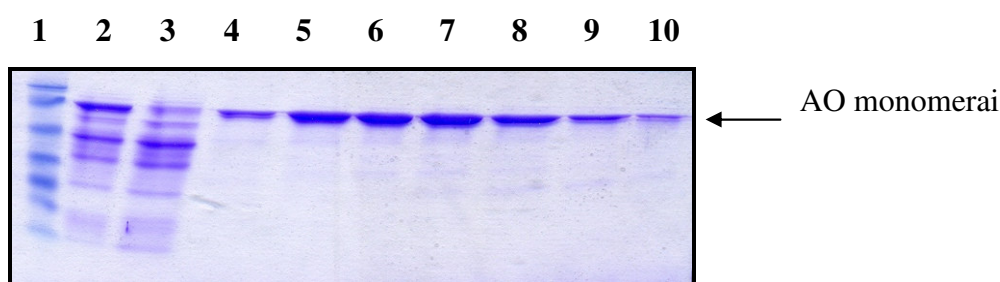
- biomasės suardymas, pirminio ekstrakto gavimas,
- pašalinių baltymų nusodinimas amonio sulfatu,
- jonų mainų chromatografija, naudojant sorbentą DEAE-Sefarozę.

Alkoholo oksidazė yra ląstelinis fermentas, randamas mielių ląstelių viduje, todėl ląsteles reikia suardyti. Tam buvo naudotas mechaninis ardymo būdas – intensyvus biomasės purtymas (2.2.2.1.1 metodika) ar maišymas (2.2.2.1.2 metodika), pridėjus stiklo rutuliukų (skersmuo 450-500

µm), 10 – 30 min. Nucentrifugavus suardytą biomasę, gaunamas centrifugatas – nevalytas fermento tirpalas, kuriame kartu su fermentu yra ir kiti ląstelių komponentai (baltymai, angliavandeniai, neorganinės druskos ir kt.).

Toliau fermentas apvalomas nusodinant pašalinius baltymus amonio sulfatu (2.2.2.2 metodika), beriant kieto amonio sulfato į suardytos masės centrifugatą iki 40 % tirpalo soties. Centrifuguojama, gautas tirpalas dializuojamas prieš buferinį tirpalą B (2.1.3.3 tirpalas).

Ir galutinė grynimo stadija – jonų mainų chromatografija, naudojant 20 ml kolonėlę, kuri užpildyta DEAE-Sefarozė (2.2.2.3 metodika). Sudaryta kolonėlė, pusiausvyrinta buferiniu tirpalu B. Sorbuoti baltymai desorbuojami linijiniu NaCl koncentracijos gradientu nuo 0 M iki 0,5 M (5 pav.).



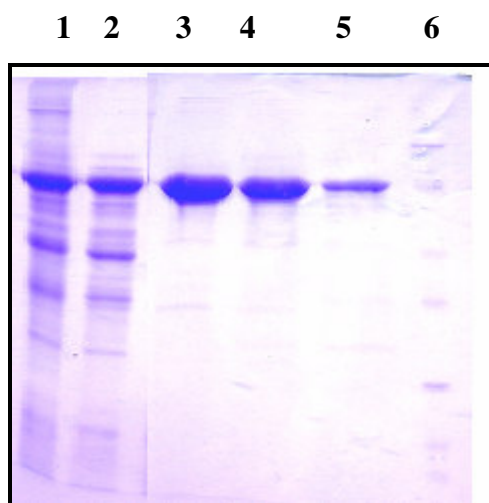
5 pav. AO jonų mainų chromatografija. NaDS elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje vaizdas:

1 – molekulinė masių standartai, 2 – baltymo tirpalas, įneštas į kolonėlę, 3 – nesisorbavę kolonėleje baltymai, 4 – 10 desorbcija NaCl gradientu

Baltymas desorbuojamas nuo sorbento, esant 0,25 M NaCl koncentracijai. Frakcijos su tiksliniu baltymu yra sujungiamos ir jis išpilstomas ir laikomas -20°C tolesniems darbams.

Iš elektroforezės rezultatų matoma, kad baltymas yra pakankamai grynas. Taigi sukurta AO gryninimo schema yra gera.

Vieno iš gryninimo bandymų rezultatai pateikti 16 lentelėje ir 6 pav.



1 – po mielių ląstelių suardymo stadijos
2 – po pašalinių baltymų išsodinimo amonio sulfatu stadijos
3 – 5 – po jonų mainų chromatografijos stadijos
6 – molekulinė masių standartai

6 pav. Baltymo AO gryninimo stadijų 12% NaDS elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje vaizdas

16 lentelė. AO grynimo rezultatai

| Grynimo stadija | Tūris, mL | Baltymų konc., mg/mL | Baltymo kiekis, mg | Aktyvumas, U/mL | Bendras aktyvumas, U | Specifinis aktyvumas, U/mg | Aktyvumo išeiga, % |
|--|-----------|----------------------|--------------------|-----------------|----------------------|----------------------------|--------------------|
| Pirminis ekstraktas | 30 | 3,98 | 119,4 | 64,8 | 1944 | 16,3 | 100 |
| Nusodinimas (NH ₄) ₂ SO ₄ ir dializė | 35 | 1,49 | 52,15 | 24,6 | 861,7 | 16,5 | 44,3 |
| DEAE-Sefarozė | 9 | 0,78 | 7,02 | 14,7 | 131,9 | 18,8 | 6,8 |

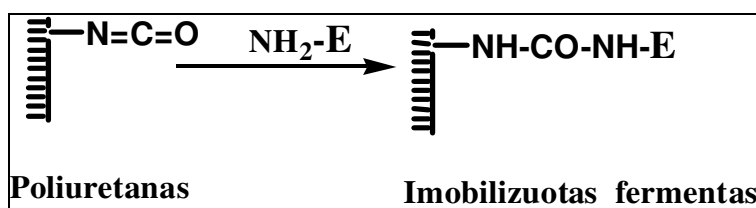
Nelauktas gryninimo rezultatas – nedidelis specifinis aktyvumas, nors pagal elektroforezės duomenis AO išvaloma nuo daugelio pašalinių baltymų. Tikriausiai dalis AO valant inaktyvuojasi.

3.3 AO imobilizacija

Imobilizuoti fermentai gali būti efektyviau panaudoti organinėje sintezėje, negu natyvūs fermentai. AO buvo imobilizuota ant poliuretatinio ir modifikuoto chitozano (MCHZ) nešiklių.

Poliuretatinis nešiklis naudojamas tuoj pat po pagaminimo. Jo paviršiuje yra aktyvių izocian grupių, kurios reaguoja su baltymo amino grupėmis ir kovalentiškai suriša baltymą su nešikliu (7 pav.).

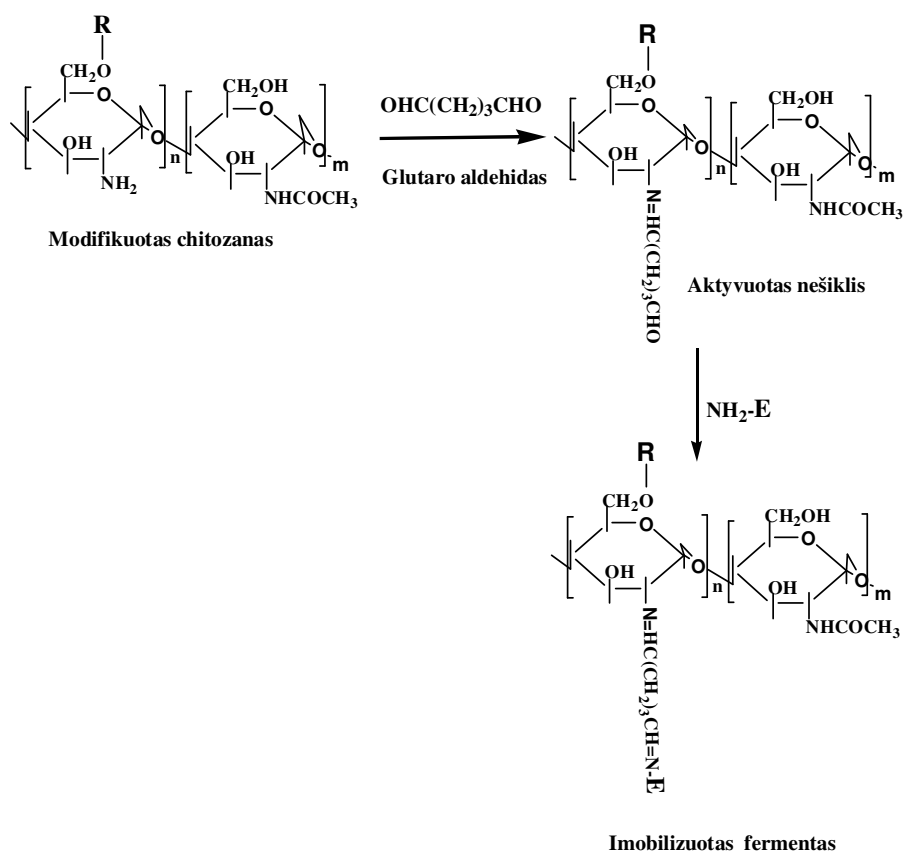
AO imobilizacija ant poliuretatinio nešiklio vykdyta 40°C temperatūroje 0,5 val., maišant mechaniniu maišikliu (2.2.10.1 metodika). Po 0,5 val. maišymo reakcijos mišinys buvo perkeliamas į šaldytuvą (+4°C) ir paliekamas stovėti per naktį. Po to imobilizuotas preparatas filtruojamas, gerai praplaunamas buferiniu tirpalu C (2.1.3.4 tirpalas) nuo nesurišto fermento ir matuojamas fermento aktyvumas tirpale ir ant nešiklio (2.2.4.2 ir 2.2.11 metodikos).



7 pav. AO imobilizacijos ant poliuretatinio nešiklio schema

Modifikuotas chitozanas prieš imobilizavimą aktyvuojamas glutaro aldehidu (GA) (8 pav). GA dažnai naudojamas fermentų imobilizavimui, nes jo reakcija su baltymais vyksta greitai, švelniomis sąlygomis, kurios paprastai neturi įtakos baltymų konformacijai, o galutiniai produktai pakankamai stabilūs. Po aktyvacijos, nešiklis kruopščiai praplaunamas nuo GA pertekliaus ir maišomas su fermento tirpalu. Taip išvengiama kontakto su laisvu GA, dažnai turinčiu inaktyvuojantį poveikį.

AO imobilizacija ant aktyvuoto MCHZ vykdytas 40°C temperatūroje 0,5 val., maišant mechaniniu maišikliu (2.2.10.2 metodika). Po 0,5 val. maišymo reakcijos mišinys buvo perkeliamas į šaldytuvą (+4°C) ir paliekamas stovėti per naktį. Po to imobilizuotas preparatas filtruojamas, gerai praplaunamas buferiniu tirpalu C (2.1.3.4 tirpalas) nuo nesurišto fermento ir matuojamas fermento aktyvumas tirpale ir ant nešiklio (2.2.4.2 ir 2.2.11 metodikos).



8 pav. AO imobilizacijos ant modifikuoto chitozано schema

Buvo atlikti septyni imobilizavimo bandymai. Imobilizacijos rezultatai pateikti 17 lentelėje.

17 lentelė. AO imobilizacijos rezultatai

| Nr. | Nešiklis | Imobilizacijai paimto baltymo kiekis mg/ 1 g [©] nešiklio* | Bendras AO aktyvumas U / 1 g [©] nešiklio | IP aktyv., U/g [©] | Imobilizacijos išeiga, % |
|-----|----------------|--|--|--------------------------------|-----------------------------|
| 1. | MCHZ | 4,5 | 24,2 | 14,2 | 59 |
| 2. | MCHZ | 10,2 | 38,3 | 8,52 | 22 |
| 3. | MCHZ | 21,0 | 78,9 | 11,0 | 14 |
| 4. | poliuretalinis | 3,54 | 20,09 | 0,63 | 2,7 |
| 5. | poliuretalinis | 3,55 | 23,04 | 0,65 | 3,2 |
| 6. | poliuretalinis | 7,1 | 40,2 | 1,6 | 3,9 |
| 7. | poliuretalinis | 23,0 | 105,7 | 10 | 9,5 |
| 8. | poliuretalinis | 8,5 | 49,4 | 20,2 | 41** |

* Po imobilizacijos filtrate nelieka nei baltymo, nei AO aktyvumo, išskyrus bandymus Nr. 2 ir 3 bei 8. Šiuose bandymuose filtrate liko 1,14 ir 3,96 mg bei 3,03 baltymo / 1 g nešiklio, atitinkamai. AO aktyvumo nebuvo likę, išskyrus 8 bandyme (1,11 U/ml).

[©] – drėgno nešiklio masė

** Imobilizacija atlikta 30 mM fosfatiniame buferyje, pH 7,5, kituose bandymuose – tame pačiame buferyje, bet pH 6,0 – 6,5.

Geriausiai fermentas imobilizavosi ant modifikuoto chitozano, pasiekta išeiga siekia apie 59 %. Tačiau tolimesni darbai buvo atliekami su fermentu imobilizuotu ant poliuretalinio nešiklio, nes su šiuo nešikliu patogiau dirbti ir jis yra kompaktiškesnis.

3.4 AO savybės

Siekiant įvertinti pH ir temperatūros įtaką fermentui buvo gauti eksperimentiniai rezultatai tiek imobilizuotai, tiek ir natyviai AO (9 ÷ 12 pav.). Kaip substratas buvo panaudotas 3 % metanolio tirpalas, o susidaręs formaldehidas buvo nustatytas spektrofotometriškai (2.2.4.1 metodika). Buvo naudotas imobilizuota AO gauta ant poliuretalinio nešiklio (17 lentelė Nr. 7).

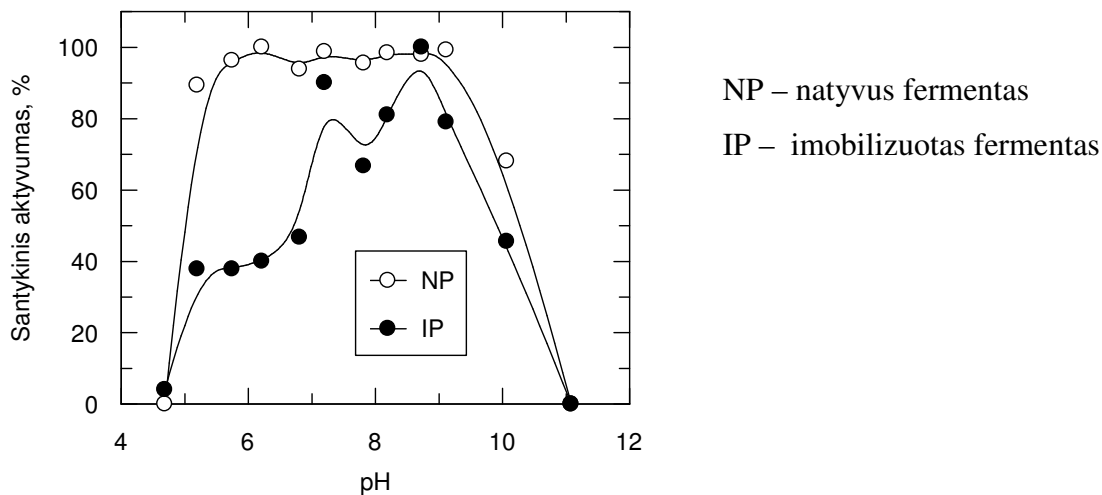
3.4.1 AO aktyvumo priklausomybė nuo pH

Vandenilio jonų koncentracijos įtakai IP ir natyviai fermentui nustatyti buvo panaudoti skirtingo pH substrato tirpalai universalajame buferiniame tirpale (2.1.3.7 tirpalas).

IP pH optimumo nustatymui (2.2.12 metodika) fermento reakcija su substrato tirpalu buvo laikyta termostate 15 min. 30°C temperatūroje, maišant mechanine maišykle, reakciją stabdant 4 N

HCl. IP aktyvumas nustatytas pagal 2.2.11 metodiką, o natyviojo fermento – pagal 2.2.4.2 metodiką.

Gautų duomenų palyginimui, rezultatai pervesti į santykinę skalę, maksimalę reikšmę (atskirai IP ir natyviame fermentui) priimant už 100%.



9 pav. AO aktyvumo priklausomybė nuo pH

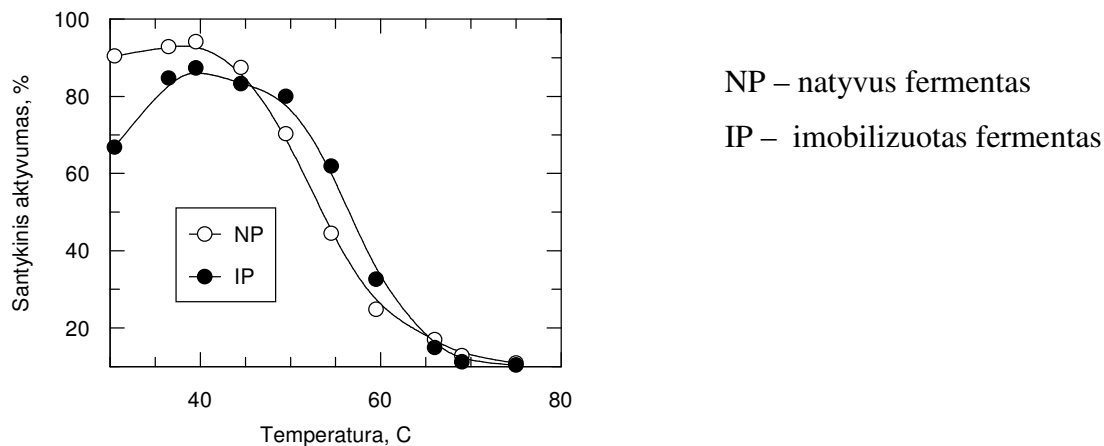
Iš pateiktų duomenų galima spręsti, kad tiek natyvus, tiek imobilizuotas fermentas yra neaktyvūs rūgštinėje bei šarminėje terpėse. AO turi aktyvumą gana plačiame pH intervale nuo pH 5,0 iki pH 10,0 (9 pav.).

Kartojant 9 pav. pvaizduotą bandymą su skirtinguose mielių *Pichia pastoris* auginimuose gauta AO, išryškėja dviejų ar net trijų maksimumų buvimas aktyvumo priklausomybėje nuo pH. Tai leidžia spėti, kad AO yra dviejų ar trijų izofermentų mišinys. Šių izofermentų nepavyko atskirti jonų – mainų chromatografija, kai sorbentas DEAE-Sefarozė, ir NaDS elektroforeze. Bet atliekant izoelektrinį fokusavimą, gautos trys artimos juostelės, tai patvirtina trijų AO izoformų buvimą (žiūr. 3.4.6 skyrelį).

3.4.2 Alkoholoksidazės temperatūrinis optimumas

Alkoholoksidazės temperatūrinio optimumo nustatymui (2.2.7 ir 2.2.14 metodikos) naudotas 3 % metanolio tirpalas buferiniame tirpale C (2.1.3.4 tirpalas). Nustatytas fermento aktyvumas skirtingose temperatūrose (10 pav.). IP temperatūrinio optimumo nustatymui fermento reakcija su substrato tirpalu buvo laikyta termostate 15 min. įvairiose temperatūrose, maišant

mechanine maišykle, reakciją stabdant 4 N HCl. IP aktyvumas nustatytas pagal 2.2.11 metodiką, o natyviojo fermento – pagal 2.2.4.2 metodiką.



10 pav. AO aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros

Nustatyta, kad temperatūrinis optimumas panašūs natyviame ir imobilizuotam fermentui ir yra apie 40°C (10 pav.).

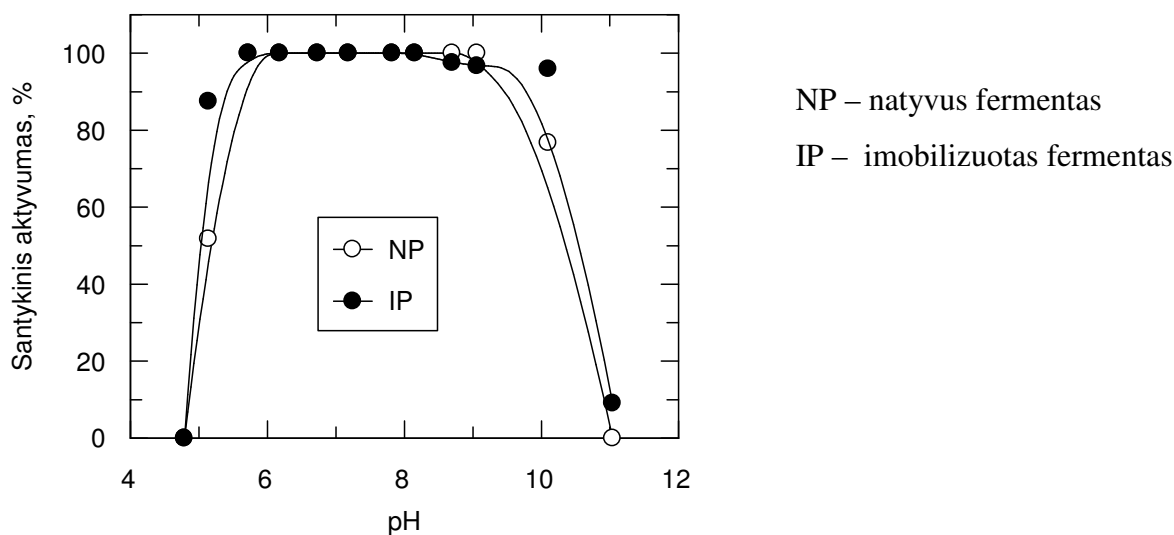
AO aktyvumas aukščiau temperatūrinio optimumo krinta ne stipriai. Patikimai išmatuojamas aktyvumas dar lieka, esant 60°C temperatūrai. Gali būti, kad AO izoformas turi nevienodą temperatūrinį stabilumą.

3.4.3 Alkoholoksidazės pH stabilumas

pH stabilumo nustatymui tiek natyviame fermentui (2.2.6 metodika), tiek IP (2.2.13 metodika) buvo naudojamas 3 % metanolio tirpalas buferiniame tirpale G (2.1.3.9 tirpalas).

AO pH stabilumas nustatomas pH privedant iki reikiamos reikšmės (5÷11). Laikoma kambario temperatūroje 30 min. ir matuojamas aktyvumas pagal 2.2.4.2 metodiką.

Imobilizuoto fermento pH stabilumo nustatymui, pirmiausiai IP praplaunamas 10 kartų skiestu buferiniu tirpalu C (2.1.3.4 tirpalas) ir nufiltruojamas, ant 20-50 mg drėgno IP užpilama 0,3 ml įvairių pH reikšmių universaliojo buferinio tirpalai (5÷11) (2.1.3.7 tirpalas) ir mišinys palaikomas 30 min., toliau IP aktyvumas nustatomas pagal 2.2.11 metodiką.



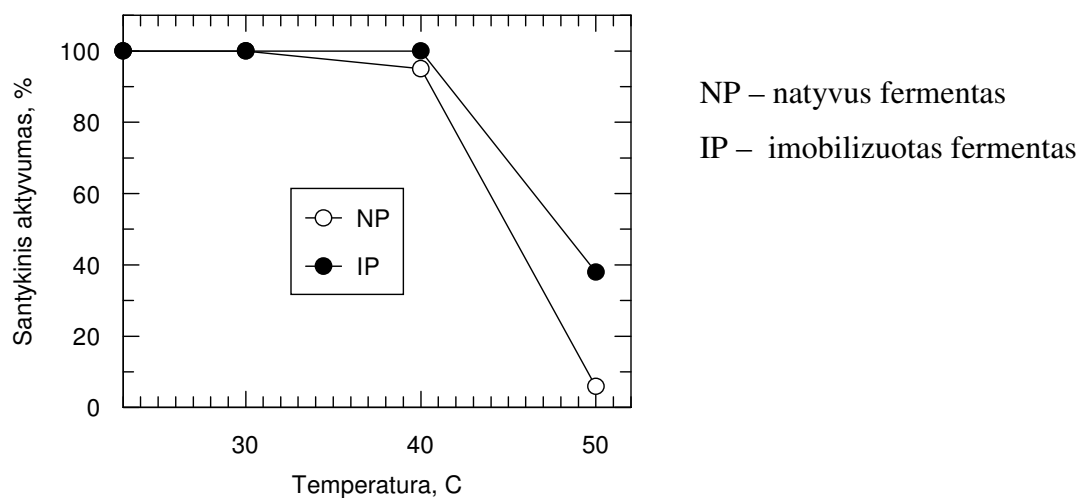
11 pav. AO pH stabilumas

Nustatyta, kad natyvi AO stabili pH intervale nuo 6,0 iki 9,5, o imobilizuota AO – 5,5 iki 10,0 (11 pav.).

3.4.4 Alkoholoksidazės temperatūrinis stabilumas

Temperatūrinio stabilumo nustatymui tiek natyviam fermentui (2.2.8 metodika), tiek IP (2.2.15 metodika) buvo naudojamas 3 % metanolis buferiniame tirpale C (2.1.3.4 tirpalas).

Natyvios AO temperatūriniam stabilumui nustatyti fermentinis aktyvumas matuojamas įprastomis sąlygomis (2.2.4.2 metodika), tik prieš reakciją fermento tirpalas 30 min. Laikomas termostate pasirinktoje temperatūroje ($23 \pm 70^\circ\text{C}$).



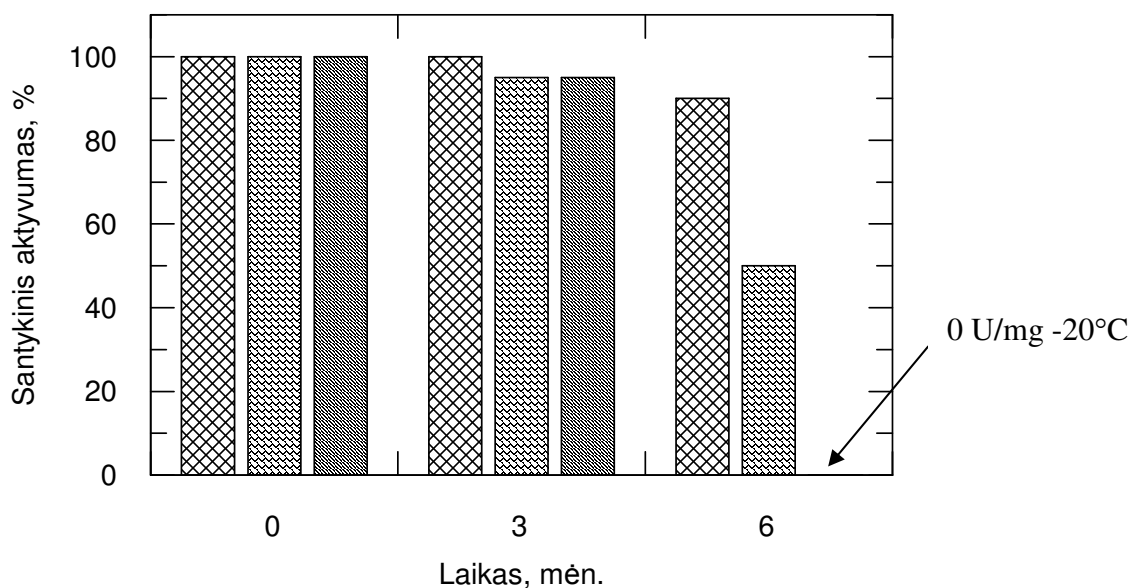
12 pav. AO temperatūrinis stabilumas

IP temperatūriniam stabilumui imobilizuoto fermento aktyvumas nustatomas pagal 2.2.11 metodiką, tik prieš reakciją ant 20 – 50 mg IP yra užpilama 0,3 ml buferinio tirpalo C ir mišinys laikomas 30 min. įvairiose temperatūrose (30 ÷ 70°C).

AO temperatūrinis stabilumas panašūs natyviams ir imobilizuotam fermentui. Temperatūrinis stabilumas neaukštas, virš 40°C vyksta inaktyvacija (12 pav.).

3.4.5 Alkoholoksidazės stabilumas laikant

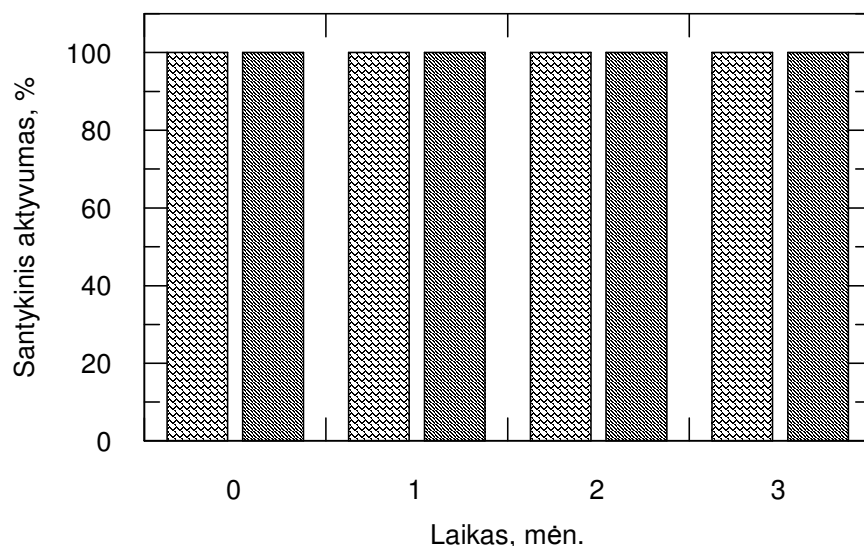
Buvo patikrinta AO aktyvumo kitimo priklausomybė nuo laikymo sąlygų. AO buvo laikyta užšaldyta -70°C, -20°C temperatūrose ir 50 % glicerolyje, + 4°C temperatūroje. Kas tam tikrą laiką buvo tikrinamas fermentinis aktyvumas įprastu būdu (2.2.4.2 metodika). Mažiausiai inaktyvavosi AO, kuri buvo laikyta -70°C temperatūroje (13 pav.).



13 pav. AO tirpalo aktyvumo priklausomybė nuo laikymo sąlygų ir trukmės:

▣ - 70°C, ▤ - 20°C, ▥ - 50 % glicerolis, + 4°C

Buvo patikrintas ir imobilizuotos AO aktyvumo kitimas laike +4°C temperatūroje. Kas tam tikrą laiką buvo tikrinamas IP aktyvumas įprastu būdu (2.2.11 metodika). Po 3 mėn. IP aktyvumas išliko toks pats kaip buvo pradžioje (14 pav.).

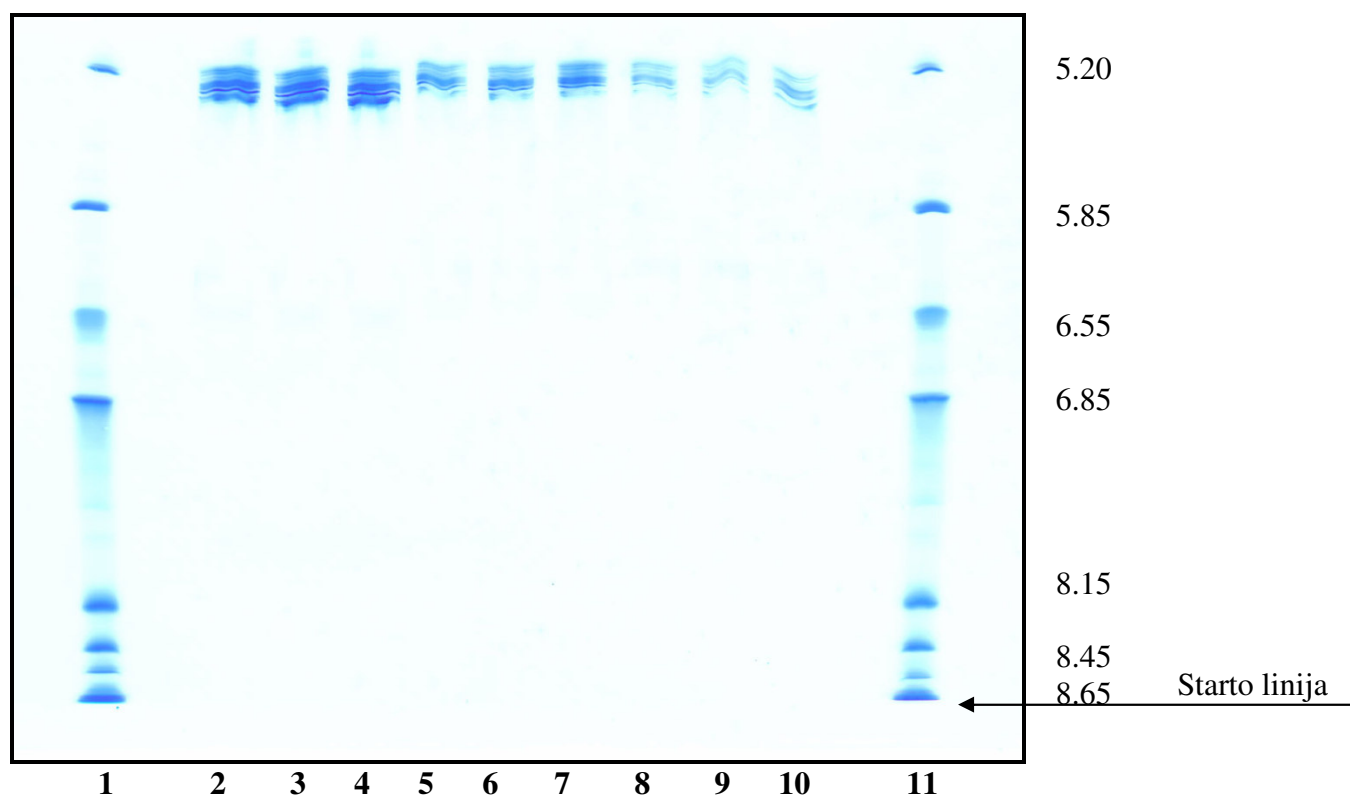


14 pav. IP aktyvumo priklausomybė nuo laikymo trukmės +4°C temperatūroje:

▨ - AO imobilizuota ant MCHZ, ▤ - AO imobilizuota ant poliuretano

3.4.6 Alkoholoksidazės izoelektrinis fokusavimas

AO savybių tyrimai leidžia spėti, kad šis fermentas yra kelių izofermentų mišinys. Tai buvo tikrinta izoelektrinio fokusavimo metodu (15 pav.). Šis tyrimas buvo atliktas SicorBiotech mokslo centre.

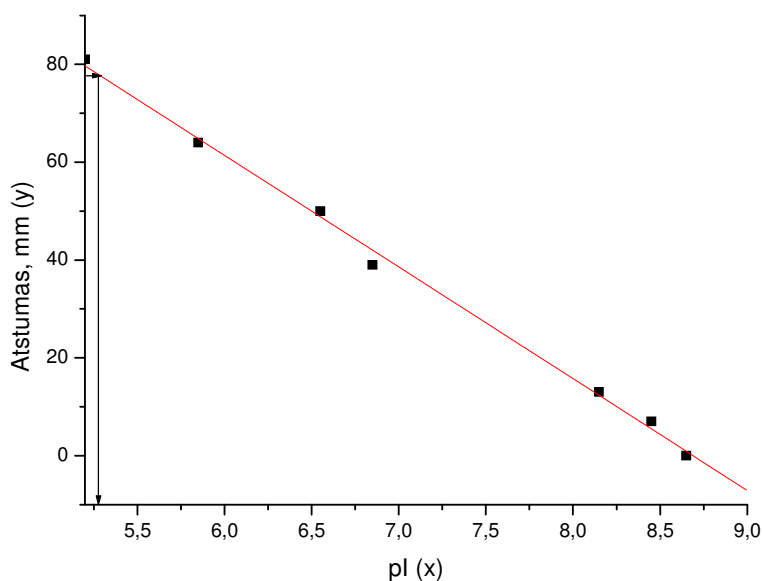


15 pav. AO izoelektrinio fokusavimo vaizdas: amfolinai pH 5-8, 1 – pI standartai 5,0-10,5, 2.-4 – užnešta 15 µg, 5.-7 – užnešta 5 µg, 8.-10 – užnešta 1 µg, 11 – pI standartai 5,0-10,5

Izoelektrinio fokusavimo gelyje aiškiai matomos trys juostos. Tai rodo, kad AO susideda iš trijų gana artimas pI reikšmes turinčių izofermentų.

Buvo apskaičiuotos AO izoformų pI reikšmės pagal pI standartus. Brėžiamas grafikas (16 pav.), kuriame atidėta juostų atstumo nuo starto linijos priklausomybė nuo pI. Pagal AO izoformų atstumus randami jų pI, panaudojant kalibracinės tiesės lygtį:

$$y = -22,83x + 198,38.$$

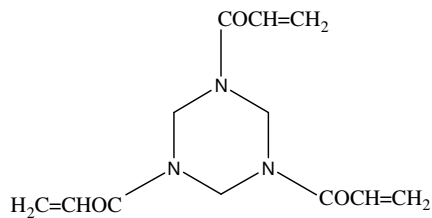


16 pav. Izoelektrinio fokusavimo kalibracinis grafikas

Gautos AO izoformų pI reikšmės – 5,27, 5,18, 5,16. Šios reikšmės neatitinka literatūroje nurodytai AO iš *Pichia pastoris* pI reikšmei (6,3) [2].

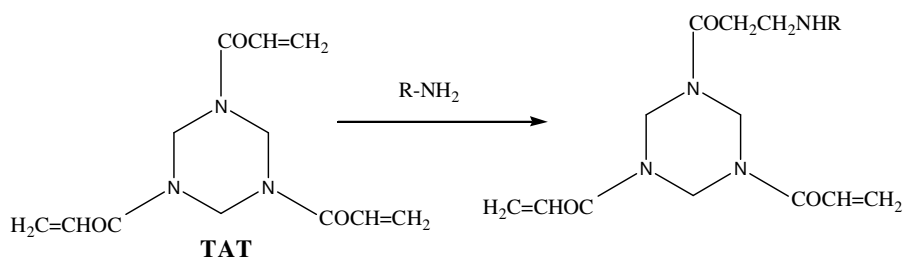
3.5 AO oligomerinės struktūros tyrimas

Pagal literatūrinius duomenis AO yra oligomerinis fermentas, sudarytas iš 8 vienodų subvienetų [5,6,7]. Pabandėme tirti oligomerinę struktūrą susiuvant subvienetus trifunkciniu reagentu 1,3,5-triakriloil-heksahidro-s-triazinu (TAT), kurio formulė pateikiama 17 pav.



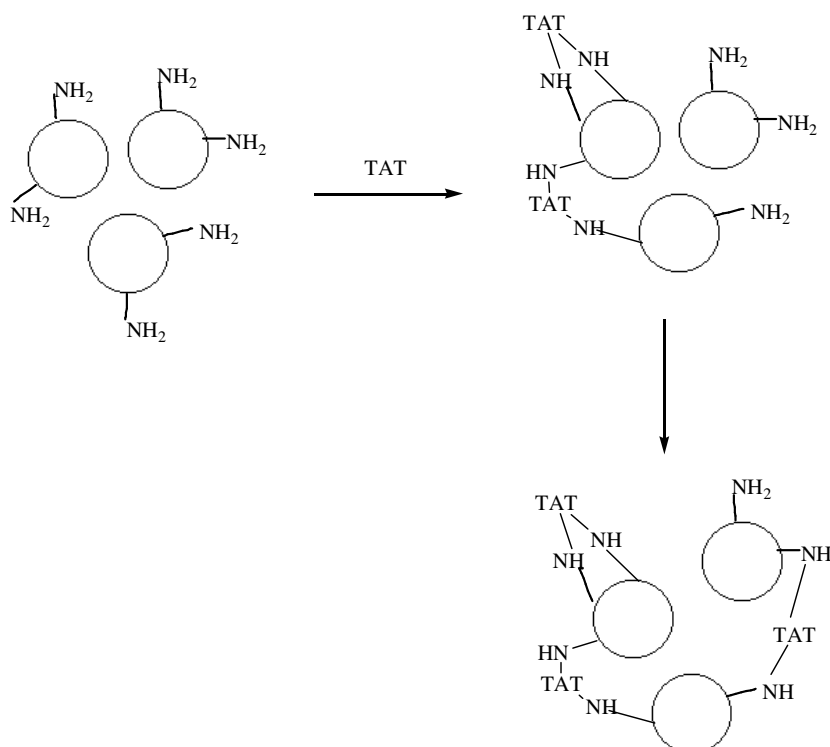
17 pav. 1,3,5-triakriiloil-heksahidro-s-triazinas

Šiame darbe naudotas TAT buvo susintetintas Biotechnologijos institute. Naudojant TAT baltymo modifikavimui reaguoja lizino liekanų amino grupės. Reakcijos schema pateikiama 18 pav.



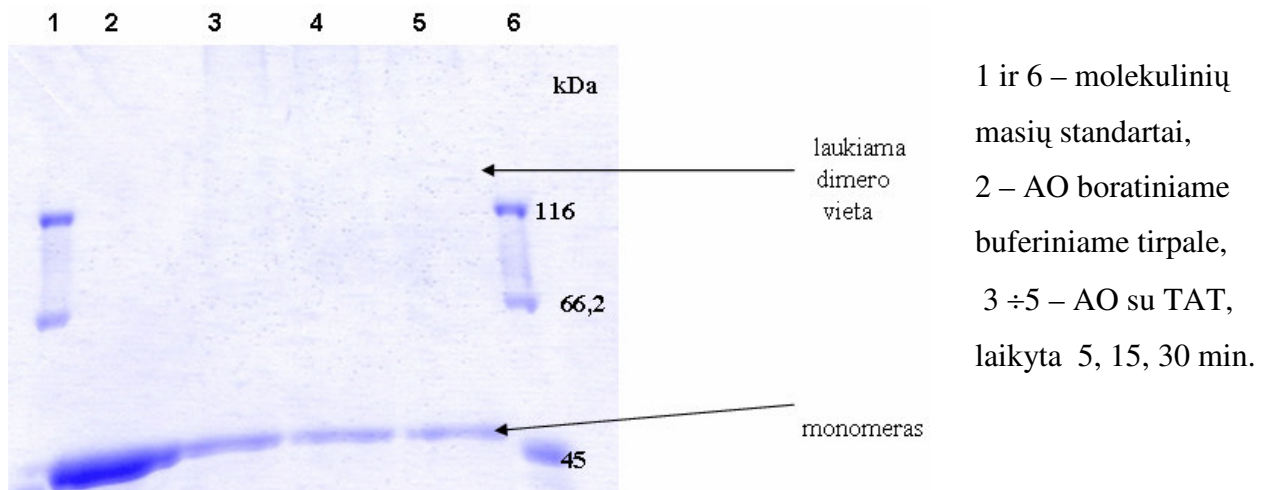
18 pav. Amino grupių modifikavimas TAT

TAT gali susiūti subvienetus įvairiai (19 pav.), susiūtų formų identifikacijai atliekama 6% NaDS elektroforezėje.



19 pav. Susiuvimo schema veikiant TAT

Skirtingai nuo aprašytų tyrimų [6] AO atveju 6% NaDS – PAGE gelyje nematome susiūtų dimerų ar trimerų, nors monomeras laikui bėgant mažėja (20 pav.). Toks rezultatas galėtų būti, jei susiuvimas vyktų labai greitai, arba jei veikiant TAT baltymas susiryša į stambesnius agregatus.



20 pav. Baltymo AO susiūtų formų identifikacijos 6 % NaDS elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje vaizdas

IŠVADOS

1. Sukurta alkoholoksidazės iš mielių *Pichia pastoris* gryninimo schema, susidedanti iš pašalinių baltymų nusodinimo amonio sulfatu ir jonų mainų chromatografijos. Pagal NaDS elektroforezę gaunama beveik gryna alkoholoksidazė.
2. Atlikta alkoholoksidazės imobilizacija ant poliuretano ir modifikuoto chitozano. Geriausios imobilizacijos išeigos gautos ant modifikuoto chitozano.
3. Alkoholoksidazė turi platų pH optimumą (pH 6,0 ÷ 9,5). Temperatūrinis optimumas yra apie 40°C. AO stabili pH intervale nuo 6,0 iki 10,0 ir temperatūroje iki 40°C. Išvardintos alkoholoksidazės savybės panašios natyviam ir imobilizuotam fermentui.
4. Izoelektriniu fokusavimo metodu parodyta, kad alkoholoksidazė susideda iš trijų izoformų, kurių pI 5,16, 5,18, 5,27.

Už pagalbą darbe dėkoju:

- 1. Darbo vadovams prof. G. Dieniui ir m. b. V. Michailovienei „Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorija“ (Biotechnologijos institutas).**
2. Dr. A. Zubrienei „Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorija“ (Biotechnologijos institutas).
3. Katedros vedėjui D. Čitavičiui (VU Gamtos ir mokslų fakultetas Augalų fiziologijos ir mikrobiologijos katedra).
4. Doktorantei T. Romaškevič (VU Chemijos fakultetas Polimerų chemijos katedra).
5. Magistrantei J. Ambrazevičiūtei (VU Chemijos fakultetas Polimerų chemijos katedra).
6. J. Azončik (UAB „Sicor Biotech“).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Boteva R., Visser A., Filippi B., Vriend G., Veehuis M., van der Klei J. Conformational Transitions Accompanying Oligomerization of Yeast Alcohol Oxidase, a Peroxisomal Flavoenzyme // *Biochemistry*, 1999, 38, p. 5034-5044.
2. Couderc R., Baratti J. Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase // *Agric. Biol. Chem.*, 1980, 44 (10), p. 2279–2289.
3. Cregg J. The *Pichia* System. Keck Graduate Institute, Claremont, Calif., p. 1-8.
4. Cromartie T. H. Sulfhydryl and Histidiny Residues in the Flavoenzyme Alcohol Oxidase from *Candida boidinii* // *Biochemistry*, 1981, 20, p. 5416-542.
5. de Hoop M. J., Keizer-Gunnik I., Klaas Spollema. Overexpression of Alcohol Oxidase in *Pichia pastoris* // *Febs. Letters*, 1991, 291 (2), p. 299-302.
6. Dienys G., Sereikaite J., Gavenas G., Kvederas R., Bumelis V. A. Cross-Linking of Protein Subunits by 1,3,5-Triacryloyl-hexahydro-s-triazine // *Bioconjugate Chem.*, 1998, 9, p. 744-748.
7. Duff S. J. B., Murray W. D. Production and application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *Biotechnology and bioengineering.*, 1988, 31, p. 44-49.
8. European Bioinformatics Institute. [žiūrėta 2006 04 01]: Prieiga per internetą: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
9. Geissler J., Ghisla S., Kroneck P. M. H. Flavin- dependent Alcohol Oxidase from Yeast // *Eur. J. Biochem.*, 1986, 160, p. 93-100.
10. Glemža A. Fermentai. Vilnius: Mokslas, 1987, p. 113-120.
11. Gonchar M. V., Maidan M. M., Pavlishko H. M., Sibirny A. A. A New Oxidase-Peroxidase Kit for Ethanol Assays in Alcoholic Beverages // *Food technol. biotechnol.*, 2001, 39 (1), p. 7–42.
12. Harris E. L. V., Angal S. Protein purification methods. Oxford University press, Oxford New York Tokyo, 1989, p. 317.
13. Higgins R. D., Cregg J. M. *Pichia* Protocols. *Methods Mol. Biol.*, 1998, 103, p. 1-3.
14. Yamada H., Shin K. C., Kato N., Shimizu S., Tani Y. Purification and Characterization of Alcohol Oxidase from *Candida 25-A* // *Agric. Biol. Chem.*, 1979, 43, p. 877-878.
15. Kato N., Omori Y., Tani Y., Agata K. Alcohol oxidases of *Kloeckera sp.* and *Hansenula polymorpha* // *Eur. J. Biochem.*, 1976, 64, p. 341-350.
16. Koutz P., Davis G. R., Stillman C., Barringer K., Cregg J. Structural Comparison of the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase Genes // *Yeast*, 1989, 5 (3), p. 167-177.

17. Nash T. The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reactin // Biochem., 1953, 55, p. 416-421.
18. Patel R. N., Hou C. T., Laskin A. I., Derelanko P. Microbial Oxidation of Methanol: Properties of Crystallized Alcohol Oxidase from a Yeast *Pichia sp.* // Arch. Biochem. Biophys., 1981, 210, p. 481-488.
19. *Pichia* Expression Kit. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris* // Invitrogen Catalog no. K1710-01.
20. Sahm H., Kula M. R., Alcohol Oxidase from *Candida boidinii* // Methods Enzymol., 1982, 89, p. 424-428.
21. Sahm H., Wagner F. Microbial Assimilation of Methanol // Eur. J. Biochem., 1973, 36, p. 250-256.
22. Sakai Y., Tani Y. Simple Purification and Improvement of Stability of Alcohol Oxidase from a methanol Yeast, *Candida boidinii* S2, by Forming an Enzyme-Azide Complex // Agric. Biol. Chem., 1988, 52, p. 227-233.
23. Shin-ichiro S. Purification and Properties of Alcohol Oxidase from *Candida methanosorbosa* M-2003 // CURRENT MICROBIOLOGY, 1997, 34, p. 374-377.
24. Shin-ichiro S., Ogawa A., Yokoyama S. Screening and Identification of *Candida methanosorbosa* as Alcohol Oxidase – producing Methanol Using Yeast // Agric. Biol. Chem., 1990, 54 (5), p. 1279-1298.
25. Van der Klei I.J., Bystryck L. V., Harder W., Alcohol oxidase from *Hansenula polymorpha* CBS 4732 // Methods Enzymol., 1990, 188, p. 420-427.
26. Van der Klei I. J., Harden W., Veehuis. Biosynthesis and Assembly of Alcohol Oxidase, a Peroxisomal Matrix Protein in Methylotrophic Yeast: a Review // Yeast, 1991, 7 (3), p. 195-209.
27. Walker G. H. Yeast Physiology and Biotechnology. 1998, p. 3-9.
28. Zlateva T., Boteva R., Fillipi B. Deflavination of Flavo-oxidases by nucleophilic reagents // Biochem. Biophys., 2001, 1548, p. 213-219.
29. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. Москва: Химия, 1979, p. 305-312.
30. Сухомлин Т. К., Александровский Я., А., Родионов Ю. В. Свойства алкогольоксидазы из метилотрофных дрожжей *Candida boidinii* АКФ 47 МГУ // Биохимия, 1987, 52, p. 134-137.
31. Фрщбишер М. Основы микробиологии. Москва. Высшая школа. 1965, p. 44.
32. Шлеев С. В., Шумакович Г. П., Никитина О. В. Очистка и характеристика алкогольоксидазы из генетически сконструированного штамма-сверхпродуцента метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* // Биохимия, 2006, 71, p. 312-319.