



УДК 577.152.113 : 535.373.3

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ ИЗ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ

© 1997 г. А. А. Маскевич[#], И. М. Арцукевич*, С. А. Маскевич, И. П. Черникевич**Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, 230023, Гродно, ул. Ожешко, 22;***Институт биохимии АН Республики Беларусь, Гродно*

Поступила в редакцию 07.08.96 г. Принята к печати 04.12.96 г.

Изучена флуоресценция алкогольоксидазы метилотрофных дрожжей в присутствии этанола и азид-натрия. Кинетика затухания флуоресценции отражает гетерогенность микроокружения излучающих остатков триптофана. Фермент имеет два центра связывания азид-иона: один – аллостерический, другой – в области активного центра; взаимодействие азид-иона с последним способствует стабилизации структуры белка. Затухание флуоресценции флавинадениндинуклеотида (FAD), связанного в активном центре, может быть описано суммой двух экспонент, возможно из-за присутствия двух конформеров FAD. Интенсивность флуоресценции связанного FAD возрастает по мере денатурации белка и может служить критерием его нативности.

Ключевые слова: алкогольоксидаза, флавинадениндинуклеотид, флуоресценция.

Алкогольоксидаза (КФ 1.1.3.13), синтезируемая метилотрофными микроорганизмами, катализирует окисление низших алифатических спиртов молекулярным кислородом. Ее использование в биосенсорах, предназначенных для детекции этанола, и в других целях ограничено неустойчивостью этого фермента. Повышение устойчивости алкогольоксидазы требует знания ее пространственной организации и динамики. Данная работа посвящена изучению влияния субстрата (EtOH) и эффектора (NaN₃) на флуоресценцию в алкогольоксидазе остатков триптофана и связанного кофактора флавинадениндинуклеотида (FAD).

Алкогольоксидаза при возбуждении в длинноволновой полосе поглощения триптофана (295 нм) обладает собственной флуоресценцией, максимум спектра которой расположен при 332 нм (табл. 1). Квантовый выход ϕ собственной флуоресценции белка, рассчитанный относительно водного раствора триптофана (рН 7.0), для которого $\phi = 0.20$, составляет 0.05. Низкий квантовый выход – результат тушения флуоресценции остатков триптофана соседними полярными группировками. Из сопоставления средней длительности свечения белка и триптофана в модельных условиях следует, что тушение является преимущественно статическим. Судя по положению полосы испускания, излучающие остатки трипто-

фана находятся в гидрофобном окружении или же релаксация белка значительно заторможена.

Кривые затухания флуоресценции аппроксимировались суммой двух экспонент (уравнение 1) или гауссовым распределением флуорофоров по константам излучательных переходов (уравнение 2). Результаты приведены в табл. 2 и 3, а также на рис. 1. Из соотношения амплитуд α_1/α_2 видно, что вклад хромофоров с большим τ , а следовательно, и средняя длительность увеличиваются с ростом длины волны. Этот эффект, характерный для большинства изученных белков [1], обычно связывают с наличием нескольких излучающих конформеров триптофана (ср. [2, 3]) или с особенностями кинетики релаксации белка. Как следует из табл. 2 и 3, использование статистических критериев не позволяет сделать однозначный вывод в пользу той или иной модели. Тем не менее неэкспоненциальность кинетики затухания и батохромный сдвиг флуоресценции обусловлены, скорее всего, гетерогенностью излучателей. Это подтверждается отсутствием в кинетике затухания компонента с отрицательной амплитудой на длинноволновом краю спектра, который характерен для релаксации [4]. Гетерогенность микроокружения флуорофоров является также причиной некоторого длинноволнового сдвига (~2 нм) максимума спектра флуоресценции при возбуждении светом с длиной волны 302 нм. Параметры разложения (τ_1 и τ_2 , а также τ_{01} и τ_{02}) имеют вариации, не превышающие среднеквадратичное отклонение каждой из величин (см. табл. 2 и 3). Поэтому можно предположить, что собственная

[#] Автор для переписки (тел.: (0152) 44-42-97, факс: (0152) 44-84-61, e-mail: voit@univer.belpak.grodno.by).

Таблица 1. Влияние этанола и NaN_3 на интенсивность (I), степень поляризации (P) и положение максимума спектра собственной флуоресценции алкогольоксидазы*

Добавки	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	I	P
—	332.0	1.00	0.20
0.5 мМ EtOH	333.0	1.05	0.22
10 мМ EtOH	331.5	0.94	0.15
0.5 мМ NaN_3	331.5	1.10	0.23
10 мМ EtOH + 0.5 мМ NaN_3	331.0	0.99	0.20

*Условия: трис-НСI-буфер (рН 7.8), T 295 К, $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм, $\lambda_{\text{фл}}$ 340 нм, $[E]$ 0.4 мг/мл.

флуоресценция белка обусловлена двумя типами излучающих остатков триптофана, различающихся положением спектра и длительностью свечения. Их природа и спектральные свойства требуют дальнейшего исследования.

Нативная алкогольоксидаза содержит кофермент – FAD, которому в спектре поглощения отвечает слабая полоса с максимумом около 450 нм. Флуоресценция FAD в белке составляет менее 0.01 от интенсивности его свечения в свободном состоянии. Этот эффект можно объяснить внутримолекулярным тушением изоаллоксазинового флуорофора остатком аденина [5]. Другой причиной тушения может быть перенос электрона от расположенных поблизости электронодонорных групп в остатках триптофана, тирозина или цистеина. Поскольку молекула FAD, связанная в белках, как правило, имеет развернутую конформацию [6], вторая причина наиболее вероятна. В этом случае перенос заряда осуществляется за время, значительно меньшее длительности флуоресценции кофермента, и практически не отражается на ее наносекундной кинетике.

Присутствие триптофановых остатков в активном центре или в непосредственной близости от него подтверждается данными о собственной

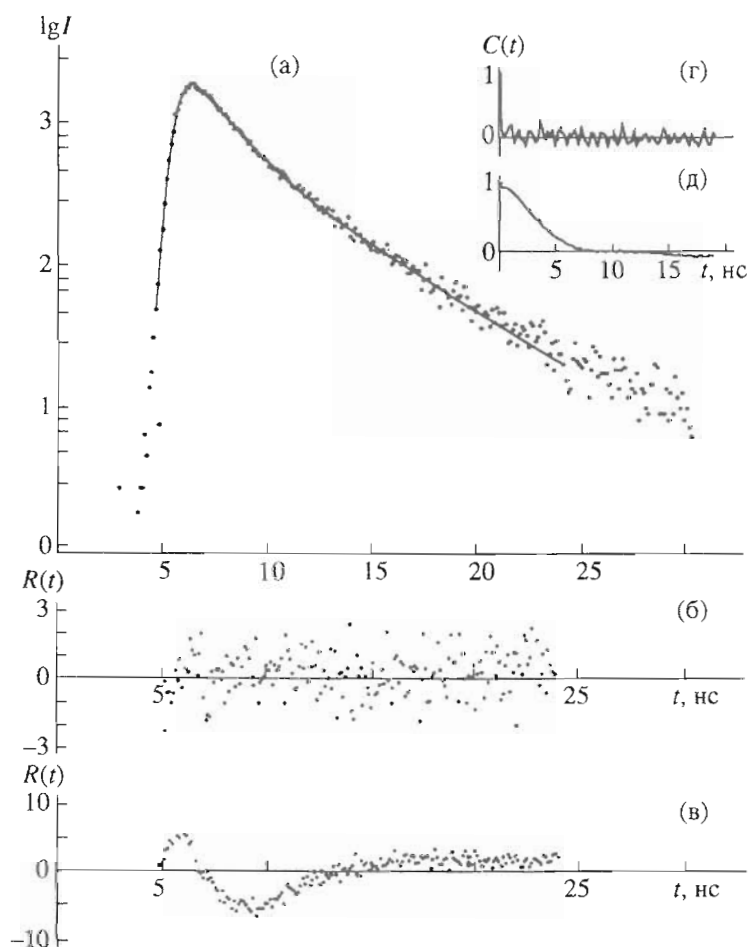


Рис. 1. Кривая затухания флуоресценции алкогольоксидазы (а): точки – экспериментальные данные, непрерывная кривая – результат аппроксимации функции затухания суммой двух экспонент. Приведено также распределение относительных отклонений и функции их автокорреляции, соответствующие двухэкспоненциальному (б, г) и одноэкспоненциальному (в, д) представлению ($\lambda_{\text{возб}}$ 297 нм; $\lambda_{\text{фл}}$ 330 нм; остальные условия см. в подписи к табл. 1 и 2).

флуоресценции белка. Как следует из табл. 1, внесение в раствор этанола в концентрации 0.5 мМ вызывает увеличение интенсивности флуоресценции остатков триптофана в белке на 5%. Поскольку в такой концентрации этанол практически не влияет на диэлектрические свойства среды, наблюдаемый эффект является специфическим и обусловлен проникновением субстрата в активный центр фермента и его воздействием на микроокружение входящего в этот центр остатка триптофана (возможно, блокированием одного из путей его тушения). Присутствие этанола сказывается и на кинетике затухания флуоресценции. Так, средняя длительность свечения (τ_{cp}) увеличивается с 2.01 до 2.10 нс (табл. 2). Увеличение длительности собственной флуоресценции связано с изменением константы динамического тушения. Эта константа в общем случае зависит от двух факторов: скоростей диффузии флуорофора и тушителя (в нашем случае от подвижности остатков триптофана и полярных тушащих групп (ср. [7])) и от взаимной ориентации флуорофора и тушителя.

В соответствии с формулой Левшина–Перрена [8] степень поляризации P пропорциональна величине $1/\tau_{cp}$, где τ_{cp} – средняя длительность флуоресценции. Из табл. 1 следует, что величина P в присутствии этанола увеличивается. Таким образом, можно заключить, что при связывании этанола увеличивается жесткость активного центра. Характерно, что в пределах точности аппроксимации длительность одного из компонентов (τ_2) остается неизменной, в то время как длительность другого (τ_1) увеличивается на 10%. Отсюда можно заключить, что компонент свечения, имеющий меньшую длительность, отвечает остатку(ам) триптофана, расположенному в непосредственной близости от активного центра. Такой же вывод следует из описания кинетики затухания свечения с использованием бимодального распределения Гаусса (см. табл. 3).

Увеличение концентрации этанола до 10^{-2} М приводит к противоположному эффекту – уменьшению интенсивности флуоресценции. Надо думать, что при этом происходит изменение конформации белка, влияющее на его динамику в целом, что и проявляется в усилении динамического тушения остатков триптофана. Интересно, что азид натрия в концентрации 0.1 мМ по своему действию на флуоресценцию аналогичен этанолу в низких концентрациях. Поскольку данный лиганд не ингибирует, а активирует алкогольоксидазу, вызываемые им изменения флуоресценции можно объяснить его аллостерическим воздействием на динамику активного центра. Это хорошо согласуется с результатами кинетических исследований (рис. 2), которыми показано, что в присутствии азид натрия классическая гиперболическая зависимость скорости окисления от на-

Таблица 2. Результаты моделирования кинетики затухания флуоресценции алкогольоксидазы (E) суммой двух экспонент*

Образец	$\lambda_{фл}$, нм	α_1	τ_1 , нс**	α_2	τ_2 , нс**	χ^2	τ_{cp}^{***} , нс
E	320	0.68	1.02	0.32	3.87	1.10	2.01
	330	0.71	1.05	0.29	4.37	1.01	
	380	0.60	1.29	0.40	4.60	1.18	
E + 0.5 мМ EtOH	330	0.70	1.14	0.30	4.32	1.08	2.10
E + 0.6 мМ NaN ₃	330	0.66	1.12	0.34	4.49	1.12	2.23
E + 3 М мочевины	330	0.59	1.20	0.41	3.57	1.39	2.17

* $\lambda_{возб}$ 297 нм, $\lambda_{фл}$ 330 нм; остальные условия см. в подписи к табл. 1.

** Среднеквадратичное отклонение для величин τ_1 и τ_2 не превышает 5%.

*** $\tau_{cp} = \alpha_1\tau_1 + \alpha_2\tau_2$ ($\alpha_1 + \alpha_2 = 1$) – средняя длительность флуоресценции.

Таблица 3. Результаты моделирования кинетики затухания флуоресценции алкогольоксидазы (E) с использованием бимодального распределения Гаусса (условия см. в подписи к табл. 2)

Образец	λ , нм	A_λ	τ_0 , нс*	σ , нс*	χ^2
E	320	0.71	1.10	0.02	1.25
		0.29	3.64	0.20	
	330	0.18	1.42	0.07	1.06
E + 0.5 мМ EtOH	330	0.72	4.58	0.36	1.32
		0.25	5.34	0.57	
	380	0.75	1.50	0.46	1.10
E + 0.6 мМ NaN ₃	330	0.71	1.18	0.36	0.98
		0.29	4.36	0.10	
E + 3 М мочевины	330	0.70	1.14	0.35	1.18
		0.30	4.54	0.38	
E + 3 М мочевины	330	0.66	1.50	0.55	1.18
		0.34	4.14	0.45	

* Среднеквадратичное отклонение для величин τ и σ не превышает 5%.

чальной концентрации этанола, свойственная нативной алкогольоксидазе (кривая 1), становится S-образной (кривая 2). Коэффициент кооперативности, позволяющий оценивать число центров связывания, достигал при этом 2.6. Положительная кооперативность может указывать на присутствие в ферменте взаимодействующих участков сорбции азида, связывание которого и приводит к ускорению окисления этанола.

Внесение азид в раствор алкогольоксидазы приводит к уширению полосы поглощения фермента при 450 нм и одновременно к появлению

полосы в области 500–600 нм. При этом желтая окраска раствора, обусловленная коферментом, переходит в розовую. Влияние азид натрия на молекулу белка бимодально: он тормозит окисление субстрата в концентрациях свыше 1 мМ и активирует его при более низких концентрациях. Ингибирование обратимо и полностью устраняется гель-фильтрацией инактивированного фермента на сефадексе G-50. Если в раствор алкогольоксидазы, содержащий 10^{-2} М этанол, внести

дополнительно 1 мМ азид натрия, то вызванные этанолом изменения собственной флуоресценции практически исчезают.

Как отмечалось выше, флуоресценция FAD в комплексе с ферментом в значительной степени потушена, тем не менее использование свечения кофермента может стать наиболее простым и информативным методом определения нативности алкогольоксидазы. Примечателен в этом отношении опыт по денатурации белка. При инкубации алкогольоксидазы в растворах 4 и 6 М мочевины интенсивность флуоресценции FAD при 520 нм возрастает соответственно в 3.5 и 12 раз (рис. 3). Одновременно степень поляризации флуоресценции уменьшается с 0.20 (нативный белок) до 0.05 (6 М мочевина). Причиной наблюдаемых изменений несомненно является диссоциация комплекса FAD с белком. Максимум спектра собственной флуоресценции белка при этом сдвигается на 14 нм к 346 нм. Этот батохромный сдвиг отражает изменение третичной и четвертичной структур фермента. Если же инкубации в растворе 6 М мочевины подвергали алкогольоксидазу, предварительно обработанную 0.1 мМ азидом, то интенсивность ее флуоресценции была в 3 раза ниже, чем в контрольном опыте. Это указывает на прямое участие азид натрия в связывании FAD с апоферментом.

Конформационная перестройка белка, индуцированная низкими концентрациями азид натрия, благоприятно сказывается на его активности и стабильности. По нашим данным, в присутствии 0.6 мМ азид натрия активность гомогенного фермента в течение 20 сут хранения возрастает и лишь затем начинает медленно снижаться. В отсутствие азид фермент теряет около половины своей активности уже в первые несколько суток хранения при 10°C . Судя по кинетике затухания флуоресценции (см. табл. 2 и 3), азид в отличие от этанола оказывает влияние на остатки триптофана, расположенные как в активном центре (характеризующиеся меньшей длительностью свечения), так и вне его. Связывание азид в активном центре фермента подтверждается данными спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), из которых следует, что в присутствии азид затрудняется отщепление кофермента от алкогольоксидазы, адсорбированной на электроде [9, 10]. Итак, азид, связываясь с белком в области активного центра и вне его, делает структуру алкогольоксидазы менее подвижной и соответственно более устойчивой к воздействию внешних факторов.

Затухание флуоресценции FAD в алкогольоксидазе, так же как и собственной флуоресценции этого белка, может быть описано суммой экспонент или гауссовым распределением излучателей

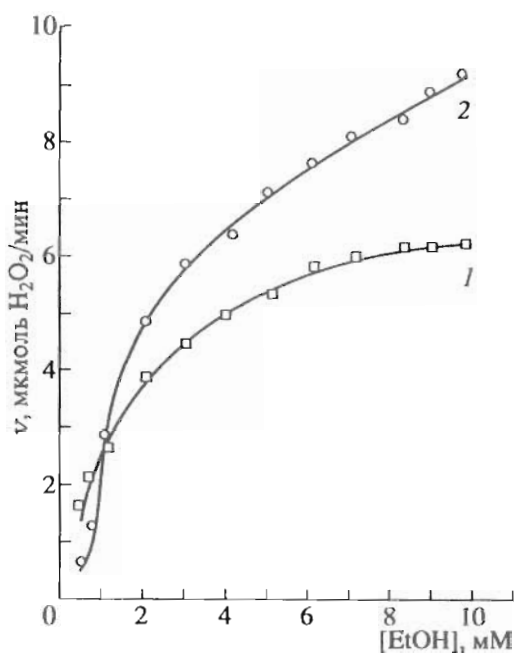


Рис. 2. Зависимость скорости катализируемого алкогольоксидазой образования H_2O_2 от начальной концентрации этанола в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0.6 мМ NaN_3 .

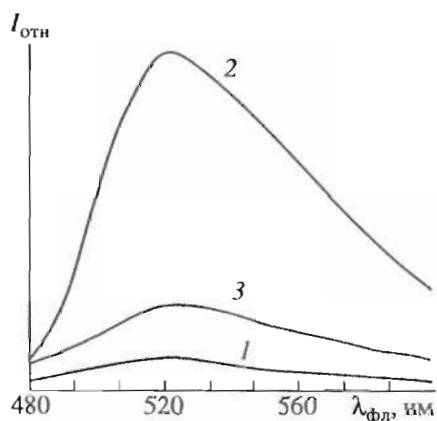


Рис. 3. Спектр флуоресценции FAD в препаратах нативной (1) и денатурированной алкогольоксидазы (6 М мочевина) в отсутствие (2) и в присутствии (3) 0.6 мМ NaN_3 ($\lambda_{\text{возб}}$ 450 нм; остальные условия см. в подписи к табл. 1).

по константам переходов. Результаты расчетов приведены на рис. 4. При использовании экспоненциального представления наилучшее согласие достигается при двухэкспоненциальном представлении ($\tau_1 = 1.07$, $\tau_2 = 4.49$ нс; $\chi^2 = 1.12$). При использовании бимодального распределения параметры τ_0 и σ , определяющие положение максимумов распределения и их ширину, сходны со значениями, полученными при дискретном представлении функции затухания. Более того, поскольку распределения получились весьма узкими (см. рис. 4а), за флуоресценцию действительно отвечают два типа центров свечения. Эти центры различаются константами динамического и статического тушения, что может быть следствием присутствия молекул FAD в двух конформациях, переходы между которыми затруднены. Неэкспоненциальность кинетики затухания флуоресценции связанного FAD и ранее наблюдалась в других ферментных системах [11–13] и также интерпретировалась авторами как результат присутствия нескольких конформеров кофермента. В этих конформерах флуорофоры в различной степени подвергаются тушению внутримолекулярным (адениновым остатком) и (или) внешними тушителями (например, остатками триптофана). В любом случае предполагаемые конформационные различия должны сказываться на каталитических свойствах соответствующих активных центров. Исходя из этого следует ожидать корреляции флуоресцентных свойств связанного FAD с ферментативной активностью алкогольоксидазы.

При денатурации белка кинетика затухания FAD значительно изменяется. Статистические критерии качества аппроксимации оптимальны при описании затухания одномодальным гауссовым распределением излучателей по константам переходов (рис. 4б). Таким образом, при денатурации вместо двух дискретных состояний реализуется достаточно большое число случайных конформаций, в которых тушащее воздействие окружения различно. Полученные результаты, а также данные спектроскопии ГКР [10] показывают, что в поддержании нативной организации алкогольоксидазы участвуют не только водородные связи. В частности, в растворе 3 М мочевины алкогольоксидаза теряет лишь 30% ферментативной активности. В этих условиях различия между двумя типами излучающих остатков триптофана сохраняются, хотя и претерпевают значительные изменения (см. табл. 2 и 3).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Алкогольоксидазу выделяли из метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* по разработанному нами методу [14]. Активность фермента выражали числом микромолей H_2O_2 , образовавшейся в

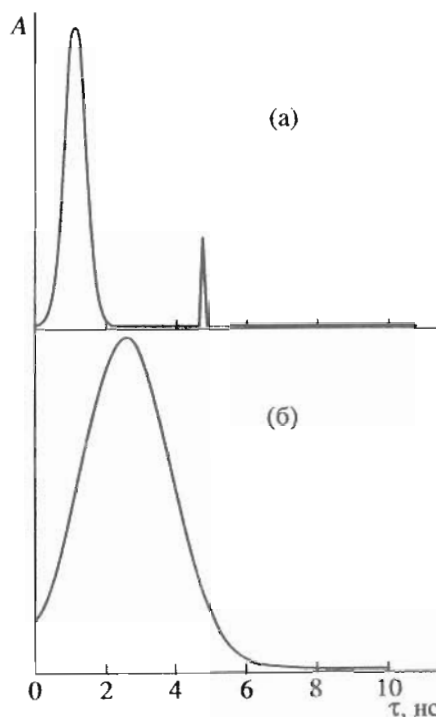


Рис. 4. Представление затухания флуоресценции FAD с использованием распределения Гаусса в препаратах нативной (а) и денатурированной (б; 6 М мочевины) алкогольоксидазы ($\lambda_{возб}$ 450 и $\lambda_{фл}$ 520 нм; остальные условия см. в подписи к табл. 1). А – амплитуда распределения [20]. Параметры полученных распределений: (а) – τ_{01} 1.02, σ_{01} 0.46 нс и τ_{02} 4.46, σ_{02} 0.08 нс (χ^2 1.01); (б) – τ 2.50, σ 1.17 нс (χ^2 1.08).

реакции за 1 мин, в расчете на 1 мг белка [15]. Концентрацию белка находили по методу Лоури и непосредственной спектрофотометрией. Коэффициент кооперативности системы (n_h) в присутствии азидата натрия оценивали разностным методом [16] по уравнению

$$n_h = \frac{\lg \left[\left(\frac{1}{v'} - \frac{1}{v} \right) / \left(\frac{1}{v} - \frac{1}{v''} \right) \right]}{\lg k}$$

где v , v' и v'' – скорости ферментативной реакции при концентрациях субстратов $[S]_0$, $[S]_0/k$ и $k[S]_0$ соответственно, а k – постоянный множитель.

Спектры флуоресценции растворов регистрировали на установке СДЛ-2 (Ленинградского оптико-механического объединения). Для коррекции на спектральную чувствительность использовали стандартную вольфрамовую лампу ТРШ-2850. Степень поляризации P измеряли статическим способом [8], вводя коррекцию на различную чувствительность установки при регистрации по-разному поляризованных составляющих излучения. Измерение длительности затухания свечения

производили на наносекундном импульсном спектрофлуориметре [17]. Длительность импульсов возбуждения составляла ~1 нс. Для управления аппаратурой и обработки данных использовали ЭВМ IBM 386DX. Анализ кривых затухания с учетом длительности возбуждающих импульсов и функции отклика системы регистрации (деконволюцию) производили по методу [18], подробно описанному ранее. Для учета зависимости функции отклика системы регистрации от длины волны использовали метод, предложенный в работе [19]. В качестве эталонных соединений были взяты *n*-терфенил и флуоресцеин, имеющие моноэкспоненциальное затухание свечения [1].

Функцию затухания флуоресценции моделировали дискретной суммой экспонент, а также одним или двумя гауссовыми распределениями флуорофоров по константам излучательных переходов:

$$f(t) = \sum_{j=1}^n \alpha_j \exp\left(-\frac{t}{\tau_j}\right), \quad (1)$$

$$f(t) = \int_0^{\infty} \alpha(\tau) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d\tau, \quad (2)$$

$$\alpha(\tau) = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} \exp\left[-\frac{(\tau_{0i} - \tau)^2}{2\sigma_i^2}\right], \quad (3)$$

где α_j , τ_j – амплитуда и время затухания *j*-й компоненты; A_i , τ_{0i} и σ_{0i} – параметры, определяющие соответственно амплитуду, положение центра и ширину распределения.

Метод анализа свертки при моделировании функции затухания флуоресценции выражениями (2) и (3) описан в работе [20]. Для оценки достоверности аппроксимации использовали статистический критерий χ^2 , а также визуальную оценку распределения относительных отклонений $R(t)$ измеренных и расчетных значений интенсивности и их автокорреляционной функции $C(t)$ [21]. Близость значений χ^2 к 1, как и случайный характер отклонений значений $R(t)$ и $C(t)$ относительно оси времени (рис. 1б и 1г), служила подтверждением адекватности аппроксимации [21]. Характерный вид кривой затухания флуоресценции, регистрируемого с помощью импульсного флуориметра, а также распределение $R(t)$ и $C(t)$ приведены на рис. 1.

Авторы выражают благодарность Министерству образования и науки Республики Беларусь, а

также ассоциации INTAS (грант № 93-1839) за частичную поддержку работ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии: Пер. с англ. М.: Мир, 1986. 496 с.
2. *Szabo A.G., Rayner D.M.* // J. Am. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 554–561.
3. *Petrich J.W., Chang M.C., McDonald D.B., Fleming C.R.* // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 3824–3832.
4. *Easter J.H., De Toma R.P., Brand L.* // Biophys. J. 1976. V. 16. P. 571–576.
5. *Barrio J.R., Tolman G.L., Leonard N.J. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 941–943.
6. *Visser A.J.W.G.* // Photochem. Photobiol. 1984. V. 40. P. 703–706.
7. *Буриштейн Э.А.* // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. Т. 6. М.: ВИНТИ, 1976. 171 с.
8. *Левшин Л.В., Салецкий А.М.* Люминесценция и ее измерения: Молекулярная люминесценция. М.: Изд-во БГУ, 1989. 272 с.
9. *Strekal N.D., Artsukevich I.M., Maskevich S.A., Kivach L.N., Chernikevich I.P.* // Proc. XIV Int. Conf. Raman Spectr. / Eds Nai-Teng Yu. N.Y.: Wiley, 1994. P. A199–A200.
10. *Maskevich S.A., Strekal N.D., Artsukevich I.M., Kivach L.N.* // J. Mol. Struct. 1995. V. 349. P. 5–8.
11. *Tanaka F., Tamai N., Yamazaki I.* // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 4259–4262.
12. *Bastiaens P.I.H., Bonants P.J.M., Mueller F., Visser A.J.W.G.* // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 8416–8425.
13. *Bastiaens P.I.H., van Hoek A., Wolkers W.F., Brochon J.-C., Visser A.J.W.G.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 7050–7060.
14. *Ариукевич И.М., Черникевич И.М., Островский Ю.М.* Способ получения дрожжевой алкогольоксидазы. Пат. 2032743 СССР. 1990 г.
15. *Antony C.* // Sci. Progr. 1975. V. 62. P. 167–170.
16. *Курганов Б.И.* Аллостерические эффекторы. М.: Наука, 1978. 248 с.
17. *Гачко Г.А., Зыбельт В.К., Кивач Л.Н., Маскевич С.А., Маскевич А.А.* // Журн. прикл. спектроскопии. 1987. Т. 47. С. 335–339.
18. *Баширин С.К., Гачко Г.А., Кивач Л.Н., Маскевич А.А., Маскевич С.А., Удовыдченко В.Р.* // Журн. прикл. спектроскопии. 1990. Т. 52. С. 48–52.
19. *Voss K., Hock A., Visser A.J.W.G.* // Eur. J. Biochem. 1987. V. 165. P. 55–63.
20. *Маскевич А.А., Баширин С.К., Гачко Г.А., Кивач Л.Н., Маскевич С.А.* // Журн. прикл. спектроскопии. 1990. Т. 53. С. 557–563.
21. *O'Connor D.V., Phillips D.* Time-correlated Single Photon Counting. N.Y.: Acad. Press, 1984. 283 p.

Fluorescence of Alcohol Oxidase from Methylootropic Yeast**A. A. Maskevich*, I. M. Artsukevich**, S. A. Maskevich*, and I. P. Chernikevich******Yanka Kupala State University of Grodno, ul. Ozheshko 22, Grodno, 230023 Belarus****Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Belarus, Grodno, 230009 Belarus*

Received August 7, 1996

Abstract—The fluorescence of alcohol oxidase from methylootropic yeast was studied in the presence of ethanol and sodium azide. The fluorescence decay kinetics reflects the heterogeneity of the microenvironment of the emitting tryptophan residues. The enzyme has two azide binding sites: an allosteric site and another one in the region of the active center. The interaction of azide with the latter stabilizes the protein structure. The fluorescence decay of flavin adenine dinucleotide (FAD) bound in the active center was described by a double-exponential function, probably, due to the presence of two FAD conformers. The fluorescence intensity of bound FAD increases with protein denaturing and can serve as a criterion of its nativity.

Key words: alcohol oxidase, flavin adenine dinucleotide, fluorescence.