



УДК 577.15+579.222

СКРИНІНГ АКТИВНОСТІ РИБОФЛАВІНКІНАЗИ У МІКРООРГАНІЗМІВ

I. С. Білінська¹, Л. Р. Фаюра², І. О. Мукалов², В. Є. Кащенко²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

²Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

Досліджено активність рибофлавінкінрази у різних представників бактерій, дріжджів і плісневих грибів. Активність ферменту в еукаріотичних мікроорганізмів здебільшого була вищою порівняно з прокаріотами. Показано, що субстратом ферменту у досліджених штамів бактерій і дріжджів, окрім рибофлавіну, є і його відновлена форма – 1,5-дигідрорибофлавін. Проведено квантово-хімічні розрахунки тривимірної структури окисненої та відновленої форм рибофлавіну. Не виявлено суттєвих відмінностей між рівнями активностей рибофлавінкінрази і дигідрорибофлавінкінрази у облигатно аеробних та мікроаерофільних бактерій.

Ключові слова: рибофлавінкінказа, дигідрорибофлавінкінказа, бактерії, дріжджі, плісневі гриби.

ВСТУП

Флавінові коферменти – флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД) відіграють важливу роль у метаболізмі мікробної клітини. Як простетичні групи ФМН і ФАД входять до складу багатьох окисно-відновних ферментів – флавопротеїнів, які каталізують найрізноманітніші біохімічні реакції, що характеризує їх як найбільш універсальних каталізаторів білкової природи. На даний час описано більше 130 флавопротеїнів, які беруть участь у метаболізмі вуглеводів, спиртів, амінокислот, органічних і жирних кислот, процесах генерації енергії у дихальному ланцюгу, активації кисню, біоломінесценції й фототропізмі.

Перший етап біосинтезу флавінових нуклеотидів каталізує рибофлавінкінказа – АТФ-залежний фермент, що фосфорилує рибофлавін з утворенням рибофлавін-5'-фосфату (АТФ:рибофлавін-5'-фосфотрансфераза, К.Ф.2.7.1.26). Дослідження рибофлавінкінрази були розпочаті ще у 50-х роках [21], однак активність цього ферменту описана у небагатьох мікроорганізмів [16, 22, 26, 31, 33], причому отримані дані часто суперечливі.

Уже клоновано ген біфункціональної рибофлавінкінрази/ФАД-синтетази з еубактерій і археїв [19, 24, 25, 28]. У *Bacillus subtilis* водночас із геном біфункціонального

ферменту [23] виявлено ген монофункціональної рибофлавінкінази, високоспецифічної до відновленої форми рибофлавіну [12, 35]. В еукаріотичних організмів – деяких дріжджів [32], ссавців [29] і рослин [20] – ідентифіковано та клоновано ген монофункціонального ферменту з рибофлавінкіназною активністю.

Строга специфічність дії рибофлавінкінази при фосфорилуванні рибофлавіну по термінальній гідроксильній групі D-рибітильного бокового ланцюга ізоалоксанинового кільця відкриває унікальні можливості використання цього ферменту в біотехнологічному процесі одержання препаратів ФМН [4]. Такі препарати, на відміну від одержаних хімічним синтезом [30], не містять домішок ізомерних фосфорних ефірів рибофлавіну, біологічна активність яких залишається практично не дослідженою. У зв'язку з цим пошук багатих джерел рибофлавінкінази серед мікроорганізмів залишається актуальним.

Метою даної роботи було проведення систематичного дослідження активності рибофлавінкінази у різних представників бактерій, дріжджів і плісневих грибів, а також у промисловій біомасі низки біотехнологічних виробництв.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Штами мікроорганізмів, які використано у роботі, та їхнє походження наведені у табл. 1, 2, 4. Бактерії роду *Bacillus* культивували у середовищі Спіцайзена [14], *Streptomyces* – у середовищі Красильнікова [2], *Pseudomonas* і *Achromobacter* – у модифікованому середовищі Чапека [8], *Propionibacterium* і *Zygomonas* – у синтетичному середовищі [9], решта бактерій – у м'ясо-пептонному бульйоні. Дріжджі вирощували у модифікованому середовищі Беркгольдера [15]. Глюкозо-солеве середовище для *Aspergillus nidulans* і *Neurospora crassa* готували за Глазером зі співавт. [3]. *Eremothecium ashbyii* і *Ashbya gossypii* культивували як описано раніше [7].

Мікроорганізми вирощували у періодичній культурі при 30°C на круговій качалці (200 об/хв), лише бактерії *Propionibacterium freudenreichii*, *Pseudomonas denitrificans*, *Escherichia coli* і *Zygomonas mobilis* – у статичних умовах. Біомасу бактерій і дріжджів визначали турбідиметрично – на фотоелектроколометрі ФЭК-56М (кювета 3 мм, $\lambda=440\text{--}560$ нм (залежно від об'єкта), а стрептоміцетів і грибів – ваговим методом. У кінці логарифмічної фази росту клітини відділяли від поживного середовища центрифугуванням і промивали 0,01 М фосфатним буфером рН 8,0. Біомаса промислових штамів одержана на підприємствах (див. табл. 1, 2, 4) відповідно до технологічного регламенту.

Клітини бактерій і дріжджів руйнували балістичним методом у гомогенізаторі для клітин і бактерій Л-17 (Київський експериментальний завод медвиробів), або дезінтеграцією ультразвуком на апараті УЗДН 42-1 (60 с, 44 кГц). Плісневі гриби руйнували як описано раніше [7]. Безклітинні екстракти одержували центрифугуванням гомогенатів клітин при 30 000 г протягом 30 хв при 4°C. Концентрацію білка в екстрактах визначали за методом Лоурі.

Активність рибофлавінкінази в екстрактах визначали за раніше описаним методом [5] з модифікаціями, наведеними нижче. Реакційна суміш (загальний об'єм 1 мл) містила 0,1 мМ рибофлавін, 1 мМ АТФ, 1 мМ MgSO_4 , 0,1 М фосфатний буфер рН 8,0 і білок – 0,25–1 мг. Інкубацію проводили при 37°C протягом 30–60 хв, реакцію зупиняли заморожуванням проб при -20°C. Флавіни, що містилися в реакційній суміші, розділяли за допомогою хроматографії на папері Whatman 3ММ або Filtrak FN 17 у 5%-му розчині Na_2HPO_4 , або у воді, насиченій ізоаміловим спиртом,

з висхідним напрямком течії розчинника. Після візуальної детекції за флюорисценцією у фільтрованому ультрафіолетовому світлі ($\lambda = 254$ нм), ФМН і рибофлавін елюювали з хроматограм гарячою водою. Вміст флавінів у елюатах визначали флюориметрично на приладі з високою чутливістю, який розроблено в Науково-дослідному проектно-конструкторському інституті „ЕЛВІТ” (Львів) на основі флюориметра ЭФ-3М. Для контролю утворення ФАД у реакційній суміші проводили хроматографічне розділення флавінів на папері.

Визначення активності ферменту щодо повністю відновленої форми рибофлавіну – 1,5-дигідрорибофлавіну проводили за модифікованою методикою [22]. За одиницю активності рибофлавінкінази (Е) приймали кількість ферменту, необхідну для фосфорилування 1 мкмоль рибофлавіну або 1,5-дигідрорибофлавіну за 1 хв при 37°C.

Для статистичного опрацювання результатів дослідження використали програмний пакет Microsoft Office Excel.

Квантово-хімічний розрахунок просторової конфігурації молекул рибофлавіну і 1,5-дигідрорибофлавіну виконували за програмою CHEMDRAW і CHEM 3D (Cambridge Scientific Computing, Cambridge, MA, U.S.A.).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Активність рибофлавінкінази у досліджених бактерій різних родів та видів подано в табл. 1. Як видно із представлених даних, питома активність ферменту в безклітинних екстрактах цих організмів при використанні рибофлавіну як субстрату коливалась у широких межах (12,5–118,4 мкЕ/мг білка). Найвищою активністю ферменту (понад 100 мкЕ/мг білка) характеризувалися деякі штами бацил, зокрема *Bacillus megaterium* і *Bacillus cereus*, а також стрептоміцетів *Streptomyces olivaceus*. Найнижча активність ферменту виявлена у *Bacillus circulans*, *P. denitrificans*, *Streptomyces lividans* і *Z. mobilis*. Питома активність рибофлавінкінази, визначена у деяких бактерій іншими дослідниками, була значно нижчою: так, у *Brevibacterium ammoniagenes* вона становила 2 мкЕ/мг білка [24] (у цьому випадку і далі активність рибофлавінкінази, наведена в літературі, перерахована у відповідності до вимог КФ [36]), *Lactobacillus arabinosus* – 2,2 мкЕ/мг білка [30], *E. coli* – 3 мкЕ/мг білка [31]. У *Corynebacterium ammoniagenes* активність ферменту при фосфорилуванні рибофлавіну становила 11 мкЕ/мг білка [19]. Лише у *Peptostreptococcus elsdenii* – продуцента флаводоксину (ФМН-вмісного флавопротеїну) – активність рибофлавінкінази досягала 500 мкЕ/мг білка [26]. Виходячи з рівнів питомої активності рибофлавінкінази у бактерій, цей фермент біосинтезу флавінових нуклеотидів, поряд з іншими ферментами флавіногенезу [17, 27], можна віднести до ферментів „мінорних” біосинтетичних шляхів мікробної клітини.

Детально було проаналізовано активність рибофлавінкінази у різних видів бактерій роду *Bacillus* (табл. 1). Деякі автори [1] при визначенні активності цього ферменту описаним нами раніше методом [16] у *B. subtilis* SHgw і низки мутантів цього штаму з порушеною регуляцією біосинтезу вітаміну В₂ як субстрат використовували рибофлавін. Дещо пізніше інші дослідники стверджували [22], що рибофлавінкіназа іншого штаму цієї бацили – *B. subtilis* H-50 – фосфорилує винятково відновлену форму флавінового субстрату – 1,5-дигідрорибофлавін.

При визначенні активності рибофлавінкінази в 11 штамів різних видів роду *Bacillus* було встановлено (табл. 1), що безклітинні екстракти цих бактерій здатні

фосфорилювати як рибофлавін, так і 1,5-дигідрорибофлавін. У жодному випадку не спостерігали фосфорилювання тільки одного із субстратів, хоча з відновленою формою рибофлавіну активність, в основному, була вищою: в 1,1–2,6 разу. Подібна закономірність характерна не лише для бацил, але і для решти досліджуваних нами бактерій. Особливо суттєве зростання активності ферменту з 1,5-дигідрорибофлавіном спостерігали у *E. coli* – в 3,5 разу.

Таблиця 1. Активність рибофлавінкінази у бактерій

Table 1. Riboflavin kinase activity in bacteria

| № | Штам бактерії | Питома активність, мкЕ/мг білка | |
|----|--|---------------------------------|---------------------------|
| | | з рибофлавіном | з 1,5-дигідрорибофлавіном |
| 1 | <i>Achromobacter cobalamini</i> 53 | 20,6 | – |
| 2 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> A-50 | 21,5 | 26,4 |
| 3 | <i>B. brevis</i> ВКМ В-503 | 19,3 | 27,0 |
| 4 | <i>B. cereus</i> ВКМ В-372 | 109,0 | 105,4 |
| 5 | <i>B. circulans</i> ВКПМ В-1741 | 12,5 | 15,0 |
| 6 | <i>B. licheniformis</i> ВКМ В-511 | 20,5 | 22,0 |
| 7 | <i>B. megaterium</i> ВКМ В-512 | 118,4 | 117,5 |
| 8 | <i>B. mesentericus</i> ВКМ В-61 | 16,8 | 43,5 |
| 9 | <i>B. subtilis</i> ВКМ В-428 | 62,9 | 106,5 |
| 10 | <i>B. subtilis</i> ВКМ В-501 | 61,0 | 108,8 |
| 11 | <i>B. subtilis</i> ВКПМ В-5101 | 30,5 | 48,0 |
| 12 | <i>B. subtilis</i> Shgw | 29,0 | 46,7 |
| 13 | <i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 14067 | 38,0 | – |
| 14 | <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 | 42,3 | – |
| 15 | <i>Escherichia coli</i> K-12 ¹ | 20,3 | 70,0 |
| 16 | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ВКМ В-104 | 32,7 | 37,5 |
| 17 | <i>P. freudenreichii</i> sb. <i>shermanii</i> M-82 | 35,1 | 40,2 |
| 18 | <i>Pseudomonas denitrificans</i> ВКМ В-556 | 14,5 | 15,7 |
| 19 | <i>Saccharopolyspora erythraea</i> 5 | 23,5 | 24,8 |
| 20 | <i>Streptomyces lividans</i> 66 | 14,6 | 16,0 |
| 21 | <i>S. olivaceus</i> ATCC 3335 | 106,3 | 105,2 |
| 22 | <i>S. rimosus</i> ATCC 10970 | 93,2 | – |
| 23 | <i>Zygomonas mobilis</i> ВНДІ Генетика В-3483М | 14,5 | 18,6 |

Примітка. „–“ – активність не визначали.

Культури № 1, 2 – з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка (Україна).

Культура № 12 одержана від Д.А. Перумова (ЛІЯФ ім. Б. П. Константинова, Гатчина, Петербурзької обл., Росія).

Культура № 17 – одержана від В. Я. Биховського (Інститут біохімії ім. А. Н. Баха, Москва).

Культури № 19, 20 – з колекції культур мікроорганізмів кафедри генетики і біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка (Україна).

1 – промислова біомаса НПО „Ензим” (Ладжин, Україна).

Не було виявлено кореляції між значеннями рибофлавінкіназної та дигідрорибофлавінкіназної активностей та відношенням бактерій до кисню. У мікроаерофільних бактерій *P. freudenreichii*, *Z. mobilis*, *P. denitrificans* активність рибофлавінкінази з 1,5-дигідрорибофлавіном була на такому ж рівні, як і у деяких облигатних аеробів, наприклад, у *B. circulans*, *Bacillus brevis*, *Bacillus mesentericus*, *S. lividans*. Лише у мікроаерофільної бактерії *E. coli* фосфорилування відновленої форми рибофлавіну відбувалося значно ефективніше.

Таким чином, на основі проведених досліджень можна стверджувати, що у бактерій різних родів і видів у процесі біосинтезу флавінових коферментів як субстрат може використовуватись і рибофлавін, і 1,5-дигідрорибофлавін. В останньому випадку біосинтез флавінових коферментів у клітині має відбуватися з утворенням ФМН·Н₂, який може безпосередньо служити донором електронів у реакціях окисного фосфорилування без попереднього відновлення у складі флавопротеїнів.

Визначення активності рибофлавінкінази в еукаріотичних мікроорганізмів проводили переважно з окисненою формою субстрату. Лише в 11 штамів дріжджів було визначено активність ферменту з 1,5-дигідрорибофлавіном. Вимірювання активності цього ферменту у 37 штамів дріжджів різної родової та видової належності (табл. 2) показало, що, по-перше, рівень активності рибофлавінкінази в еукаріотичних мікроорганізмів є в основному вищий порівняно з прокаріотами, по-друге, він може коливатися у ширших межах, ніж у бактерій, по-третє, спостерігалися суттєві відмінності у значеннях активності ферменту серед штамів одного виду і, по-четверте, активність рибофлавінкінази при фосфорилуванні 1,5-дигідрорибофлавіну у досліджених штамів була незначно нижчою, ніж при фосфорилуванні рибофлавіну (за винятком штаму *Candida famata*, у якого ця активність була майже удвічі меншою).

Найнижчу для цієї групи мікроорганізмів активність рибофлавінкінази було виявлено в екстрактах дріжджів роду *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* 71B-1122), деяких видів роду *Candida* (*C. pseudotropicalis* ВКПМ Y-209), а також у *Schwanniomyces occidentalis* ВКМ Y-673 і *Kluyveromyces lactis* ВКМ Y-1527: від 9,2 до 23,0 мкЕ/мг білка. Найвищою активністю характеризувалися штам *Hansenula polymorpha* ВКПМ Y-201 (1400,4 мкЕ/мг білка) і промисловий штам *Candida maltosa* (528,0 мкЕ/мг білка).

Не було виявлено очікуваної високої активності рибофлавінкінази у флавіногенних дріжджів *Candida flarerii* і *P. guilliermondii* [17] порівняно з іншими видами дріжджів, що не мають здатності до надсинтезу флавінів.

Висока активність рибофлавінкінази характерна для дріжджів, здатних до утилізації метанолу (*Candida boidinii*, *H. polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia pinus*) і парафінів (*C. maltosa*, *Candida sake*, *Candida parapsilosis*, *P. guilliermondii*). З літератури відомо, що у деяких штамів метилотрофних дріжджів, таких як *Kloeckera* sp. N 2201 [33] і *H. polymorpha* CBS 4732 [18], при культивуванні з глюкозою активність рибофлавінкінази була низькою і перебувала на рівні 17–18 мкЕ/мг білка, та значно зростала при вирощуванні дріжджів на метанолі. Відомо [10], що перший етап утилізації метанолу у метилотрофних дріжджів каталізує алкогольоксидаза – ФАД-залежний фермент, що містить 8 молекул ФАД/моль ферменту. Кількість цього ферменту в клітинах дріжджів при використанні метанолу як єдиного джерела вуглецю може досягати 40% внутрішньоклітинного білка. Очевидно, індукція ферментів біосинтезу флавінових нуклеотидів забезпечує потреби клітин таких дріжджів у коферментах.

У наших експериментах (табл. 2) активність ферменту в біомасі дріжджів *C. maltosa* і *H. polymorpha* ВКПМ Y-201, які вирощувалися в промислових умовах при безперервному культивуванні на парафінах нафти і метанолі відповідно, була найвищою серед усіх досліджених штамів дріжджів. Такі біомаси можуть служити хорошим джерелом для виділення рибофлавінкінази.

Таблиця 2. Активність рибофлавінкінази у дріжджів

Table 2. Riboflavin kinase activity in yeasts

| № | Штам дріжджів | Питома активність, мкЕ/мг білка | |
|----|--|---------------------------------|---------------------------|
| | | з рибофлавіном | з 1,5-дигідрорібофлавіном |
| 1 | <i>Candida boidinii</i> ВСБ-719 | 246,2 | – |
| 2 | <i>C. boidinii</i> T-2A | 84,0 | 6,0 |
| 3 | <i>C. famata</i> ВКМ 18 | 75,0 | 39,0 |
| 4 | <i>C. flarerii</i> 18 | 75,1 | – |
| 5 | <i>C. krusei</i> ВКПМ Y-202 | 107,0 | – |
| 6 | <i>C. maltosa</i> ВСБ-774 | 186,4 | 178,3 |
| 7 | <i>C. maltosa</i> ¹ | 528,0 | – |
| 8 | <i>C. parapsilosis</i> ВКПМ Y-262 | 242,0 | – |
| 9 | <i>C. pseudotropicalis</i> ВКПМ Y-209 | 18,5 | 18,5 |
| 10 | <i>C. sake</i> ВКПМ Y-194 | 175,6 | – |
| 11 | <i>C. tropicalis</i> ИБФМ Y-303 | 49,2 | – |
| 12 | <i>C. utilis</i> 106 | 58,1 | – |
| 13 | <i>Debaryomyces hansenii</i> ВКМ Y-102 | 98,0 | – |
| 14 | <i>Hansenula anomala</i> ВКМ Y-611 | 103,0 | – |
| 15 | <i>H. beijerinckii</i> ВКМ Y-1403 | 85,0 | – |
| 16 | <i>H. polymorpha</i> ВКПМ Y-140 | 101,0 | – |
| 17 | <i>H. polymorpha</i> ВКПМ Y-201 | 135,1 | 116,2 |
| 18 | <i>H. polymorpha</i> ВКПМ Y-201 ² | 1400,4 | – |
| 19 | <i>H. polymorpha</i> ВКПМ Y-926 | 192,6 | – |
| 20 | <i>H. polymorpha</i> ML3 | 64,0 | – |
| 21 | <i>H. polymorpha</i> ML6-D | 132,0 | – |
| 22 | <i>H. polymorpha</i> ML8 | 116,3 | – |
| 23 | <i>H. polymorpha</i> ML9 | 94,4 | 86,1 |
| 24 | <i>H. sirvicola</i> ВКМ Y-1224 | 57,5 | – |
| 25 | <i>H. wingei</i> ВКМ Y-1398 | 114,4 | – |
| 26 | <i>Kluyveromyces lactis</i> ВКМ Y-1527 | 10,5 | 9,5 |
| 27 | <i>Pichia guilliermondii</i> ATCC 9058 | 124,8 | 96,4 |
| 28 | <i>P. ohmeri</i> ВКМ Y-1255 | 65,0 | – |
| 29 | <i>P. pastoris</i> GS 115 | 195,0 | – |
| 30 | <i>P. pinus</i> F4 | 295,2 | – |

Продовження табл. 2

| | | | |
|----|--|------|------|
| 31 | <i>P. pinus</i> 1031 | 85,2 | 74,0 |
| 32 | <i>Saccharomyces bayanus</i> EC-1118 | 16,3 | 9,8 |
| 33 | <i>S. cerevisiae</i> LK-14 ³ | 34,0 | – |
| 34 | <i>S. cerevisiae</i> 71B-1122 | 9,2 | 6,8 |
| 35 | <i>Schwanniomyces occidentalis</i> ВКМ Y-673 | 23,0 | – |
| 36 | <i>Williopsis saturnus</i> ВКМ H-176 | 54,7 | – |
| 37 | <i>Zygowillia pastori</i> ВКМ Y-513 | 97,0 | – |

Примітка. „–“ – активність не визначали.

Культури № 2, 19, 21, 22 – одержані від Ю. Г. Капульцевича (ВНДІ Генетика, Москва).

Культури № 3, 11 – з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Культури № 20, 29, 30 – з колекції культур мікроорганізмів відділу регуляції синтезу низькомолекулярних сполук Інституту біології клітини НАН України (Львів).

Культури № 28 – одержана від Д. Крегга (Keck Graduate Institute, CA, USA).

Культури № 31–34 – одержані з фірми „Lallemand inc” (Монреаль, Канада).

1 – промислова біомаса заводу БВК (Новополоцьк, Беларусь).

2 – промислова біомаса НВО „Масма” (Дрогобич).

3 – промислова біомаса ЗАТ „Ензим” (Львів).

Проведення квантово-хімічних розрахунків тривимірної структури молекул рибофлавіну та 1,5-дигідрорибофлавіну показало (рис. 1, табл. 3), що ці сполуки відрізняються не лише хімічною структурою, але й просторовою конфігурацією ізоалоксазинового кільця, і особливо бокового D-рибітильного ланцюга. Оскільки фосфорилування рибофлавіну, що каталізує рибофлавінкіназа, відбувається по термінальній гідроксильній групі D-рибітильного бокового ланцюга, то виникає запитання, чи здатний один фермент каталізувати фосфорилування настільки відмінних за просторовою конфігурацією субстратів. Так, у дріжджів *Pichia guilliermondii* було виявлено термостабільну рибофлавінкіназу та проведено її очистку до гомогенного стану [5, 14]. За деякими кінетичними параметрами цей фермент суттєво відрізнявся від

Таблиця 3. Квантово-хімічні розрахунки тривимірної структури окисненої та відновленої форм рибофлавіну

Table 3. Quantum chemical calculation of three-dimensional model of structure of oxidized and reduced forms of riboflavin

| Атом | Рибофлавін | | 1,5-Дигідрорибофлавін | |
|------|---|---|---|---|
| | Відстань до атома кисню термінальної гідроксильної групи рибітилу, нм | Тілесний кут між зв'язком* і О-Н зв'язком термінальної гідроксильної групи рибітилу | Відстань до атома кисню термінальної гідроксильної групи рибітилу, нм | Тілесний кут між зв'язком* і О-Н зв'язком термінальної гідроксильної групи рибітилу |
| C7 | 9,002 | 4,2° | 7,448 | 178,3° |
| C8 | 7,703 | | 6,459 | |
| N3 | 9,532 | 141,1° | 9,511 | 174,4° |
| C2 | 8,310 | | 8,770 | |

Примітка. * атомів C7 і C8 і відповідно N3 і C2

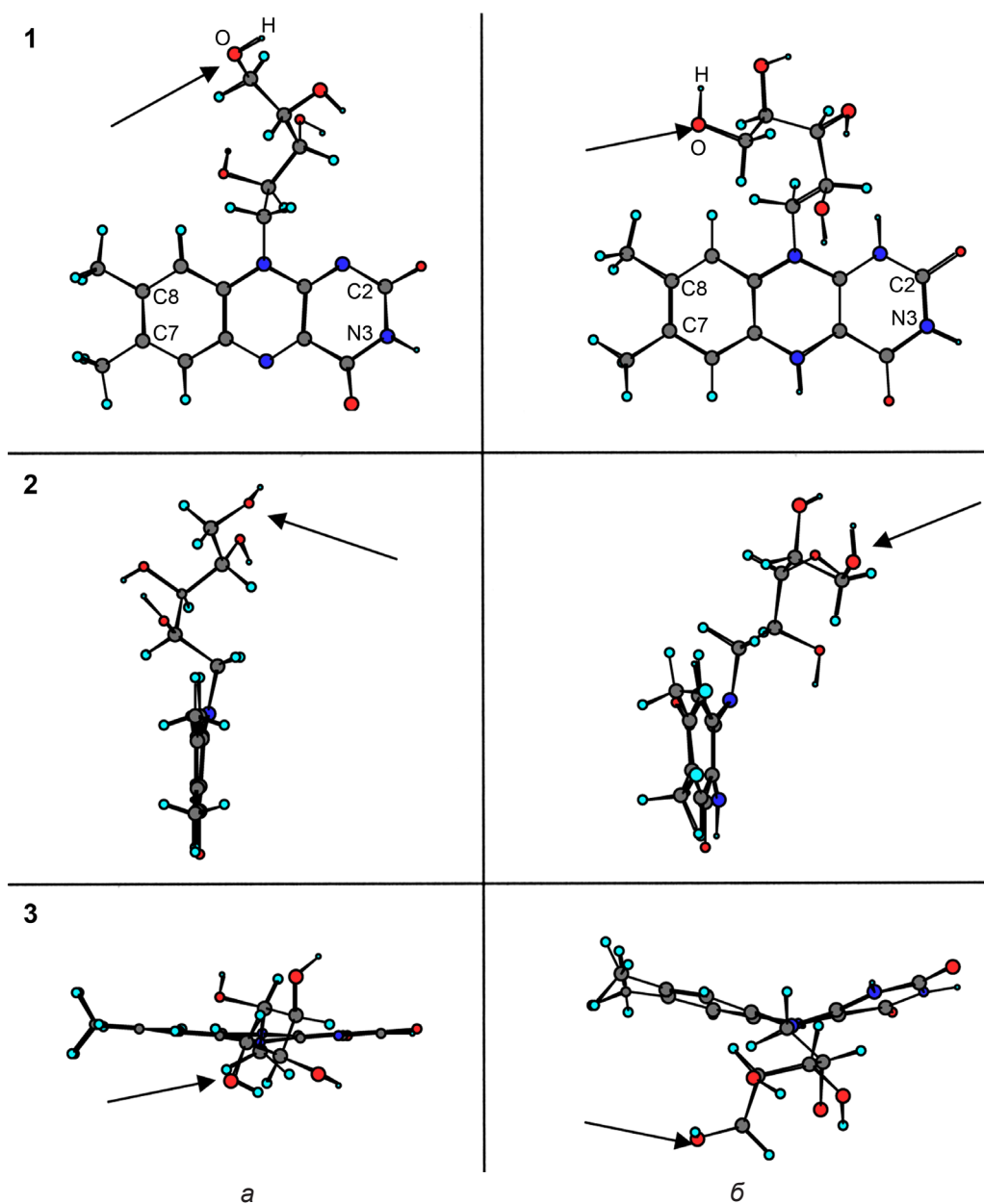


Рис.1. Просторова конфігурація рибофлавіну (а) і 1,5-дигідрорибофлавіну (б) у фронтальній (1), профільній (2) і горизонтальній (3) проєкціях ізоалоксазинового кільця по осі N_5-N_{10} піразинового циклу. Стрілками показано просторове розміщення термінальної гідроксильної групи бокового D-рибітильного ланцюга

Fig.1. Three-dimension models of riboflavin (a) and dihydroriboflavin (б) in front (1), profile (2) and horizontal (3) projections isoalloxasine ring from N_5-N_{10} axis of pyrasine cycle. The arrows indicate of terminal hydroxyl group of branch D-ribose chain

раніше описаного [6]. Термостабільна рибофлавінкіаза проявила вищу активність при фосфорилуванні відновленої форми рибофлавіну порівняно з окисненою [13]. Однак у секвенованих геномах різних дріжджів знайдено лише один ген, який кодує рибофлавінкіазу [10]. Можливо, множинні форми рибофлавінкіази є результатом посттрансляційної модифікації продукту одного гена.

Серед грибів (табл. 4) високою питомою активністю рибофлавінкіази володіли *A. gossypii* і *E. ashbyii* – відомі промислові продуценти рибофлавіну та ФАД відповідно.

Таблиця 4. Активність рибофлавінкіази у плісневих грибах

Table 4. Riboflavin kinase activity in molds

| № | Штам гриба | Питома активність, мкЕ/мг білка |
|---|---|---------------------------------|
| 1 | <i>Ashbya gossypii</i> ВКМ F-1398 | 380,3 |
| 2 | <i>Aspergillus awamori</i> 120/177 ¹ | 39,0 |
| 3 | <i>A. nidulans</i> ВКМ F-763 | 48,2 |
| 4 | <i>A. niger</i> ВКМ F-1119 | 52,1 |
| 5 | <i>Eremothecium ashbyii</i> ВНДІ Генетика 1906 | 1905,5 |
| 7 | <i>Neurospora crassa</i> ВКМ F-184 | 35,0 |
| 8 | <i>Penicillium canescens</i> ВКМ F-178 ² | 43,0 |
| 9 | <i>P. vitale</i> IV ³ | 173,7 |

Промислові біомаси:

1, 2 – НВО „Ензим” (Ладижин),

3 – ДП „Львівдіалік” (Львів).

Активність ферменту у *E. ashbyii* була співрозмірна з активністю, визначеною іншими дослідниками [7]. Деяко нижчу активність ферменту визначено у *Penicillium vitale* – промислового продуцента ФАД-залежної глюкозооксидази. Рибофлавінкіазна активність решти досліджених плісневих грибів була на рівні більшості представників бактерій.

ВИСНОВКИ

Проведено дослідження активності рибофлавінкіази у різних представників бактерій, дріжджів і плісневих грибів, у тому числі і у промислових біомасах низки біотехнологічних виробництв. Активність рибофлавінкіази в еукаріотичних мікроорганізмів була здебільшого вищою, порівняно з прокаріотами. Найбільшу активність серед 69 досліджених мікроорганізмів мали штам плісневого гриба *E. ashbyii* ВНДІ Генетика 1906, штами дріжджів *S. maltosa* і *H. polymorpha* ВКПМ Y-201, які вирощувалися в промислових умовах при безперервному культивуванні на парафінах нафти і метанолі відповідно.

Здійснено квантово-хімічні розрахунки тривимірної моделі молекул рибофлавіну й 1,5-дигідрорибофлавіну і встановлено суттєві відмінності у їхній просторовій конфігурації, що дає змогу припустити існування різних форм ферментів, здатних фосфорилувати окиснену та відновлену молекули рибофлавіну. Показано, що субстратом ферменту в досліджених штаммах бактерій і дріжджів може бути як рибофлавін, так і 1,5-дигідрорибофлавін і відповідно продуктами – ФМН і ФМН·Н₂.

1. Бреслер Е.Г., Перумов Д.А., Глазунов Е.А. и др. Исследование оперона биосинтеза рибофлавина у *Vacillus subtilis*. ХП. Определение содержания АТФ:рибофлавин-5'-фосфотрансферазы и рибофлавинсинтетазы в клетках с различным генотипом. **Генетика**, 1977; 13 (5): 880–887.
2. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А. и др. **Определитель актиномицетов**. Москва: Наука, 1983. 248 с.
3. Глазер В.М., Каменева С.В., Митронова Т.Н. **Большой практикум по генетике микроорганизмов**. Москва: МГУ, 1985. 92 с.
4. Кащенко В.Е., Преображенская Е.Н., Шавловский Г.М. Способ получения флавинононуклеотида и его аналогов. АС СССР № 1531494, 1989.
5. Кащенко В.Е., Фаюра Л.Р., Сибирный А.А. Обнаружение у дрожжей *Pichia guilliermondii* термостабильной рибофлавинкиназы и исследование её свойств. **Биохимия**, 1996; 61 (9): 1586–1595.
6. Кащенко В.Е., Шавловский Г.М. Очистка и свойства рибофлавинкиназы дрожжей *Pichia guilliermondii*. **Биохимия**, 1976; 41(2): 376–383.
7. Колтун Л.В., Шавловский Г.М., Кащенко В.Е., Трач В.М. Изменение активности некоторых ферментов флавиногенеза в процессе культивирования гриба *Ermothecium ashbyii*. **Микробиология**, 1984; 53 (1): 43–47.
8. Кучерас Р.В., Билинская И.С., Гирна О.В. Биогенетические взаимосвязи между флавином и витамином В₁₂ у *Achromobacter cobalamini*. **Микробиолог. журнал**, 1988; 50 (3): 46–49.
9. Кучерас Р.В., Гебгардт А.Г. Влияние аминокислот на кобамидсинтетическую активность *Propionibacterium shermanii*. **Приклад. биохимия и микробиология**, 1972; 8 (3): 341–346.
10. Сибирний А.А., Федорович Д.В., Борецький Ю.Р., Вороновський А.Я. **Мікробний синтез флавінів**. Київ: Наукова думка, 2006. 191 с.
11. Соловьёва И.М., Кренева Р.А., Полануер Б.М. и др. Субклонирование и биохимическая идентификация гена *ribR* у *Vacillus subtilis*. **Генетика**, 1998; 34 (6): 839–842.
12. Соловьёва И.М., Тарасов К.В., Перумов Д.А. Основные характеристики монофункциональной флавокиназы *Vacillus subtilis*. **Биохимия**, 2003; 68 (2): 212–217.
13. Фаюра Л.Р. Множинні молекулярні форми рибофлавінкінази у дріжджів. Автореф. ... канд. дис. Львів, 1997. 23 с.
14. Фаюра Л.Р., Кащенко В. Є. Термостабільна рибофлавінкіназа у дріжджів *Pichia guilliermondii*. **Укр. біохім. журнал**, 1997; 69 (1): 21–25.
15. Шавловский Г.М., Жарова В.П., Щелекова И.Ф. и др. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondii*. **Приклад. биохимия и микробиология**, 1978; 14 (2): 184–189.
16. Шавловский Г.М., Кащенко В.Е. Определение рибофлавинкиназной активности дрожжей. **Укр. биохим. журнал**, 1975; 47 (4): 536–541.
17. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М., Струговщикова Л.П., Кащенко В.Е. Биосинтез флавинов и его регуляция у дрожжей *Pichia guilliermondii*. **Укр. биохим. журнал**, 1975; 47 (5): 649–660.
18. Brook A.J., Dijkhuizen L., Harder W. Regulation of flavin biosynthesis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Arch. Microbiol**, 1986; 145 (1): 62–70.
19. Efimov I., Kuusk V., Zhang X., McIntire W.S. Proposed steady-state kinetic mechanism for *Corynebacterium ammoniagenes*. FAD-synthetase produced by *Escherichia coli*. **Biochemistry**, 1998; 37: 9716–9723.
20. Francisco J., Sandoval and Sanja Roje. An FMN Hydrolase is Fused to a Riboflavin Kinase Homolog in Plants. **J. Biol. Chem**, 2005; 280(46): 38337–38345.
21. Kearney E.B., Englard S. The enzymatic phosphorylation of riboflavin. **J. Biol. Chem**, 1951; 193(2): 821–834.

22. Kearney E.B., Goldenberg J., Lipsick J., Perl M. Flavokinase and FAD-synthetase from *Bacillus subtilis* for reduced flavins. **J. Biol. Chem.**, 1979; 254 (19): 9551–9557.
23. Mack M., van Loon A.P., Hohmann H.P. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/riboflavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *rib C*. **J. Bacteriol.**, 1998; 180: 950–955.
24. Manstein D.J., Pai E.F. Purification and characterization of FAD synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. **J. Biol. Chem.**, 1986; 261 (34): 16169–16173.
25. Mashhadi Z., Zhang H., Xu H., White R.H. Identification and Characterization of an Archaeon-Specific Riboflavin Kinase. **J. Bacteriol.**, 2008; 190 (7): 2615–2618.
26. Mayhew S.G., Wassink J.H. A continuous fluorometric assay for flavokinase. Properties of flavokinase from *Peptostreptococcus elsdenii*. **Biochim. Biophys. Acta**, 1977; 482 (2): 341–347.
27. Muller F. Free flavins: synthesis, chemical and physical properties. **Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes** / Ed. by F. Muller. CRC Press Boca Raton. 1991. Vol. 1: 1–71.
28. Nakagawa S., Igarashi A., Ohta T. et al. Nucleotide sequence of the FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its expression in *Escherichia coli*. **Biosci. Biotechnol. and Biochem.**, 1995; 59: 694–702.
29. Nakano H., McCormick P. Stereospecificity of the metal-ATP complex in flavokinase from rat small intestine. **J. Biol. Chem.**, 1991; 266: 22125–22128.
30. Nielsen P., Rauschenbach P., Bacher A. Phosphates of riboflavin and riboflavin analogs: a reinvestigation high-performance liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, 1983; 130 (2): 359–369.
31. Oya N. Riboflavin kinase. Flavinadenine dinucleotide pyrophosphorylase. Subcellular distributions of riboflavin kinase and FAD pyrophosphorylase in *Escherichia coli*. **Vitamins**, 1968; 38 (1): 50–54.
32. Santos M.A., Jimenez A. Revuelta Jose L. Molecular Characterization of FMN 1, the Structural Gene for the monofunctional Flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, 2000; 275 (37): 28618–18624.
33. Shimizu S., Ishida M., Kato N. et al. Derepression of FAD pyrophosphorylase and flavin changes during growth of *Kloeckera* sp. N 2201 on methanol. **Agric.-Biol. Chem.**, 1977; 41 (11): 2215–2220.
34. Snoswell A.M. Flavokinase of *Lactobacillus arabinosus* 175. **Austral. J. Exp. Biol. and Med. Sci.**, 1957; 35 (5): 427–436.
35. Solovieva J.M., Kreneva R.A., Lopes L.E., Perumov P.A. The riboflavin kinase encoding gene *rib R* of *Bacillus subtilis* is a part of a 10 kb operon, which is negatively regulated by the *yrz C* gene product. **FEMS Microbiol. Lett.**, 2005; 243: 51–58.
36. Enzyme nomenclature database. <http://www.expasy.ch/enzyme/>.

SCREENING OF RIBOFLAVIN KINASE ACTIVITY IN MICROORGANISMS

I. S. Bilinska¹, L. R. Fayura², I. O. Mukalov², V. E. Kashchenko²

¹Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

²Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

The riboflavin kinase activity was measured in different species of bacteria, yeasts and molds. The activity of enzyme in eucaryotic microorganisms was mainly higher comparing to procaryotes. It was shown that bacterial and yeasts riboflavin kinases of investigated strain besides riboflavin can utilize its reduced form – 1,5 dihydroriboflavin

as a substrate. Quantum chemical calculation of three-dimensional model of structure of oxidized and reduced form of riboflavin showed substantial differences in their configuration. No correlation between the activity of riboflavin kinase and dihydroriboflavin kinase in obligate aerobes and microaerophiles was observed.

Key words: riboflavin kinase, dihydroriboflavin kinase, bacteria, yeasts, molds.

СКРИНИНГ АКТИВНОСТИ РИБОФЛАВИНКИНАЗЫ У МИКРООРГАНИЗМОВ

И. С. Билинская¹, Л. Р. Фаюра², И. О. Мукалов², В. Е. Кащенко²

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевського, 4, Львов 79005, Украина

²Институт биологии клетки НАН Украины
ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

Исследована активность рибофлавинкиназы у различных представителей бактерий, дрожжей и плесневых грибов. Активность фермента у эукариотических микроорганизмов в основном была выше, чем у прокариотов. Показано, что субстратом фермента у исследованных бактерий и дрожжей, кроме рибофлавина, является и его восстановленная форма – 1,5-дигидрорибофлавин. Проведены квантово-химические расчёты трёхмерной структуры окисленной и восстановленной форм рибофлавина. Не обнаружены существенные различия среди уровней активности рибофлавинкиназы и дигидрорибофлавинкиназы у облигатно аэробных и микроаэрофильных бактерий.

Ключевые слова: рибофлавинкиназа, дигидрорибофлавинкиназа, бактерии, дрожжи, плесневые грибы.

Одержано: 26.06.2009