

Л. Г. АНАНЯН, М. А. ДАВТЯН

ПУТИ КАТАБОЛИЗМА АРГИНИНА У МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ РОДА LACTOBACTERIUM

Исследовался обмен аргинина у некоторых представителей *Lactobacterium lactis*. Обнаружена высокая аргиназная активность как в целых клетках, так и в бесклеточных экстрактах, в последних сравнительно больше.

В бесклеточных экстрактах выявлены два пика активности аргининдезимидазы при рН 5,8 и 9,5, а также заметная активность цитруллиназы при 5,8. Присутствие последней представляет особый интерес, ибо реакция сопровождается синтезом АТФ.

Биохимии молочнокислых бактерий посвящено немало работ, однако многие вопросы аминокислотного обмена у этих микроорганизмов изучены весьма недостаточно. Между тем жизнедеятельность этих бактерий протекает в среде, богатой белками и аминокислотами, и, следовательно, изучение обмена аминокислот в последних является актуальным.

Целью нашей работы было изучение некоторых сторон обмена аргинина молочнокислых бактерий.

Известно несколько разных реакций превращений аргинина: гидролитическое расщепление под влиянием аргиназы, трансамидинирование с ϵ -аминокислотами, дезамидирование с образованием цитруллина с дальнейшим превращением последней под влиянием цитруллиназы в орнитин.

В настоящей работе нами исследовалась активность аргиназы, аргининдезимидазы и цитруллиназы.

Имеются соответствующие исследования на *Streptococcus faecalis*. У этих бактерий доказано присутствие аргининдезимидазы, цитруллиназы и отсутствие аргиназы [7, 11, 12, 18, 19].

Материал и методика. Объектом исследования служили гомоферментативные палочковидные бактерии рода *Lactobacterium*, вид *lactis* (№ 1694, 2296, 2955). Штаммы получены из музея сектора микробиологии проблемной лаборатории кафедры молочного дела ЕрЗВИ.

Культуру выращивали по ранее разработанной методике [1].

Аргиназная активность определялась в преларатах путем инкубирования последних при рН 37° в течение 90 мин (глициновый буфер 0,2 М, рН 9,5) в присутствии L-аргинина 50 мкмоль) и $MnCl_2$ (5 мкмоль) с последующим определением образовавшейся мочевины уреаэным методом [16]. Активность определялась как в клеточных суспензиях бактерий, так и в бесклеточных экстрактах. Для получения последних биомасса молочнокислых бактерий подвергалась гомогенизации в микроизмельчителе в присутствии стеклянных бусинок Баллотини, после чего гомогенат центрифугировался при 5000g в течение 10 мин. Полученная надосадочная жидкость использовалась в качестве бесклеточного экстракта.

Активность аргининдегидрогеназы определялась в препаратах путем инкубирования в течение 60 мин (фосфатный буфер 0,2 М) в присутствии L-аргинина (50 мкмоль), $MgSO_4$ (20 мкмоль) при разных значениях pH с последующим определением аммиака. Активность цитруллиназы определялась инкубированием препаратов в течение 60 мин (фосфатный буфер 0,2 М) при $t^\circ=37^\circ C$ с pH 5,8 в присутствии DL-цитруллина (20 мкмоль), АТФ (6 мкмоль) и $MgSO_4$ (20 мкмоль) с последующим определением образовавшегося аммиака.

Определение аммиака производилось микродиффузионным методом [4, 17]. Белок определялся методом Лоури [13].

Активность ферментов выражалась в мкмольях образовавшихся продуктов на 100 мг сухих бактерий или на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение. Приведенные в табл. 1 данные показывают, что целые клетки *L. lactis* 1694 обладают высокой аргиназной активностью.

Таблица 1
Активность аргиназы в целых клетках *L. lactis* 1694

№ опы- тов	Количество биомассы, мг	Количество белка в био- массе, %	Активность, мкмоль на 100 мг биомассы	Удельная активность
38	154,6	89,06	131,1	1,43
			130,9	1,47
62	216,0	89,06	138,7	1,55
			115,7	1,29
63	228,5	89,06	141,5	1,97
			176,1	1,81

В литературе мы не встречали данных о наличии аргиназы у молочнокислых бактерий. В исследованиях Бригс [9] изучение расщепления NH_3 из аргинина проводилось в таксономических целях без изучения механизма данного процесса. По некоторым данным [6], аргиназная активность отсутствует в бактериальных суспензиях *Str. faecalis*.

Полученные нами данные являются дополнительным доказательством широкой биологической распространенности аргиназы [2, 10].

Наши исследования показали, что в бесклеточных экстрактах испытуемых штаммов *L. lactis* (1694, 2296, 2955) имеется аргиназная активность, которая выражена у отдельных штаммов в различной степени (табл. 2). Штаммы 1694 и 2955 обладают более выраженной аргиназной активностью, чем штамм 2296.

По удельной активности аргиназы исследованные штаммы можно расположить в следующем порядке: 1694 \geq 2955 > 2296.

Аргиназная активность в бесклеточном экстракте выражена больше по сравнению с таковой в целых клетках. Это становится особенно наглядным, если учесть, что при гомогенизации разрушается небольшая часть клеток, о чем свидетельствуют приведенные в табл. 1 данные о содержании белка в клеточной суспензии и в бесклеточном экстракте (табл. 2).

Таблица 2

Активность аргиназы в бесклеточных экстрактах различных штаммов *L. lactis*

Культура	№ опытов	Количество биомассы, мг	Количество белка в бесклеточном экстракте, мг	Активность, мкмоль на 100 мг биомассы	Удельная активность
№ 1694	2	151,1	11,03	81,33	11,14
	4	199,2	18,19	145,50	15,38
	9	216,0	12,30	70,87	12,44
№ 2955	10	175,0	25,90	127,71	8,63
	11	216,7	14,54	106,43	15,81
	14	181,0	18,35	126,96	12,52
№ 2296	12	155,0	25,97	21,73	1,29
	16	191,0	34,88	25,31	1,42

Пока трудно прийти к определенному выводу об уреотелической или неуреотелической природе обнаруженной аргиназы [3, 4]. Для характеристики данной аргиназы большое значение имеет выявление и других ферментов орнитинового цикла в исследуемых бактериях.

Не исключено совместное присутствие обеих форм аргиназы. Для окончательного вывода необходимы дальнейшие исследования.

С целью выявления оптимальных условий аргининдезимидазной активности в бесклеточных экстрактах *L. lactis* 1694 нами был применен ряд методических приемов гомогенизации биомассы в фосфатном буфере с рН 5,8 (табл. 3), а также изучалось влияние инкубирования препаратов при разных значениях рН (рисунок).

Таблица 3

Активность аргининдезимидазы в бесклеточном экстракте *L. lactis* 1694 с рН 5,8

№ опытов	Количество биомассы, мг	Количество белка в бесклеточном экстракте, мг	Активность, мкмоль на 100 мг биомассы	Удельная активность
13 ¹	145,5	14,25	1,87	0,19
15 ¹	201,0	—	1,58	—
29 ²	201,0	8,30	2,49	0,60
28 ²	207,5	22,62	4,57	0,42
30 ⁴	165,9	21,39	7,99	0,62
31 ⁵	176,1	18,83	6,29	0,57
32 ⁵	166,0	30,32	3,72	0,20
33 ⁵	162,5	20,56	5,79	0,45

1—гомогенизация с бусинками Баллотини.

2—гомогенизация с кварцевым песком.

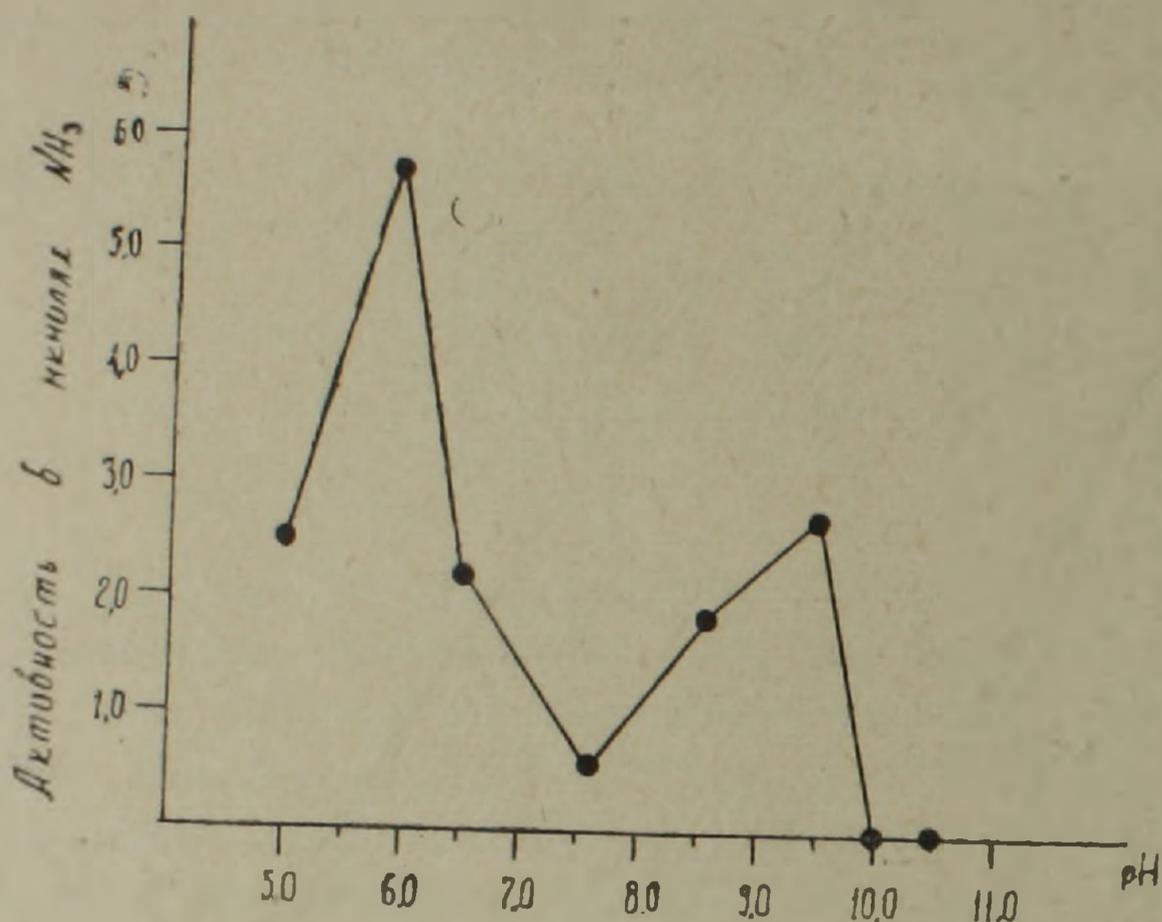
3—гомогенизация с Al_2O_3 в ступке.

4—гомогенизация с Al_2O_3 с одновременным охлаждением смесью соль+лед.

5—гомогенизация с Al_2O_3 в стеклянном гомогенизаторе.

Анализы показали, что гомогенизация с Al_2O_3 путем растирания в ступке с одновременным охлаждением и гомогенизация с Al_2O_3 в стеклянном гомогенизаторе дают наибольший выход активности фермента.

При рН 9,5 также обнаружена некоторая активация данного фермента, которая, однако, в 2 раза меньше по сравнению с таковой при рН 5,8. Для подтверждения наличия активности и при рН 9,5 нами была исследована активность аргининдезимидазы в глициновом и глициново-фосфатном буферах при рН 9,5.



Анализ опытов дал положительный результат (табл. 4). Таким образом, данные опытов показали наличие двух пиков у исследуемого фермента при рН 5,8 и 9,5 (рисунок). Это позволило сделать предположение о присутствии двух форм аргининдезимидазы.

Таблица 4

Активность аргининдезимидазы в бесклеточном экстракте *L. lactis* 1694 в разных буферных средах с рН 9,5

№ опытов	Количество биомассы, мг	Количество белка в бесклеточном экстракте, мг	Активность, мкмоль на 100 мг биомассы	Удельная активность
37 ¹	154,6	10,33	4,64	0,69
54 ²	258,0	95,00	1,06	0,01
55 ²	211,5	89,60	3,38	0,03
61 ²	226,0	66,00	1,41	0,02

1 — глициновый буфер.

2 — глициновый + фосфатный буфер.

По одним данным [19], оптимальная активность аргининдезимидазы у *Str. faecalis* обнаружена при рН 5,8, по другим [15] — при рН 6,5.

Изучение активности цитруллиназы (орнитинтранскарбамилазы) в бесклеточном экстракте *L. lactis* 1694 показало (табл. 5), что этот штамм обладает заметной активностью цитруллиназы при заданной рН 5,8, что совпадает с литературными данными в отношении *Str. faecalis* в диализированных бесклеточных экстрактах [19].

Таблица 5
Активность цитруллиназы в бесклеточном экстракте *L. lactis* 1694

№ опытов	Активность, мкмоль на 100 мг биомассы	Удельная активность
18	6,93	0,47
20	10,27	0,88
25	10,55	—
26	15,20	—
27	9,04	—
34	4,36	0,28
35	9,16	0,86

С другой стороны, по данным Маршолл и Коэна [14], оптимальная активность орнитинтранскарбамилазы (цитруллиназы) у изучаемой культуры обнаруживается при pH 8,6.

Таким образом, в изучаемых бактериях установлена возможность расщепления аргинина как аргиназой, так и последовательным действием аргининдезимидазы и цитруллиназы. Наличие цитруллиназной реакции представляет особый интерес, ибо она сопровождается синтезом АТФ и в энергетическом отношении имеет исключительно большое значение для некоторых микроорганизмов [8]. Можно заключить, что эти реакции, по-видимому, играют определенную роль и в снабжении энергией молочнокислых бактерий, которые могут принимать аргинин в готовом виде из окружающей среды.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и проблемная
лаборатория сравнительной
и эволюционной биохимии

Поступило 5.III 1973 г

Լ. Փ. ԱՆԱՆՅԱՆ, Մ. Ա. ԳԱՎԹՅԱՆ

ԱՐԳԻՆԻՆԻ ԿԱՏԱԲՈՒԴՄԻ ՈՒՂԻՆԵՐԸ *LACTOBACTERIUM*
ՅԵՂԻ ԿԱԹՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՄՈՏ

Ա մ փ ո փ ու մ

Կաթնաթթվային բակտերիաների տարբեր ներկայացուցիչների մոտ ուսումնասիրվել են արգինինի փոխանակության մի քանի հատկությունները: Բոլոր հետազոտված ներկայացուցիչների մոտ հայտնաբերվել է բարձր արգինազային ակտիվություն, որը հատկապես բարձր է անբջիջ մզվածքներում:

Արգինինդեզիմիդազային զգալի ակտիվություն հայտնաբերվել է նաև անբջիջ մզվածքներում: Հավանաբար, հետազոտվող միկրոօրգանիզմները պարունակում են արգինինդեզիմիդազային երկու մուլեկուլյար ձևեր:

Հետազոտված կուլտուրաներում որոշակի հետաքրքրություն է ներկայացնում ցիտրուլինազային ակտիվության հայտնաբերման փաստը, քանի որ

այդ պրոցեսի ընթացքում սինթեզվում է ԱՏՖ: Ենթադրում ենք, որ արգինին դեզիմիդացային և ցիտրուլինազային սինթեզիաներն լակտոբակտերիաների համար ունեն էներգետիկ նշանակություն, որոնք արգինինը պատրաստի ձևով կարող են ստանալ աճման միջավայրից:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Անանյան Լ. Գ. Ученые записки ЕрГУ, 2, 56, 1970.
2. Դավթյան Մ. Ա. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 3, 273, 1967.
3. Դավթյան Մ. Ա., Бунятыан Г. Х., Баблоян Р. С., Петросян Л. А. II Всесоюзн. биохим. съезд (тезисы секции № 7), Ташкент, 1969.
4. Դավթյան Մ. Ա., Бунятыан Г. Х. Биохимия, 35, 412, 1970.
5. Силакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А. Вопросы медицинской химии, 8, 5, 538, 1969.
6. Храмов В. А., Галаев Ю. В. Лабораторное дело, 1, 50, 1971.
7. Akamatsu S., Sekine T. J. Biochem. (Japan), 38, 349, 1951.
8. Barker H. A. In the Bacteria, 2, ed. by Gunsalus J. C., Stanier R. J. New-York: Academic Press, 1961.
9. Briggs M. J. Gen. Microbiol., 9, 2, 234, 1953.
10. Cohen P. P., Brown G. W. Biochem. J., 75, 82, 1960.
11. Knivett V. A. Biochem. J., 50, 5, 30, 1952.
12. Knivett V. A. Biochem. J., 58, 480, 1954.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr J. A., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
14. Marschall M., Cohen P. K. P. J. Biol. Chem., 247, 6, 1641, 1972.
15. Petrack B., Sullivan L., Ratner S. Arch. Biochem. Biophys., 69, 186, 1957.
16. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem., 179, 1199, 1949.
17. Selingson D., Selingson H. J. Lab. Clin. Med. 38, 324, 1951.
18. Slade H. D., Stamp W. C. J. Bacteriol, 64, 4, 455, 1952.
19. Slade H. D. Arch. Biochem. Biophys, 42, 1, 204, 1953.