

Л. Г. АНАНЯН, М. О. АСАТРЯН, М. А. ДАВТЯН

ФЕРМЕНТЫ ОРНИТИНОВОГО ЦИКЛА У ПАЛОЧКОВИДНЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И СТРЕПТОКОККОВ

Исследована активность орнитинтранскарбамиллазы (арсенолиз), аргининосукцинат-синтезы, аргининосукцинат-лиазы и аргиназы у представителей двух видов, молочнокислых палочек (*Lactobacillus lactis* Bergey et al. 1934) и стрептококков *Streptococcus faecalis* Andrewes et Horder 906*. Как в палочках, так и кокках изученных бактерий обнаружена активность всех указанных ферментов. Выявлены определенные межштамбовые различия.

Ранее нами было установлено, что существует два пути катаболизма аргинина у молочнокислых палочек *Lactobacillus lactis*: под действием аргининдеиминыазы (L-аргинин-иминогидролаза, ЕС.3.5.3.6) и аргиназы (L-аргинин-амидиногидролаза, ЕС.3.5.3.1) [1]. Аргиназа была определена также и у стрептококков *Streptococcus faecalis* [2].

Аргининдегидролазный путь обмена аргинина под действием аргининдеиминыазы, цитруллиназы или цитруллин-уреидазы, карбаматкиназы (АТР: карбамат фосфотранс-фераза, ЕС.2.7.2.2.) рассматривается как механизм, обеспечивающий клетки энергией, так как при этом синтезируется АТФ.

Ферменты аргининдегидролазной системы, ответственные за расщепление цитруллина, идентичны с таковыми системы синтеза цитруллина в печени уреотелических животных и некоторых микроорганизмов [3].

Факт присутствия аргиназы у молочнокислых бактерий обусловил необходимость дальнейшего изучения ферментов обмена аргинина, что и явилось целью настоящей работы.

По литературным данным, в бактериальных суспензиях молочнокислых кокков *Streptococcus faecalis* аргиназа отсутствует [4, 5], в то время как у молочнокислых палочек *Lactobacillus lactis* 1694, 2296, 2955 и стрептококков *Str. faecalis* 2187 как в бесклеточных экстрактах, так и в интактных клетках она выявлена [1, 2].

Материал и методика. Объектом исследований служили молочнокислые палочки семейства *Lactobacillaceae* Winslow et al. 1917, *Lactobacillus lactis* 1694 и кокков *Streptococcaceae* Deibel et Seelèy 1974, *Streptococcus faecalis* 1976, 2187, 2453. Штаммы бактерий получены из музея сектора микробиологии проблемной лаборатории кафедры молочного дела Ер. ЗВИ.

* Названия бактерий приведены по книге:

Латинские названия бактерий и их синонимы. Под ред. Л. В. Қалакүцного. Москва—Ереван, 1977 (инф. бюл. ВМО, прил. 1).

Бактерии выращивались в анаэробных условиях при t 40° по методике, описанной ранее [6]. Наряду с полусинтетической средой использовалась также искусственная среда следующей прописи: гидролизат молока—100 мл, лактоза—1,2 г, NaCl—0,5 г, дрожжевой автолизат—5 мл, рН 6,4. Дезинтеграция выращенной биомассы проводилась в стеклянном дезинтеграторе типа Поттера-Эльвейгейма в присутствии Al_2O_3 в отношении 1:1 в течение 20 мин с использованием различных буферных сред для каждого исследуемого фермента.

В 1 мл дезинтеграта содержалось 40—60 мл сухих бактерий. Для освобождения от неразрушенных клеток и Al_2O_3 дезинтеграт центрифугировался при 5.000 g в течение 10—40 мин в зависимости от изучаемого фермента при t $4 \pm 1^\circ$.

Активность орнитинтранскарбамилазы (арсенолиз) определялась по методу Кребса с сотр. [3], путем инкубирования ферментного препарата (1 мл) в аэробных условиях в течение 60 мин при t 37,5° в водной среде с рН 7,1—7,2, содержащей L-цитруллин (100 мкМ), арсенат натрия (мышьяковокислый натрий—500 мкМ). Общий объем инкубационной смеси—3 мл. В контрольном варианте исключался L-цитруллин. Реакция останавливалась прибавлением 1,5 мл 15% ТХУ. Активность фермента выражалась в мкмольях отщепившегося NH_3 на 100 мг сухой биомассы. NH_3 определялся микродиффузионным методом [7] в модификации Силаковой с сотр. [8]. Удельная активность фермента выражалась в мкмольях активности фермента на мг белка. Белок определялся по методу Лоури [9].

Для одновременного определения активности аргининосукцинат-синтетазы и аргининосукцинат-лиазы был использован метод Ратнер, Паппас [10]. Исследования велись в 0,05 M калий-фосфатном буфере с рН 7,4. Инкубационная смесь в количестве 3,8 мл содержала 1 мл ферментного препарата, L-аспартат (20 мкМ), L-цитруллин (20 мкМ), АТФ (10 мкМ), $MgSO_4$ (5 мкМ), сукцинат (20 мкМ), аргиназу (1 мг), уреазу (0,25 мг). В контрольном варианте L-цитруллин исключался.

Инкубация проводилась в аэробных условиях при t 37° в течение 90 мин. Образовавшаяся при этом мочевины распадалась добавленной уреазой на NH_3 и CO_2 . Впоследствии определялось количество NH_3 вышеуказанным методом. Активность обоих ферментов выражалась в мкмольях образовавшейся мочевины на 100 мг сухой биомассы.

Аргиназная активность определялась по методу Ратнер и Паппас [10].

Был использован 0,04 M глициновый буфер с рН 9,5. Инкубационная смесь в количестве 3,2 мл содержала 1 мл ферментного препарата, L-аргинин·HCl (50 мкМ), $MnCl_2 \cdot 8H_2O$ (20 мкМ), глициновый буфер (1,5 мл), уреазу (0,25 мл). В контрольном варианте L-аргинин·HCl исключался. Инкубация проводилась в аэробных условиях в течение 90 мин при t 37°. Активность аргиназы выражалась в мкмольях мочевины на 100 мг сухой биомассы. NH_3 , выделенный при распаде мочевины под действием уреазы, определялся вышеуказанным методом [7].

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены суммированные данные об активности аргиназы у трех изучаемых штаммов, которая хорошо выражена как в интактных клетках, так и бесклеточных экстрактах. Выявлены штаммовые различия.

В предыдущих наших исследованиях цитруллиназа определялась в условиях фосфоролиза в бесклеточных экстрактах *L. lactis* 1694 [1]. Являясь, согласно литературным данным, вторым ферментом аргинин-дегидролазной системы катаболизма аргинина, она катализирует расщепление цитруллина ортофосфорной кислотой или арсенатом (арсенолиз).

Процесс фосфоролиза или арсенолиза обнаружен у некоторых микроорганизмов, например, *Str. faecalis* [11, 12, 13], *Str. lactis* [14], *Clostridium perfringens* [15], и впоследствии была доказана [3] идентич-

Таблица 1

Активность аргиназы у *Streptococcus faecalis*
молочнокислых палочек и стрептококков. Арсенолиз цитруллина

№ штам- мов	Интактные клетки		Бесклеточный экстракт	
	активность, мкМ на 100 мг биомассы	удельная активность	активность, мкМ на 100 мг биомассы	удельная активность
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
2187	141,55 ± 21,84	1,19 ± 0,256	26,46 ± 1,51	1,19 ± 0,795
1976	289,5 ± 4,92	3,25 ± 0,117	125,0 ± 12,8	6,45 ± 0,345
2453	67,76 ± 4,95	0,84 ± 0,061	31,33 ± 0,890	0,96 ± 0,153

ность цитруллиназы орнитинтранскарбамилазе (карбамил-фосфат: L-орнитин-карбоксилтрансфераза, ЕС.2.1.3.3). Для подтверждения факта присутствия орнитинтранскарбамилазы в исследуемых бактериях в бесклеточных экстрактах молочнокислых палочек *L. lactis* 1694 и стрептококков *Str. faecalis* 2453 проведен арсенолиз цитруллина (табл. 2).

Таблица 2

Активность орнитинтранскарбамилазы в бесклеточном экстракте
молочнокислых палочек и стрептококков. Арсенолиз цитруллина
(средние данные шести экспериментов)

Наименование бактерий	Активность, мкМ на 100 мг биомассы	Удельная активность
<i>Lactobacillus lactis</i> 1694	$M \pm m = 1,78 \pm 0,238$	$M \pm m = 0,126 \pm 0,016$
<i>Streptococcus faecalis</i> 2453	$M \pm m = 6,96 \pm 0,281$	$M \pm m = 0,380 \pm 0,022$

продуктами реакции которого являются орнитин, NH_3 , CO_2 . Сравнительный анализ арсенолиза выявил различия в активности орнитинтранскарбамилазы у представителей двух различных видов.

В следующей серии исследований мы исследовали биосинтез аргинина из цитруллина и аспартата, катализируемых аргининосукцинат-синтетазой (L-цитруллин: L-аспартат-лигаза АМФ, ЕС.6.3.4.5) и аргининосукцинат-лиазой (L-аргининосукцинат-аргинин-лиаза, ЕС.4.3.2.1) в бесклеточных экстрактах *L. lactis*, 1694 и *Str. faecalis* 2453 и 1976.

Биосинтез проводился в присутствии L-аспартата, L-цитруллина, АТФ, сукцината и MgSO_4 . В табл. 3 представлены данные об активности обоих ферментов у молочнокислых палочек, выращенных в различных средах, которые почти равноценны по своей питательной значимости.

В сравнительном аспекте определялась активность ферментов биосинтеза аргинина и у двух штаммов стрептококков (табл. 4). Обнаружены штаммовые различия как внутри вида, так и между видами разных семейств. Активность аргининосукцинат-синтетазы и аргининосукцинат-лиазы в среднем выражена сравнительно больше у *Str. faecalis*.

Таблица 3

Активность аргининосукцинат-синтетазы и аргининосукцинат-лиазы
в бесклеточном экстракте *Lactobacillus lactis* 1694
(средние данные шести экспериментов)

Питательная среда	Активность, мкМ на 100 мг биомассы	Удельная активность
Полусинтетическая	$M \pm m = 1,68 \pm 0,314$	$M \pm m = 0,062 \pm 0,013$
Искусственная	$M \pm m = 1,59 \pm 0,167$	$M \pm m = 0,060 \pm 0,022$

Таблица 4

Активность аргининосукцинат-синтетазы и аргининосукцинат-лиазы
в *Streptococcus faecalis* (средние данные шести экспериментов)

№№ штаммов	Активность, мкМ на 100 мг биомассы	Удельная активность
2453а	$M \pm m = 11,52 \pm 0,174$	$M \pm m = 0,334 \pm 0,048$
2453б	$M \pm m = 8,86 \pm 0,650$	$M \pm m = 0,400 \pm 0,044$
19766	$M \pm m = 0,492 \pm 0,08$	$M \pm m = 0,150 \pm 0,06$

а—бактерии культивировались на полусинтетической среде

б—на искусственной среде

Ряд микроорганизмов способен восполнить дефицит в аргинине орнитинном или цитруллином, что свидетельствует о наличии аргининосукцинат-синтетазы и аргининосукцинат-лиазы в клетке. Например, *Lactobacillus fermenti* и *Escherichia coli* используют или орнитин или цитруллин вместо аргинина; *L. arabinosus*, *L. casei* и *L. delbrückii* используют цитруллин, но не орнитин вместо аргинина; *Str. faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* не используют ни орнитин, ни цитруллин, но требуют аргинин. Эти данные говорят в пользу того, что синтез аргинина имеет место у многих молочнокислых бактерий [16].

Следует подчеркнуть, что в литературе отрицается присутствие указанных ферментов у *Str. faecalis* и *Leuconostoc mesenteroides* P-60 только по тому признаку, что цитруллин у этих бактерий не может заменить аргинин [17].

Наши данные убедительно показывают, что и у изученных бактерий представлены ферменты биосинтеза аргинина из цитруллина и аспартата.

Отдельные ферменты орнитинового цикла присутствуют у различных представителей микроорганизмов, но некоторые из них, как например *E. coli* [18], *N. crassa* [19], *S. cerevisiae* [20, 21], *Torulopsis utilis* [22], обладают полным комплексом ферментов орнитинового цикла Кребса-Гензеляйта [23].

Собственные исследования, а также имеющиеся литературные данные позволяют высказать мысль, что и у молочнокислых палочек, а также стрептококков, существуют ферментные системы орнитинового цикла Кребса-Гензеляйта. Для окончательного вывода нам предсто-

ит изучить наличие ферментативной возможности биосинтеза карбамилфосфата у указанных бактерий.

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

Поступило 27.XII 1976 г.

Լ. Գ. ԱՆԱՆՅԱՆ, Մ. Ն. ԱՍԱՏՐՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԻՅԱՆ

ՕՐՆԻՏԻՆԱՅԻՆ ՑԻԿԼԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԸ ԶՈՂԻԿԱԶԵՎ ԿԱԹՆԱԹՎԱՅԻՆ
ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԵՎ ՍՏՐԵՊՏԱԿՈԿԵՐԻ ՄՈՏ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հետազոտվել են օրնիտին-տրանսկարբամիլազայի (արսինոլիզ), արգինինսուկցինատ-սինթետազայի արգինինսուկցինատ-լիազայի և արգինազայի ակտիվությունները կաթնաթթվային բակտերիաների *Lactobacillus* և *Streptococcus* ցեղերի տարբեր ներկայացուցիչների մոտ: Վերջիններին կոկերի և ցուպիկներին, ինչպես բջջային սուսպենզիաներում, այնպես էլ ոչ բջջային մզվածքներում հայտնաբերված են բոլոր հետազոտված ֆերմենտների ակտիվությունները: Այս ցուցանիշների տեսակետից ցույց են տրված որոշակի միջշտամային տարբերություններ:

Օրնիտինային ցիկլի առկայության մասին վերջնական եզրակացության համար անհրաժեշտ են լրացուցիչ հետազոտություններ կարբամիլֆոսֆատի բիոսինթեզի վերաբերյալ նշված բակտերիաներում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ананян Л. Г., Давтян М. А. Биологический журнал Армении. 27, 4, 23, 1974.
2. Арутюнян Т. Г., Агаджанян А. Х., Ананян Л. Г., Семерджян Г. А., Геворкян А. С., Зорабян Т. Я., Хачатрян М. А. III Всесоюзный биохим. съезд. Реф. научн. со-общ., 1, Рига, октябрь, 1974.
3. Krebs H. A., Eggleston L. V., Kntvett V. A. Biochem. J., 59, 2, 185, 1955.
4. Hills G. M. Biochem. J., 34, 1057, 1940.
5. Храмов В. А., Галаев Ю. В. Лабораторное дело, 1, 50, 1971.
6. Ананян Л. Г. Уч. зап. ЕГУ, 2, 56, 1970.
7. Sellingson D., Sellingson H. J. Lab. Clin. Med. 38, 324, 1951.
8. Сулакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А. Вopr. мед. химии, 8, 5, 538, 1962.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr J. A., Randall R. J. J. Biol., Chem., 193, 265, 1951.
10. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem., 179, 1199, 1949.
11. Kntvett V. A. Biochem. J., 56, 4, 602, 1954.
12. Kntvett V. A. Biochem. J., 58, 480, 1954.
13. Slade H. D. Archiv. Biochem. Biophys. 42, 1, 204, 1953.
14. Korzenovsky M., Werkman C. H. Arch. Biochem. Biophys., 46, 175, 1953.
15. Schmidt G. C., Logan M. A., Tyttel A. A. J. Biol. Chem., 198, 771, 1952.
16. Volcani B. E., Snell E. E. J. Biol. Chem., 174, 3, 893, 1948.
17. Walker J. B. J. Biol. Chem., 204, 139, 1953.
18. Penninckx M., Stimon J. P., Wiame J. M. Eur. J. Biochem., 49, 2, 429, 1974.
19. Srb A. M., Horowitz N. H. J. Biol. Chem., 154, 129, 1944.
20. Cheman P. J., Cossins E. A. Plant Cell. Physiol., 14, 641, 1973.
21. Middelhoven W. J. Biochem. Biophys. Acta, 191, 1, 110, 1969.
22. Abelson P. H., Vogel H. J. J. Biol. Chem., 213, 1—2, 355, 1955.
23. Krebs H. A., Henseleit R. Z. Physiol. Chem., 210, 33, 1932.