

ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА L-ЦИТРУЛЛИНА
У ЛАКТОБАЦИЛЛ И СТРЕПТОКОККОВ

Л. Г. АНАНЯН, М. О. АСАТРЯН

В наших предыдущих работах были представлены данные о наличии четырех ферментов мочевинообразования у молочнокислых палочек и стрептококков и предполагалось присутствие одного из первых ферментов этого цикла—карбаматкиназы [1, 2].

Наша цель заключалась в определении активности карбаматкиназы (АТФ: карбамат фосфотранс-фераза, ЕС 2.7.2.2.) через биосинтез цитруллина при участии орнитинтранскарбамилазы исследуемых бактерий.

Материал и методика. Объектом исследований служили молочнокислые бактерии *L. lactis* 1694, *L. casei* 2528 и стрептококки *Str. faecalis* 2453, штаммы которых были получены из музея сектора микробиологии проблемной лаборатории кафедры молочного дела Ереванского зооветинститута. Бактерии выращивались при 40° на среде: гидролизат молока—100 мл, лактоза—1,2 г, NaCl—0,3 г, дрожжевой автолизат—3 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. Дезинтеграт центрифугировался при 5000 g в течение 20 мин при $4 \pm 1^\circ$. Активность карбаматкиназы и орнитинтранскарбамилазы определялась по методу Книвета [7] в нашей модификации путем инкубирования ферментного препарата в анаэробных и факультативно-анаэробных условиях в течение 70 мин при 37°. Реакционная среда содержала (в мл): 0,2—L-орнитина, HCl (0,4 M); 0,1—АТФ (0,06 M); 0,1— NH_4Cl (0,36 M); 0,6— $KHCO_3$ (0,5 M), 0,1— $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,24 M); 0,7—1,0 ферментного препарата; 0,4— H_2O . Общий объем 2,2 мл. Опыты проводились в трех вариантах. Вариант 1: в реакционную среду с ферментным препаратом вводилась смесь газов в сосудики Варбурга приблизительно в соотношении 5% CO_2 и 95% N_2 . Вариант 2: проводился только в присутствии N_2 ; вариант 3—в присутствии газов. Реакция останавливалась прибавлением 70% ТХМ. Активность ферментов определялась по количеству синтезированного L-цитруллина в мкмольях активности фермента на мг белка по методу Арчиальда [4].

Результаты и обсуждение. В наших ранних исследованиях активность орнитинтранскарбамилазы определялась через фосфорилиз и арсенолиз L-цитруллина [1, 2].

В настоящей работе представлены данные о биосинтезе L-цитруллина из экзогенного L-орнитина и эндогенного карбамилфосфата под

действием орнитинтранскарбамилазы (карбамил-фосфат: L-орнитин-карбоксилтрансфераза, ЕС 2.1.3.3). Синтез карбамилфосфата у исследуемых бактерий проходит в присутствии АТФ, CO_2 , NH_3 под действием карбаматкиназы, что впервые было установлено у стрептококков Джонс [6].

Ряд авторов нашли, что пути биосинтеза карбамилфосфата в животных и бактериальных препаратах идентичны [5, 8]. Однако у микроорганизмов биосинтез проходит в отсутствие N-ацетилглутамата, носит обратимый характер и катализируется ферментом карбаматкиназой, за исключением *E. coli*, в то время как у животных—карбамилфосфатсинтетазой. Реакция биосинтеза цитруллина обратима, и в этом аспекте она представляет второй механизм для использования карбамильной группы цитруллина в биосинтезе пиримидинов.

Таблица

Активность карбаматкиназы и орнитинтранскарбамилазы бактерий родов *Lactobacillus* и *Streptococcus*, мкМ/г сухой биомассы

Варианты опытов	Strept. faecalis 2453	
	5% CO_2 + 95% N_2	$M \pm m = 27,04 \pm 9,34$
N_2	$M \pm m = 27,10 \pm 8,31$	
Газы отсутствуют	$M \pm m = 62,90 \pm 17,00$	
	L. casei 2528	
5% CO_2 + 95% N_2	$M \pm m = 3,71 \pm 0,300$	
N_2	$M \pm m = 3,32 \pm 0,700$	
Газы отсутствуют	$M \pm m = 4,44 \pm 0,200$	
	L. lactis 1694	
5% CO_2 95% N_2	$M \pm m = 3,21 \pm 0,800$	
N_2	$M \pm m = 2,95 \pm 0,104$	
Газы отсутствуют	$M \pm m = 3,33 \pm 0,700$	

Как показывают данные табл. 1, выраженная активность ферментов у стрептококков проявляется во всех трех вариантах, т. е. в строго анаэробных и факультативно-анаэробных условиях. Книвет изучал биосинтез цитруллина только в присутствии $\text{N}_2 + \text{CO}_2$. Однако в наших опытах этот процесс фиксирован также в присутствии только азота и в его отсутствие. В последнем случае количество синтезированного цитруллина было вдвое больше, что, очевидно, можно объяснить тем, что для стрептококков, которые являются факультативными анаэробами, строгий анаэриоз менее благоприятен для проявления активности фермента. Лактобациллы по сравнению со стрептококками синтезируют цитруллин в минимальном количестве.

Данные опытов подтверждают факт присутствия первого фермента орнитинового цикла мочевинообразования карбаматкиназы у исследуемых бактерий, что позволяет нам, основываясь на ранее опубликованных данных об остальных ферментах этого цикла, заключить, что изучаемые бактерии обладают комплексом ферментов цикла мочевинообразования.

Наши исследования показали также, что у изучаемых лактобацилл и стрептококков карбаматкиназа и орнитинтранскарбамилаза работают одновременно в двух системах—аргининдигидролазной, т. е. на пути катаболизма аргинина, и биосинтеза L-аргинина в цикле мочевинообразования.

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

Поступило 3.III 1979 г.

Լ-ՑԻՏՐՈՒԼԻՆԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԸ ԼԱԿՏՈՐԲԱՑԻԼՆԵՐԻ ԵՎ ՍՏՐԵՊՏՈԿՈԿՆԵՐԻ ՄՈՏ

Լ. Գ. ԱՆԱՆՅԱՆ, Մ. Հ. ԱՍԱՏՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է կարբամատկինազայի ակտիվությունը կաթնաթթվային ձողիկների և ստրեպտոկոկների մոտ: Յիտրուլինի բիոսինթեզը ընթացիկ է անահրոք և ֆակուլտատիվ անահրոք պայմաններում: Ստրեպտոկոկների մոտ, ֆակուլտատիվ անահրոք պայմաններում, սինթեզված ցիտրուլինի քանակությունը կրկնակի անգամ բարձր է: Լակտոբախիլների մոտ ֆերմենտի ակտիվությունը համեմատաբար ցածր է:

Ստացված տվյալները վկայում են, որ ուսումնասիրված լակտոբացիլներում և ստրեպտոկոկներում առկա են միզանյութի բիոսինթեզի օրնիթինային ցիկլի ֆերմենտներ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ананян Л. Г., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 27, 4, 23, 1974.
2. Ананян Л. Г., Асатрян М. О., Давтян М. О. Биолог. ж. Армении, 30, 10, 76, 1977.
3. Арутюнян Т. Г., Агаджанян А. Х., Ананян Л. Г., Семерджян Г. А., Геворкян А. С., Заробян Т. Я., Хачатрян М. А. III Всесоюзный биохим. съезд, реф. научн. со-общ., 1, Рига, 1974.
4. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 156, 1, 121, 1944.
5. Caravaga J., Inisolia S. J. Biol. Chem., 253, 3, 684, 1960.
6. Jones M. E., Spector L., Lipman F. J. Am. Chem. Soc., 77, 3, 819, 1955.
7. Knivett V. A. Biochem. J., 58, 480, 1954.
8. Reichard P. Acta Chem. Scand., 11, 1, 523, 1957.