

## ИЗУЧЕНИЕ АРГИНАЗЫ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАЦИЛЛ

Ю. Г. ПОПОВ, С. В. ЧУБАРЯН

Имеющиеся в литературе данные по аргиназе аэробных спорообразующих бактерий немногочисленны [2—4, 6]. Немногочисленны также исследования по очистке аргиназы бацилл [7—9]. Изучение распространения аргиназной активности у культур разных видов спорообразующих бактерий предпринято с целью выявления наиболее активных по аргиназе штаммов, а также выяснения возможности применения аргиназного теста для таксономических целей.

*Материал и методика.* Объектами исследований служили 90 культур из коллекции аэробных спорообразующих бактерий Института микробиологии АН АрмССР, представлявших 20 разных видов бацилл. Для изучения аргиназной активности использовались односуточные культуры, выращенные на МПА; ферментативная активность устанавливалась по образованию мочевины, модифицированным Храмовым двацилльным методом Фирона [2]. При очистке аргиназы культура *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* ИНМИА-837, выращенная в МПБ в аэрируемых условиях на круговой чашке, разрушалась прессом. Аргиназная активность полученного ферментного препарата определялась по методике, описанной в работе Давтяна и др. [1]. Белок определялся спектрофотометрически на СФ-4А при длине волны 280 нм и методом Лоури и др. [5].

*Результаты и обсуждение.* Первоначально на аргиназную активность было испытано 48 штаммов 20 видов бацилл в основном по два штамма каждого вида. У большинства видов проявлялась в той или иной степени аргиназная активность, и только у четырех штаммов (обоих испытанных штаммов *Bac. polytuxa* и по одному из двух штаммов *Bac. circulans* и *Bac. macerans*) эта активность не установлена. В последующем нами была определена аргиназная активность еще 30 имевшихся в коллекции Института микробиологии штаммов *Bac. polytuxa*. Среди испытанных таким образом 32-х штаммов *Bac. polytuxa* заметная аргиназная активность обнаруживалась только у семи штаммов, отличающихся от остальных пигментацией, консистенцией, поверхностью колоний и способностью вращать в агар.

Наибольшую аргиназную активность проявили все восемь испытанных штаммов *Bac. sphaericus* и шесть—*Bac. thuringiensis*. Учитывая высокую аргиназную активность последних и наличие разработанной технологии их выращивания в производственных условиях при получении

нии инсектицидного препарата БИП, нами была предпринята попытка очистить аргиназу у одного из этих штаммов—*Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* ИНМИА-837.

Предварительно активность аргиназы была определена в различных фракциях гомогената (осадок, надосадочная жидкость) и изучено влияние ионов марганца на активность фермента (табл. 1). Из данных таблицы видно, что активность фермента более выражена в надосадочной жидкости, причем ионы марганца сильно стимулируют активность аргиназы в обеих фракциях.

Очистка аргиназы осуществлялась с некоторыми модификациями по схеме, предложенной Накамура и др. [7] для *Bac. subtilis*.

Таблица 1  
Влияние ионов марганца на аргиназную активность  
в различных фракциях гомогената

Фракция гомогената	Mn <sup>++</sup>	Общая активность, мМк мочевины
Осадок	—	8,3
	+	177,6
Супернатант	—	17,3
	+	275,4

Промытые дистиллятом клетки бактерий замораживали в течение 18—20 ч при —20° и разрушали прессом. К разрушенной биомассе добавляли 10 мл 0,5 М фосфатного буфера при pH 8,0 и экстрагировали фермент в течение одного часа при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин. К надосадочной жидкости (14 мл) по каплям добавляли 1,32 мл 1 М раствора MnCl<sub>2</sub>, pH приводили к 8,0 5 М раствором КОН. После 30-минутного перемешивания на магнитной мешалке смесь центрифугировали при 10000 g 20 мин. Образовавшийся неактивный осадок выбрасывался. Полученную после обработки марганцем надосадочную жидкость нагревали в течение 60 мин при 50°. После охлаждения ее центрифугировали при 10000 g 20 мин для удаления неактивного осадка. Однако термическая обработка для нашей культуры оказалась неэффективной, поскольку общая активность фермента подавлялась почти в два раза, а удельная—не менялась. Поэтому в последующем этап термической обработки был исключен и к надосадочной жидкости сразу после обработки марганцем при перемешивании добавляли н-пропиловый спирт до 20%-ного насыщения. Смесь охлаждалась льдом с солью (1:1). Образовавшийся неактивный осадок удалялся центрифугированием при 10000 g 20 мин. Дальнейшее насыщение пропанолом до 50% не приводило к образованию ожидаемого, согласно Накамура и др. [7], активного осадка.

После 20%-ного насыщения пропанолом надосадочная жидкость оставлялась при —20° в течение 18—20 ч. Образовавшийся осадок удалялся центрифугированием при 25000 g в течение 30 мин. Для освобождения от пропанола надосадочную жидкость пропускали через колонку с сефадексом G-50 (1,8×50 см), уравновешенным 0,1 М триацетатным буфером (pH 8,0), содержащим 5 мМ L-треонина и 1 мМ MnCl<sub>2</sub>, которые, по литературным данным, стабилизируют фермент [7, 9]. Элюция проводилась тем же буфером. Активными оказались 8—11 фракции, при объеме каждой фракции 5 мл.

Смесь активных фракций подвергалась высаливанию сульфатом аммония в присутствии аргинина (20 мкМ в 1 мл). Насыщение до 40% приводило к выпадению неактивного белкового осадка, удаляемого центрифугированием при 25000 g 30 мин. При последующем 70%-ном насыщении выпадал активный осадок. Собранный центрифугированием при том же режиме активный осадок суспендировался в 3 мл указанного

Этапы очистки аргиназы  
*Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* ИНМИА--837

Этап обработки	Общий белок, мг	Общая актив-ность, мкМ мочевины	Удельная актив-ность, мкМ мочевины/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	482,0	8492	17,6	100	—
Бесклеточный экстракт	151,2	6319	41,7	74,4	2,3
Обработка марганцем	101,2	6415	63,4	75,5	3,6
Обработка пропанолом	46,7	4920	105,3	57,9	6,0
Обработка холодом	27,8	4116	147,8	48,5	8,2
Гельфильтрация	16,1	5292	328,0	62,3	18,6
Высаливание сульфатом аммония (40--70%)	5,1	2859	562,0	33,7	31,9

буфера, и пропускался через колонку с сефадексом G-50 (1,8×30), уравновешенным указанным буфером, для удаления сульфата аммония. Элюирование проводилось тем же буфером, аргиназная активность обнаруживалась во фракциях 7 и 8.

Результаты, полученные на каждой стадии очистки, приведены в табл. 2. Разработанный метод очистки аргиназы из *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* ИНМИА-837 позволил достигнуть степени очистки 31,9 с 33,7%-ным выходом.

Высокоактивные по аргиназе культуры бактерий, в частности штаммы *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus*, перспективны для использования в качестве продуцентов этого фермента.

Греванский государственный университет, кафедра физиологии  
и анатомии растений, кафедра биохимии

Поступило 17.1 1980 г.

## ԷՆՏՈՄՈՂԱԹՈՒԿԵՆ ԲԱՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ՈՒՅՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Յու. Գ. ՊՈՊՈՎ, Ս. Վ. ԶՈՒԲԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է սպորառաջացնող բակտերիաների արգինազային ակտիվությունը տարբեր կուլտուրաների մոտ՝ ակտիվ շտամներ հայտնաբերելու և արգինազային տեսող տաքսոնոմիական նպատակով կիրառելու համար:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Давтян М. А., Чубарян С. В., Туманян Л. Р. Биолог. ж. Армении, 32, 906, 1979.
2. Храмов В. А., Галаев Ю. В. Лабораторное дело, 1, 50, 1971.
3. Broman K., Lauwers N., Stalon V., Wiame J.—M. J. Bacteriol., 135, 920, 1976.
4. Laishley E. J., Bernlohr R. W. J. Bacteriol. 96, 322, 1968.
5. Lowri O. H., Rosenbrough N. Y., Farr A. L., Randall R. Y. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
6. Mitruka B. M., Costilow R. N. J. Bacteriol., 93, 295, 1967.
7. Nakamura N., Fujita M., Kimura K. Agr. Biol. Chem., 37, 2827, 1973.
8. Ramaley R. F., Bernlohr R. W. J. Biol. Chem., 241, 620, 1966.
9. Simon J. P., Stalon V. Biochimie, 58, 1419, 1976.