

1. Абдуразаков С. Х., Саломов Х. Т. Прикл. биох. и микробиол., 11, 30, 1975.
2. Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К. Имобилизованные ферменты, 2, 25, 1976.
3. Добролинская Г. М., Серова Ю. З. Прикл. биох. и микробиол., 10, 717, 1974.
4. Жеребцов Н. А., Букова В. Б., Прикл. биох. и микробиол., 13, 289, 1977.
5. Жеребцов Н. А., Букова В. Б. Прикл. биох. и микробиол., 14, 217, 1978.
6. Юркевич В. В., Ковалева Н. С., Бакер Х. Х. Физиол. раст., 19, 937, 1972.
7. Bender H., Wallenfels K. Biochem. Z., 334, 79, 1961.
8. Lilly M. D., Sharp A. K. Chem. Eng., 215, CE 12, 1968.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall L. J. J. Biol. Chem., 36, 790, 1951.
10. Somogji M. J. Biol. Chem., 195, 19, 1952.
11. Weetall H. H., Havewala N. B. Enzyme Engeneering (Wingard L. B., ed.) Inter-sci. Publ., L—N. Y., 241, 1972.
12. Yamamoto R., Ooshima H., Harano Y. J. Chem. Tech. Biotechnol., 30, 579, 1980.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 10, 1982

УДК 577.15.591.8

ПУТИ ОБМЕНА АРГИНИНА У RHODOSPIRILLUM RUBRUM

Л. Г. АНАНЯН, Ф. Р. КАЗАРЯН, Дж. А. АГАДЖАНИЯН, Ю. Г. ПОПОВ

У *Rhodospirillum rubrum* обнаружены ферменты двух путей катаболизма аргинина: аргиназа и ферменты аргининдигидролазного пути (аргининдезиминаза и орнитинтранскарбамилаза). В присутствии L-аргинина наблюдается индукция аргиназы. Однако по сравнению с малатом прирост биомассы на L-аргине в качестве единственного источника углерода значительно ниже. Установлено наличие ферментов пути биосинтеза аргинина, характерных для цикла мочевинообразования. Активность уреазы повышается в присутствии аргинина и индуцируется мочевиной.

Ключевые слова: бактерии фотосинтезирующие, ферменты, аргинин.

Литературные данные, касающиеся обмена аминокислот у фототрофных бактерий, немногочисленны. Поэтому представлялось интересным изучение у них обмена аргинина, который играет многогранную роль в метаболизме клетки. Такие исследования интересны и с точки зрения эволюционной биохимии. Пути обмена аргинина прослежены у многих прокариотов—псевдомонад [27], клебсиелл и других энтеробактерий [16], клостридий [20], бацилл [10, 15, 18], молочнокислых бактерий [2, 3, 14], стафилококков [26], коринебактерий [17] и цианобактерий [29], однако фототрофные бактерии в этом отношении изучены недостаточно.

Возможность использования аргинина некоторыми пурпурными бактериями в качестве донора электронов и источника углерода [28],

наряду с обнаруженной нами аргиназной активностью ряда фототрофов [1], обусловили необходимость дальнейшего изучения ферментов обмена аргинина.

Материал и методика. Объектом исследований служил штамм *Rhodospirillum rubrum*, полученный из лаборатории фототрофных бактерий Института микробиологии АН АрмССР. Бактерии выращивались на среде Ормерода [22], в которой варьировалось содержание источников С и N. Малат и аргинин вносились в следующих количествах: малат—6 г/л; аргинин—6 или 3 г/л; смесь малата и аргинина—по 6 или 3 г/л каждого. Орнитин и мочевины вносились в среду как в отдельности, так и в смеси в количествах, соответствующих содержанию их остатков в 3 г/л аргинина, а именно орнитина солянокислого—2,9 г/л, а мочевины—1 г/л. Бактериальная культура выращивалась в анаэробных условиях на свету (1500 люкс) в течение 72 ч в колбах Эрленмейера на 500 мл. После инкубации биомасса отделялась центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин и дважды промывалась дистиллированной водой. Количество биомассы определялось нефелометрически на ФЭК-57 по стандартной кривой для сухого веса бактерий.

Об активности аргиназы (L-аргинин-амидиногидролаза, КФ 3.5.3.1) интактных клеток судили по образованию мочевины, которая определялась методом Арчибальда [13]. Колориметрирование проводилось на СФ-4 при $\lambda=478$ нм. Активность фермента выражалась в мкМ мочевины. Комбинация методов Кочетова [7] и Зеллинсона в модификации Силаковой и др. [9, 24] использовалась при определении активности уреазы (карбамид-амидогидролазы, КФ 3.5.1.5). Реакционная смесь, содержащая клеточную суспензию и мочевины (3%) в калий-фосфатном буфере (0,5 М, pH 7,0), выдерживалась в течение часа при 37° на качалке; затем реакция останавливалась 20%-ным ТХУ. Активность уреазы выражалась в мкМ азота аммиака, отщепившегося от мочевины.

Аргиназа бесклеточного экстракта определялась по методу Ратнер и Паппас [23] после разрушения клеток промытой биомассы в стеклянном гомогенизаторе Портера-Эльвейгейма с использованием Al_2O_3 . Инкубационная смесь содержала 1 мл ферментного препарата, L-аргинин (50 мкМ), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (5 мкМ) и глициновый буфер (0,05 М, pH 9,4). Инкубация проводилась в аэробных условиях в течение 90 мин при 37°; реакция останавливалась 20%-ным ТХУ. Активность аргиназы выражалась в микромолях мочевины. Количество мочевины рассчитывалось по выделенному при ее распаде под действием уреазы аммиаку, определяемому модифицированным микродиффузионным методом [9, 24]. Удельная активность фермента выражалась в мкМ на мг белка. Белок рассчитывался по количеству общего азота гомогената, определяемого по микрометоду Кьельдаля [6].

Аргининдегидминаза (L-аргинин-иминогидролаза, КФ 3.5.3.6) определялась в калий-фосфатном буфере (0,2 М, pH 5,8—6,0) по методу Слейда [25] в присутствии L-аргинина (50 мкМ) и $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (20 мкМ). Инкубация реакционной смеси велась в течение 60 мин при 37°. Реакция останавливалась 20%-ным ТХУ. Активность фермента выражалась в мкМ азота аммиака и цитруллина, а на 100 мг биомассы—в мкМ аммиака. Цитруллин определялся по методу Арчибальда [13]. Колориметрирование проводилось на ФЭК-56 М при $\lambda=490$ нм. Показания экстинкции вычислялись по калибровочной кривой для цитруллина. Идентификация цитруллина и орнитина проводилась методом бумажной хроматографии [11].

Орнитинтранскарбамилаза (карбамилолфосфат: L-орнитин карбамилолтрансфераза, КФ 2.1.3.3) определялась путем арсенолиза цитруллина по методу Кребса с сотр. [18]. Инкубационная смесь, содержащая ферментный препарат, L-цитруллин (100 мкМ) и арсенат Na (500 мкМ), выдерживалась в аэробных условиях в водной среде (pH 7,1) в течение часа при 37°; реакция останавливалась 20%-ным ТХУ. Активность фермента выражалась в мкМ отщепившегося аммиака, определяемого вышеупомянутым микродиффузионным методом. Для одновременного определения активностей аргининосукцинат-синтетазы (L-цитруллин: аспартат лигаза (образующая АМФ), КФ 6.3.4.5) и аргининосукциназы (L-аргининосукцинил аргинин-лиаза, КФ 4.3.2.1) использовался метод Ратнер и Паппас [23]. Инкубационная смесь содержала 1 мл ферментного пре-

парата, L-аспартат (20 мкМ), L-цитруллин (20 мкМ), АТФ (10 мкМ), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 мкМ), сукцинат (20 мкМ), аргиназу (1 мг) и уреазу (0,5 мг) в калий-фосфатном буфере (0,05 М, рН 7,4). Инкубация проводилась в аэробных условиях при 37° в течение 90 мин. Активность фермента выражалась в мкМ образовавшейся мочевины на 100 мг сухой биомассы.

Результаты и обсуждение. Предварительные эксперименты показали, что рост и аргиназная активность *Rh. rubrum* из испытанных сред—варианты среды Молиша, среда Ван-Ния и среда Ормерода—оказались наибольшими на последней [21]. Так, активность аргиназы интактных клеток *Rh. rubrum*, выращенных на среде Ормерода, составила в мкМ мочевины (100 мг сухой биомассы, $1,50 \pm 0,09 \text{ М} \pm m$, при $n=4$). Поэтому все ферментативные активности определялись у культу-

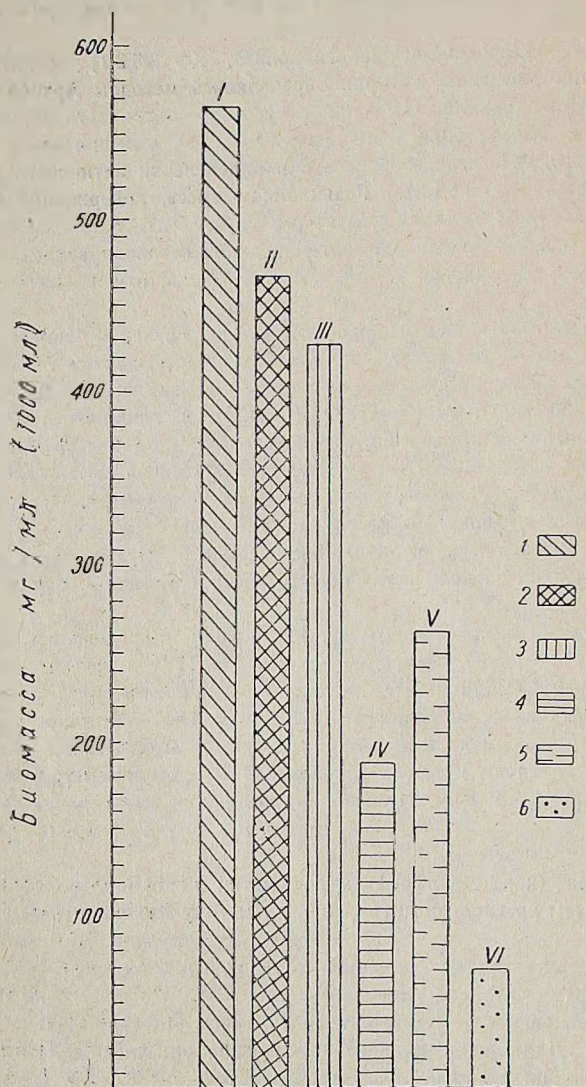


Рис. Влияние содержания источников углерода и азота в среде Ормерода на накопление биомассы *Rh. rubrum*: I—малат 6 г/л (контроль); II—малат+аргинин по 6 г/л; III—малат+аргинин по 3 г/л; IV—аргинин 6 г/л; V—аргинин 3 г/л; VI—L-орнитин 2,9 г/л+мочевина 1 г/л.

ры, выращенной на среде Ормерода, с различными комбинациями источников С и N. Как видно из рис., больше всего накапливается биомассы при использовании яблочной кислоты (6 г/л). Внесение в среду аргинина на фоне малата несколько снижало рост бактерий. Полная замена малата среды равным количеством аргинина подавляла рост в три раза. С уменьшением концентрации аргинина в среде вдвое—3 г/л рост бактерий увеличивался. Наименьший рост наблюдался при внесении в питательную среду в качестве источника углерода орнитина и мочевины в количествах, эквивалентных содержанию их остатков в 3 г/л аргинина. Полученные результаты объясняются, по-видимому, угнетающим действием на рост *Rh. rubrum* продуктов распада аргинина. Свидетельством тому служит низкий уровень роста на средах, содержащих смесь орнитина и мочевины или аргинина в повышенной концентрации—6 г/л.

Что касается аргиназной активности, то как видно из табл. 1, она возрастает в зависимости от концентрации аргинина в среде. Если в клетках, выращенных на среде только с малатом, активность фермента в 100 мг сухой биомассы составила 2,13 мкМ, то замена яблочной кислоты аргинином в качестве единственного источника углерода приводит к возрастанию активности более чем в три раза в варианте с 3 г/л аргинина и почти в 13 раз в варианте с 6 г/л аргинина. Однако при совместном внесении в среду как малата, так и аргинина активность аргиназы увеличивается в меньшей степени, что, возможно, объясняется механизмом катаболической репрессии. Тем не менее добавление аргинина в среду в качестве второго источника углерода увеличивало активность аргиназы в 1,5—3 раза.

Таблица 1

Активность аргиназы в бесклеточных экстрактах *Rh. rubrum* (n=4)

Источники углерода	Общая активность, мкМ мочевины, $M \pm m$	Активность, мкМ мочевины/100 мг сухой биомассы, $M \pm m$	Удельная активность, мкМ мочевины/мг белка
I. Малат, 6 г/л	5,23 $\pm$ 1,04	2,13 $\pm$ 0,88	0,052
II. Малат + L-аргинин по 6 г/л	16,36 $\pm$ 2,02	3,46 $\pm$ 0,42	0,145
III. Малат + L-аргинин по 3 г/л	27,1 $\pm$ 2,16	6,26 $\pm$ 0,64	0,384
IV. L-аргинин, 6 г/л	48,48 $\pm$ 0,73	25,79 $\pm$ 0,82	1,200
V. L-аргинин, 3 г/л	18,36 $\pm$ 1,29	6,99 $\pm$ 0,28	0,265

Полученные данные свидетельствуют о том, что аргиназа исследуемых бактерий, подобно аргиназе других прокариотических микроорганизмов [4, 21], индуцируется L-аргинином.

Помимо расщепления аргинина с помощью аргиназы, у микроорганизмов описаны другие, многочисленные и разнообразные пути деградации аргинина. К тому же известны бактерии с более чем одним путем его катаболизма. Так, например, в бациллах, молочнокислых бактериях и цианобактериях могут одновременно функционировать как аргиназный, так и аргининдигидролазный пути обмена [2, 15, 29]. На-

ми определялись также два фермента аргининдигидролазного пути у *Rh. rubrum*: аргининдезиминаза и орнитинтранскарбамилаза.

Таблица 2

Активность аргининдезиминазы в бесклеточных экстрактах *Rh. rubrum* (n=4)

Источники углерода в среде	Общая активность		На 100 мг сухой биомассы, мкМ аммиака, $\bar{M} \pm m$
	мкМ аммиака, $\bar{M} \pm m$	мкМ цитруллина, $\bar{M} \pm m$	
Малат, 6 г/л	1,27 $\pm$ 0,445	0,643 $\pm$ 0,082	0,395 $\pm$ 0,149
Малат, 6 г/л + L-аргинин, 6 г/л	18,63 $\pm$ 0,494	8,110 $\pm$ 1,711	12,740 $\pm$ 0,681

Как видно из табл. 2, на среде только с малатом обнаруживается слабая аргининдезиминая активность; при добавлении L-аргинина, однако, эта активность значительно возрастает—в 32 раза. Очевидно, что имеет место субстратная индукция аргининдезиминазы L-аргинином. Образование же аммиака и цитруллина, как это видно по таблице, в неэквимольных количествах косвенно указывает на присутствие в реакционной смеси орнитинтранскарбамилазы, под действием которой происходит частичный распад цитруллина на аммиак и орнитин. Образование орнитина было подтверждено методом бумажной хроматографии. Прямое доказательство присутствия катаболической орнитинтранскарбамилазы в бесклеточных экстрактах *Rh. rubrum* было получено с помощью метода арсенолиза цитруллина, продуктами которого являются орнитин, NH_3 и CO_2 . При этом обнаружена довольно заметная активность фермента: общая—6,38 $\pm$ 1,23 и на 100 мг сухой биомассы—2,11 $\pm$ 0,63.

С катаболизмом аргинина в аргиназном пути тесно связано расщепление мочевины под действием уреазы. Детальные исследования уреазы фототрофов проведены Малофеевой [8]. Нами изучалось также влияние на уреазную активность *Rh. rubrum* условий культивирования (табл. 3).

Как у Малофеевой, разложение мочевины в отсутствие кофакторов свидетельствует о наличии уреазы, а не амидо-лиазы. При этом добавление в среду на фоне малата мочевины или аргинина значительно индуцирует активность уреазы: в 17 раз на среде с добавлением аргинина (3 г/л); в 18 раз на среде с добавлением мочевины в количестве, соответствующем содержанию ее остатка в 3 г/л аргинина (1 г/л); и в 22 раза на среде с удвоенным по сравнению с предыдущим вариантом содержанием мочевины (2 г/л). Совпадение уровней индукции активности уреазы в вариантах с внесением в среду 3 г/л аргинина и 1 г/л мочевины предполагает опосредованный механизм индукции аргинином: добавление в среду аргинина индуцирует аргиназу, а образующаяся под воздействием аргиназы мочевина индуцирует уреазу. Труднее интерпретировать данные, полученные в вариантах с внесением в среду орнитина, как в отдельности, так и в смеси с мочевиной. Вместо ожидаемого совпадения, уровень активности фермента в V варианте оказался ниже, чем во II и III. Это говорит о сложном характере регули-

рования уреазы орнитинном. Тем не менее заметная индукция уреазы при внесении только орнитина позволяет предположить наличие ферментов, ведущих от орнитина к биосинтезу аргинина и таким образом — индукции уреазы. Проверка этого предположения привела к обнаружению в изучаемых бактериях аргининосукцинат-синтетазы и аргининосукциназы, общая активность которых составляла— $2,140 \pm 0,533$ и активность на 100 мг сухой биомассы— $0,665 \pm 0,166$. Этот факт, наряду с установленным Храмовым и Кондратьевой [12] образованием карбамоилфосфата и цитруллина некоторыми фототрофными бактериями, свидетельствует о возможности существования у *Rh. rubrum* пути биосинтеза аргинина, идентичного реакциям цикла Кребса-Гензеляйта.

Таблица 3

Активность уреазы в интактных клетках Rh. rubrum, мкМ мочевины

Акти: постъ	Малат 6 г/л	Малат 6 г/л + + L-аргинин 3 г/л	Малат 3 г/л + мо- чевина 1 г/л	Малат 6 г/л + мо- чевина 2 г/л	Малат 3 г/л + + L-орнитин 2,9 г/л + мочеви- на 1 г/л	Малат 3 г/л + + L-орнитин 2,9 г/л
Общая	0,69	8,71	7,68	7,15	7,03	2,94
100 мг сухой биомассы	0,21	3,48	3,82	4,62	2,55	2,04

Таким образом, у *Rh. rubrum* имеются, по крайней мере, два пути катаболизма аргинина—аргиназный и аргининдигидролазный, а также путь биосинтеза аргинина, характерный для цикла мочевинообразования. В последнем случае реакции с участием карбаматкиназы и орнитинтранскарбамилазы [12], аргининосукцинат-синтетазы и аргининосукциназы обеспечивают синтез аргинина. Но роль первых двух путей представляется менее ясной. Хорошо известная по литературе АТФ-продуцирующая функция аргининдигидролазного пути [2, 5, 14, 29], повидимому, не имеет значения для *Rh. rubrum* на свету в условиях анаэробии, поскольку рост в среде с малатом и сульфатом аммония даже лучше, чем при добавлении аргинина. Аргиназный же путь служит для снабжения клеток азотом. Окончательное выяснение этих вопросов требует дальнейшего изучения.

Греванский государственный университет,
Кафедра физиологии и анатомии растений,
Проблемная лаборатория сравнительной и
эволюционной биохимии

Поступило 14.VII 1982 г.

ԱՐԳԻՆԵՆԻ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՈՒՂԻՆԵՐԸ RHODOSPIRILLUM
RUBRUM-Ի ՄՈՏ:

Լ. Գ. ԱՆԱՆՅԱՆ, Ֆ. Ռ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Զ. Ա. ԱՂԱԶԱՆՅԱՆ, ՅՈՒ. Գ. ՊՈՊՈՎ

Rh. rubrum մանրէների մոտ հայտնաբերված են արգինինի կատաբոլիզմի երկու ուղիների ֆերմենտները՝ արգինազան և արգինիդիզիդրոլազան ուղու ֆերմենտները (արգինինդեզիմինազա և օրնիտինտրանսկարբամի-

(լազա) L-արգինինի առկայությամբ դիտվում է արգինազայի ինդուկցիա: Սակայն մալատի հետ համեմատած L-արգինինի վրա որպես ածխածնի միակ աղբյուրի, կենսազանգվածի աճը նշանակալի ցածր է: Հաստատված է արգինինի բիոսինթեզի ուղու ֆերմենտների ներկայությունը, որը բնորոշ է միզանյութի առաջացման ցիկլին: Արգինինի առկայությամբ բարձրանում է ուրեազայի ակտիվությունը և նա ենթարկվում է ինդուկցիայի միզանյութով:

ROUTES OF ARGININE METABOLISM IN *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*

L. G. ANANIAN, F. R. KAZARIAN, J. A. AGADJANIAN, Y. G. POPOV

Enzymes of two pathways of arginine catabolism were determined in *Rhodospirillum rubrum*: arginase and enzymes of arginindihydro-lase pathway (arginine-desiminase and ornithine-carbamoyl-transferase). In the presence of L-arginine the induction of arginase was observed, though in comparison with malate the yielding of this activity with L-arginine as the sole source of the carbon was considerably poor.

The presence of the enzymes of arginine synthesis was established which was characteristic of the urea cycle. The urease activity was raised in the presence of arginine and induced by the urea.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанян Дж. А., Ананян Л. Г., Казарян Ф. Р., Попов Ю. Г. Тез. докл. III конф. Закавказских отделений ВМО АН СССР, Ереван, 1981.
2. Ананян Л. Г., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 27, 4, 23—28, 1974.
3. Ананян Л. Г., Асатрян М. О., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 20, 10, 76—80, 1977.
4. Ананян Л. Г., Асатрян М. О., Дациелян С. Р. Биолог. ж. Армении, 33, 12, 13—21, 1980.
5. Готшалк Г. Метаболизм бактерий. М., 1982.
6. Добрынина В. И., Свешникова Е. Я. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. М., 1967.
7. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971.
8. Малофеева И. В. Микробиология, 48, 3, 411—417, 1979.
9. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вopr. химии, 8, 5, 538, 1962.
10. Попов Ю. Г., Чубарян С. В. В сб.: Вопросы биологии, вып. 2, 68—71, 1981.
11. Хайс И. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. М., 1962.
12. Храмов В. А., Кондратьева Е. Н. Микробиология, 50, 5, 932, 1981.
13. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 156, 1, 12, 1944.
14. Bauehor T., Elsdon S. R. J. Gen. Microbiol., 23, 457—460, 1960.
15. Bromar K., Larvers N., Stalon V., Wiane J. M. J. Bacteriol., 135, 3, 920—927 1978.
16. Friedrich B., Magasank B. J. Bacteriol., 133, 2, 680—685, 1978.
17. Jamanaka K., Hara T., Gino M. J. Fermentation Technology, 54, 12, 838—849, 1976.
18. Krebs H. A., Eggleston L. V., Knivett V. A. Biochem. J., 59, 2, 185, 1955.
19. Laishley E. J., Bernlohr R. W. J. Bacteriol., 96, 322, 1968.
20. Mitruka B. M., Costilow R. N. J. Bacteriol., 93, 1, 295—301, 1967.
21. Nakamura N., Fujita M., Kimura K. Agr. Biol. Chem., 37, 12, 2827—2833, 1973.
22. Ormerod J. G., Ormerod S. K., Gest H. Arch. Biochem. and Biophys., 94, 449, 1961.
23. Ratner S., Pappas A. J. J. Biol. Chem., 179, 1199, 1949.
24. Selingson D., Selingson H. J. Lab. Clin. Med., 38, 3 24, 1951.