

Օրիգինալ հոդվածներ • Оригинальные статьи • Original articles

Биолог. журн. Армении, 3-4 (56), 2004

УДК 576. 85.5:577.15

## ИЗОЭНЗИМЫ АРГИНАЗЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

М.А. ДАВТЯН, Л.Г. АНАНЯН

*Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии, 375040*

Разработана методика очистки аргиназы молочнокислых бактерий *Streptococcus faecalis* 2453, позволившая получить два очищенных изоэнзима аргиназы с удельной активностью 58.5, 43.07 и степенью очистки 32.31 и 32.41 соответственно. Молекулярная масса I изоэнзима равна 524800 Да, а II - 79400 Да. При субстратной индукции индуцируется I -изоэнзим, II - почти не индуцируется.

Մշակված է *Streptococcus faecalis* 2453, կարճաթթվային բակտերիաների արգինազայի մաքրման մեթոդ, որը հնարավորություն է տվել ստանալ երկու մաքրված իզոէնզիմներ՝ համապատասխանաբար 58.5, 43.07 տեսակարար ակտիվությամբ և 32.31, 32.41 մաքրման աստիճանով: I իզոէնզիմի մոլեկուլայր զանգվածը հավասար է 524800 Դա, իսկ II - 79400 Դա: Սուբստրատային ինդուկցիայի ժամանակ ինդուկցվում է I իզոէնզիմը, իսկ II -ը գրեթե չի ինդուկցվում:

It has been developed method of arginase purification from *Streptococcus faecalis* 2453, it has been obtained two isoenzymes of arginase with 58.5 and 43.07 specific activity 32.31 and 32.41 degree of purification respectively. Molecular weight of I isoenzyme is 524800 Da, and II - 79400 Da. Isoenzyme I subject to substrate induction, but isoenzyme II nearly is not changed during substrate induction.

### *Изоэнзимы - аргиназа - молочнокислые бактерии*

Молочнокислые бактерии, являясь древними прокариотами, биохимически пластичны, что позволило им приспособиться к широкому диапазону экологических условий. Нами было показано, что молочнокислые бактерии обладают активностью орнитинтранскарбамилазы (арсенолиз цитруллина), аргининсукцинатсинтетазы, аргининосукциназы [3]. Более того, было установлено, что в этих бактериях аргинин катаболизируется не только аргиназой, но и ферментами аргининдегидролазной системы (аргининдеимидаза, цитруллиназа, карбаматкиназа), катализирующими распад аргинина и генерации АТФ [2]. Можно допустить, что обнаруженные ферменты аргининдегидролазного пути служат для биосинтеза АТФ путем распада аргинина, который является незаменимой аминокислотой для роста молочнокислых бактерий. Тогда встает вопрос относительно роли обнаруженной аргиназной активности. В свете концепции существования в природе, по-

мимо аргиназы (уреотелической), участвующей в механизме нейтрализации аммиака орнитинным циклом мочевинообразования, также неуреотелической, имеющей общебиологическое распространение и функции, не связанные с нейтрализацией аммиака (снабжение процессов биосинтеза пролина и полиаминов орнитинном, лимитирование биосинтеза аргининбогатых гистонов или однозамещенных гуанидиновых соединений и др.) [5, 6, 7], можем допустить неуреотелический характер аргиназы, обнаруженной в молочнокислых бактериях. Обнаружены различные изоэнзимы неуреотелической аргиназы, в связи с чем нами исследовался изоэнзимный спектр аргиназы молочнокислых бактерий.

**Материал и методика.** Объектом исследования служили молочнокислые стрептококки семейства *Streptococcaceae*, род *Streptococcus*, вид *Str. faecalis*. Штамм *Str. faecalis* 2453 взят из музея кафедры технологии животноводческих сырья и продуктов Армянской сельскохозяйственной академии. Бактерии выращивали в полусинтетической среде [1]. Сухую массу бактерий определяли нефелометрированием на ФЭК-М. Гомогенизацию проводили в гомогенизаторе типа Поттера - Эльвейгейма в К - фосфатном буфере рН 7.8.

Аргиназную активность определяли методом Ратнера [12] с небольшими изменениями и выражали в мкМ образовавшейся мочевины. Аммиак, выделенный при распаде мочевины под действием уреазы, определяли микродиффузионным методом Зелингсона [13] в модификации Силаковой и др. [8], белок определяли по Лоури [9] на ФЭК -56,  $\lambda = 750$  нм и на СФ G-16,  $\lambda = 280$  нм. Очистку аргиназы проводили по Накамура и др. [11] с некоторыми изменениями. Молекулярную массу определяли гельфильтрацией на колонках СФ G-200 в присутствии голубого декстрана с использованием белков - маркеров с известной молекулярной массой. Все опыты велись на частично очищенных двух изоэнзимах.

**Результаты и обсуждение.** Нами было установлено, что аргиназа молочнокислых бактерий подвергается субстратной индукции [4]. Разработан метод очистки индуцированной аргиназы, включающий отмеченные этапы (табл. 1). В результате получены два изоэнзима аргиназы с удельной активностью 58.5 и 43.07 и степенью очистки 32.31 и 32.41 соответственно. Молекулярная масса I изоэнзима равна 524,8 кДа, а II - 79,43 кДа (рис. 1). При сравнении изоэнзимов до и после субстратной индукции (рис. 2) видно, что последней подвергается I изоэнзим, а II - почти не индуцируется.

Таблица 1. Этапы очистки аргиназы *Streptococcus faecalis* 2453, активность в мкМ мочевины

Этапы очистки аргиназы	Общий белок	Общая активность	Удельная активность	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	70.69	130.48	1.84	100	I
Бесклеточный экстракт	60.08	123.70	2.06	94.70	1.12
Обработка марганцем (1M)	16.02	128.22	7.71	98.26	4.19
Холодовая обработка, -16°	8.25	85.33	10.34	60.79	5.61
<b>Гельфильтрация G-75</b>					
I - изоэнзим	1.29	27.23	21.21	20.86	11.47
II - изоэнзим	1.06	14.46	13.63	11.06	7.38
<b>КМ- целлюлоза</b>					
I - изоэнзим	0.18	10.40	58.50	7.20	32.31
II - изоэнзим	0.13	5.60	43.07	4.29	23.41

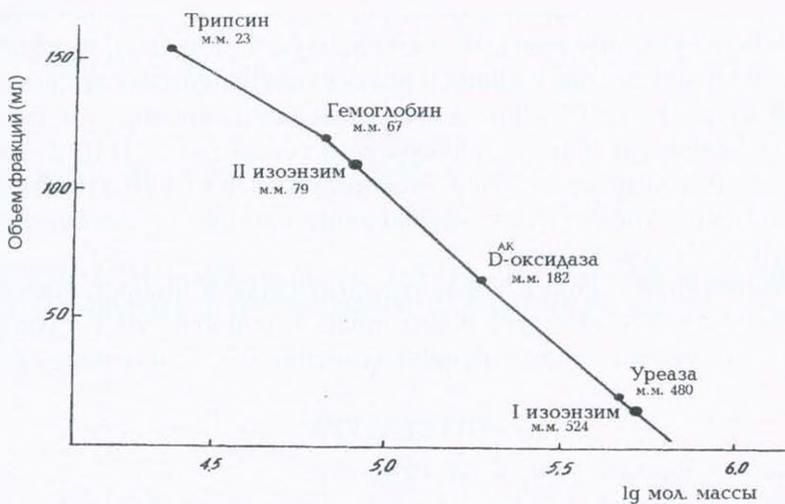


Рис. 1. Кривая молекулярной массы (кДа) I и II изоэнзимов *Str. faecalis* 2453.

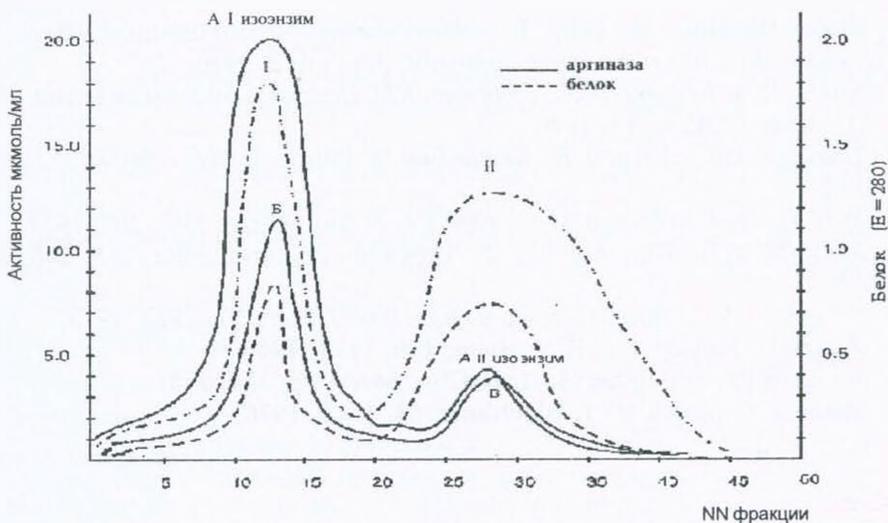


Рис. 2. Изоэнзимный спектр (I и II) аргиназы *Str. faecalis* после гельфильтрации. А – с индукцией, В – без индукции.

Таблица 2. Влияние хранения на аргиназную активность при температуре  $-12^{\circ}$ ,  $-14^{\circ}$ .

Этапы очистки аргиназы	Общая активность, мкМ мочевины			
	Исходное количество	сутки		
		8	15	24
Обработка марганцем, 1М	150.4	110.6	132.30	144.9
Холодовая обработка, $-16^{\circ}$	121.7	124.3	123.96	123.24
Гельфильтрация I изоэнзима	55.73	55.01	64.90	62.83

Согласно литературным данным, существуют два больших класса аргиназ по молекулярной массе: легкий класс (м.м=130 кДа), включающий аргиназу печени млекопитающих и других уреотелических организмов, и тяжелый класс (м.м>300 кДа) - неуреотелическую аргиназу, в частности аргиназы *Neurospora*, *Bacillus*, являющиеся гексамерами [14], *B. subtilis* - 400000 [11], *B. licheniformis* - 260000, нейроспор - 278000 [10]. По-видимому, I изоэнзим молочнокислых стрептококков относится к классу тяжелых аргиназ, а II - к классу легких.

Данные табл. 2 показывают, что аргиназная активность препаратов при разной степени очистки, в том числе и очищенный I - изоэнзим, сохраняют активность при хранении в условиях -12°, - 14° в течение 24 сут.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ананян Л.Г. Уч. зап. ЕГУ, 2, 56, 1970.
2. Ананян Л.Г., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении 27, 23, 1974.
3. Ананян Л.Г., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении 30, 10, 1977.
4. Ананян Л.Г., Асатрян М.О., Даниелян С.Р. Биолог. журн. Армении, 33, 12, 1321, 1980.
5. Давтян М.А. Докт. диссерт. Ферменты орнитинового цикла, 1970.
6. Давтян М.А, Бунятян Г.Х. Биохимия, 35, 2, 412, 1970.
7. Давтян М.А, Бунятян Г.Х., Геворкян Д.М. Вопросы биохимии мозга, Изд. АН. Арм. ССР, 6, 15, 1970.
8. Силакова А.И., Труш Г.П., Являякова А. Вопросы мед. химии, 85, 558, 1962.
9. Lowry O.M., Rosebrough M.L., Farr I.A. J. Biol. chem, 193, 263, 1951.
10. Mora Y., Tarrab B., Bajalil L.F., Biochem, Biophys, Acta, 118, 206, 209, 1966.
11. Nacamura N., Fujita M., Rimura, Agr. Biol. Chem, 37, 2827, 1973.
12. Ratner S., Pappas A. J. Biol. chem, 179, 1188, 1949.
13. Selingson D., Selingson H., Lab. Clin. Med., 38, 324, 1951.
14. Simon J.P., Stalon V., J. Biochimie, 58, 1419, 1976.

Поступила 13.X.2004