

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr Janina Opieńska-Blauth

Eugeniusz GAŚSIOR

**Transaminaza asparaginowo-glutaminowa
u *Mycobacterium phlei***

**Аспарагиново-глутаминовая трансминаза
у *Mycobacterium phlei***

Aspartic-glutamic Transaminase in *Mycobacterium phlei*

Reakcje transaminacji, a w szczególności reakcja: kwas asparaginowy + kwas α -ketoglutazarowy = kwas glutaminowy + kwas szczawiooctowy jest rozpowszechniona u wielu drobnoustrojów.

Badania nad transaminacjami przeprowadzano na zawiesinach komórkowych, wyciągach bezkomórkowych albo na częściowo oczyszczonych preparatach enzymatycznych, otrzymanych z bakterii po uprzednim zniszczeniu ich komórkowej struktury. Housewright i Thorne (9) wykryli reakcje transaminacji w wyciągach bezkomórkowych *Bac. anthracis* uzyskanych przy pomocy dezintegracji ultradźwiękowej. Podobnie Altenbern i Housewright (1) zastosowali technikę ultradźwiękową celem stwierdzenia występowania reakcji transaminacji między kwasem asparaginowym (Asp) i α -ketoglutazarowym (KG) u *Brucella abortus*. Rudman i Meister (21) posługując się techniką rozcierania bakterii z tlenkiem glinu, otrzymali z *Escherichia coli* wyciąg zawierający transaminazę. Wiame i Storck (24) wykazali czynną transaminazę w bezkomórkowych wyciągach *B. subtilis*, a Levinson i Sevag (12) w wyciągach *B. megatherium*. Ostatnio Kański, Sakławska-Szymonowa i Szymona (10) stwierdzili obecność czynnej transaminazy asparaginowo-glutaminowej (Asp-Glu) w zawiesinach i proszkach acetonowych *Mycobacterium phlei*.

Tematem niniejszej pracy było wyodrębnienie i oczyszczenie transaminazy Asp-Glu z *Mycobacterium phlei*.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

I. Materiał.

Drobnoustrój: *Mycobacterium phlei*, pochodzący z Instytutu Gruźlicy w Warszawie, hodowany na pożywce Löwensteina. Z dwutygodniowej hodowli zbierano masę bakteryjną, przemywano 8-krotnie wodą destylowaną i każdorazowo odwirowywano w ciągu 5 minut przy 3000 obr./min. Tak przemytą masę bakteryjną używano do dezintegracji lub do przygotowania proszku acetonowego. Proszek acetonowy sporządzano według Edsona i Huntera (6).

II. Oznaczanie kwasu glutaminowego (Glu).

Miarą aktywności transaminazy Asp-Glu w bezkomórkowych wyciągach i częściowo oczyszczonych preparatach była ilość Glu, jako produktu reakcji.

Celem przeprowadzenia reakcji i oznaczenia Glu:

- 1 — preparat enzymatyczny (uprzednio dializowany przez 12 godzin wobec 0,05 M buforu fosforanowego o pH 7,4) inkubowano z substratami;
- 2 — oznaczono ilość wytworzonego Glu;
- 3 — wyliczano umowne jednostki aktywności enzymu.

Inkubacja: próbki umieszczone w erlenmajerkach poj. 25 ml inkubowano w ciągu 2,5 godz. w temperaturze 37°. W skład mieszaniny inkubowanej wchodziły następujące składniki:

- 1 ml DL-Asp (stężenie końcowe: $2,5 \cdot 10^{-4}M$),
- 1 ml KG (stężenie końcowe: $3,5 \cdot 10^{-4}M$),
- 2 ml wyciągu enzymatycznego (Przy stosowaniu oczyszczonych preparatów enzymatycznych brano do inkubacji tylko 0,5; 0,25 i 0,1 ml roztworu enzymu, przy zachowaniu całkowitej objętości mieszaniny zawsze 6 ml).
- 2 ml buforu fosforanowego 0,05 M o pH 7,4.

Substraty rozpuszczano w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,4 i doprowadzano do wymienionego pH przy pomocy 1 n NaOH. Reakcję transaminacji przerywano przez dodanie kilku kropli 1 N HCl i ogrzewanie na wrzącej łaźni wodnej przez 5 min. Osad wytrąconego białka odwirowywano i odrzucano. Objętość mieszaniny uzupeł-

niano wodą do 6 ml. Kwas szczawiooctowy powstały w wyniku transaminacji rozkładano przez dodanie 0,5 ml aniliny (katalizującej nieenzymatyczną dekarboksylację kwasu szczawiooctowego).

Oznaczanie kwasu glutaminowego: w próbkach zawierających więcej niż 0,1 mg Glu stosowano metodę manometryczną, a przy mniejszej zawartości Glu — oznaczanie fotometryczne w eluatach z chromatogramów bibułowych.

a) Metoda manometryczna

Glu oznaczano według K r e b s a (11) przy użyciu dekarboksylazy z *Clostridium Welchii* SR 12. Drobnoustrój pochodzący z pracowni Prof. Strauba (Budapeszt) hodowano w warunkach podanych przez M c I l v a i n a i H u g h e s a (15) na nieco zmodyfikowanej pożywce zawierającej: 80 g suchego preparatu serca wołowego, 100 ml bulionu mięsnego, 10 g hydrolizatu białkowego zawierającego 50% glukozy („Aminolin-Glucose”, f-my Orthana, Kopenhaga), 560 ml 0,05 M buforu fosforanowego o pH 7,6.

0,5 ml zawiesiny bakteryjnej otrzymanej z 16-godzinnej hodowli *Cl. Welchii* rozkłada 1,5 mg Glu w ciągu 30 min.

Oznaczanie przeprowadzano w naczyniach aparatu Warburga w 37°C w objętości 3,2 ml. W naczyniu głównym umieszczano: 2 ml mieszaniny inkubacyjnej, 0,5 ml 0,3 M buforu octanowego o pH 4,5, 0,2 ml (8 mg) semikarbazydu. (Semikarbazyd w stężeniu wyżej podanym inaktywuje dekarboksylazę Asp, nie wywierając wpływu na dekarboksylazę Glu. Oba enzymy występują stale w zawiesinach *Cl. Welchii* (16). Chromatograficznie nie stwierdzono obecności Ala, jako produktu dekarboksylacji Asp, po dodaniu semikarbazydu i *Cl. Welchii* do Asp lub próbek inkubowanych).

Do bocznego ramienia dodawano 0,5 ml zawiesiny *Cl. Welchii*. Po wyrównaniu ciśnienia i temperatury przelewano zawiesinę *Cl. Welchii* do naczynka głównego i odczytywano ilości wydzielającego się CO₂.

W skład prób kontrolnych wchodziły: 1) mieszanina inkubacyjna bez zawiesiny *Cl. Welchii*, 2) zawiesina *Cl. Welchii* bez mieszaniny inkubacyjnej.

Stałe naczyniek wyrażone w K_{O₂} przeliczano na K_{CO₂}.

b) Metoda fotometryczna

Przy małej aktywności enzymatycznej wyciągów Glu powstawał w tak niewielkich ilościach, że nie można było stosować metody

manometrycznej. W tych przypadkach próbki po inkubacji poddawano rozdzielaniu chromatograficznemu na bibule w układzie fenol-woda (7 : 3), wywoływano ninhydryną z CdCl_2 , według Barroliera (2), płomy Glu eluowano i oznaczano fotometrycznie (w fotometrze Pulfricha, filtr S 53).

Za jednostkę aktywności transaminazy Asp-Glu przyjęto taką ilość enzymu, która w czasie 2,5-godzinnej inkubacji z Asp i KG katalizuje powstanie 0,45 μg Glu, równoważne 10 μl CO_2 .

III. Dezintegracja drobnoustroju i ekstrakcja transaminazy.

Wstępne próby zmierzające do wyizolowania transaminazy przez bezpośrednią ekstrakcję proszku acetonowego wodą, albo roztworami moderatorowymi o różnym pH i różnej sile jonowej dały wyniki niezadowolające. Dlatego też materiał bakteryjny poddawano różnorodnej dezintegracji. Do dezintegracji używano proszków acetonowych, albo równoważnej ilości wilgotnej masy bakteryjnej (4,2 g wilgotnej masy bakteryjnej, albo 0,6 g proszku acetonowego).

Badania porównawcze nad wyciągami otrzymanymi różnymi metodami przeprowadzano na materiale z tej samej hodowli. Temperatura podczas doświadczeń nie przekraczała 3°C.

Do ekstrakcji stosowano 0,05 M moderator fosforanowy o pH 7,4 (wydajność ekstrakcji przy użyciu moderatorów octanowych i weroanalowych o różnym pH i różnej sile jonowej była znacznie mniejsza). Ekstrakcję prowadzono przez 3-krotne wytrząsanie materiału z moderatorem po 15 min. Debris komórkowe usuwano przez 30 minutowe wirowanie przy 4000 obr./min. Otrzymany wyciąg enzymatyczny, niezależnie od rodzaju dezintegracji uzupełniano zawsze moderatorem fosforanowym do obj. 25 ml. Tak otrzymane wyciągi enzymatyczne zawierały komórki bakteryjne stwierdzone badaniem mikroskopowym.

Komórki i fragmenty komórkowe usuwano przez sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem przez specjalnie przygotowany sączek z ziemi okrzemkowej (7).

1. Dezintegracja mechaniczna

a) Rozcieranie z tlenkiem glinu wg McIlwaina (14).

Proszek acetonowy, albo wilgotną masę bakteryjną mieszano z tlenkiem glinu (produkcji rosyjskiej) w stosunku wagowym: 1 : 1,

1 : 2, 1 : 3, 1 : 4 i po dodaniu takiej ilości moderatora, aby uzyskać spoistość pasty, rozcierano ręcznie w móżdzierzu porcelanowym zanurzonym w mieszaninie oziębiającej. Czas dezintegracji wynosił 30—150 min. Lepsze wyniki otrzymano używając proszek acetonowy zamiast wilgotnej masy bakterii. Optymalne warunki dezintegracji podano w tabeli I.

b) Rozcieranie z pyłem szklanym.

Masę bakteryjną zmieszaną z różnymi ilościami pyłu szklanego (f-my Towers, Anglia) i moderatorem fosforanowym umieszczano w młynku bakteryjnym Werkmana-Uttera (23). Najlepsze wyniki otrzymano przy 3-krotnym mieleniu (przy 300 obr./min.) trwającym każdorazowo 2—3 min. Wyniki przedstawiono w tabeli I.

2. Dezintegracja ultradźwiękowa

W badaniach posługiwano się czeskim generatorem ultradźwiękowym „Chirana” z płytką kwarcową piezoelektryczną o częstotliwości drgań 1 Mc. Dezintegracji poddawano homogenne zawiesiny zawierające różną ilość masy bakterii, od 1—6 g/10 ml moderatora fosforanowego. Zawiesinę bakteryjną umieszczoną w kolbkach na 50 ml chłodzono olejem oziębionym uprzednio do minus 10°C.

W toku pracy stwierdzono, że kształt kolbek odgrywa zasadniczą rolę, a mianowicie kolbki z dnem wypukłym nie nadają się ze względu na odbijanie fal ultrakrótkich. Dlatego też do dezintegrowania stosowano wyłącznie kolbki z dnem wklęsłym. Jednocześnie przeprowadzone próby dezintegracji z dodatkiem glutationu i substratów (w celu zmniejszenia wpływu utleniającego i denaturującego fal ultrakrótkich) wykazały, że aktywność nieznacznie wzrastała. Wyniki umieszczono w tabeli I.

3. Autoliza

Przemytą masę bakteryjną zawieszano w wodzie, albo w moderatorze fosforanowym w stosunku wagowym: 1 : 1, 1 : 2, itd. Dodawano toluenu w ilościach od kilku do kilkunastu kropli. Autolizę przeprowadzano w 37° C w erlenmajerkach poj. 25 ml, zamkniętych korkiem. Czas autolizy 1—14 dni. Otrzymane autolizaty były nieaktywne.

4. Plazmoliza mocznikiem.

Plazmoliza roztworem mocznika sporządzonym w/g Pereza (20) dawała preparaty nie wykazujące aktywności enzymatycznej.

5. Ekstrakcja n-butanolem

W 1950 r. M o r t o n (17) zastosował specjalną technikę ekstrakcji i oczyszczania enzymów związanych ze strukturą komórkową, a w szczególności z mitochondriami i mikrosomami. Opierając się na powyższej metodzie ekstrahowano proszki acetonowe i wilgotną masę bakteryjną różnymi ilościami alkoholu i moderatora fosforanowego. Aktywność wyciągów była bardzo mała. (Tabela I).

Tabela I
Wpływ sposobów dezintegracji *M. phlei* na aktywność enzymu transaminazy Asp-Glu

Sposób dezintegracji	Warunki dezintegracji	Czas dezintegracji w minutach	Aktywność wyciągów w jednostkach
mechaniczna w moździerz	proszek acet. + tlenek glinu zmieszane w stos. 1:3 + moderator fosforanowy	90	585—595
mechaniczna w moździerz	wilgotna masa bakteryjna + tlenek glinu 1:3 + moderator fosforanowy	90	415—425
milenie w młynku bakteryjnym	wilgotna masa bakteryjna + pył szklany (1:2) + moderator fosforanowy	6 (mielono 3 razy po 2 min.)	490—500
ultradźwiękowa	3 g wilgotnej masy bakteryjnej/ 10 ml moderatora fosforanowego	90	430—440
ultradźwiękowa	3 g wilgotnej masy bakteryjnej/ 10 ml moderatora fosforanowego + $1,5 \cdot 10^{-3}$ M glutationu + $2,3 \cdot 10^{-3}$ M obu substratów reakcji	90	490—500
n-butanolem	proszek acet. + n-butanol + moderator fosforanowy (0,6:2:5)	10	120—125

Dokładne warunki doświadczeń podano w tekście. Ilość jednostek aktywności enzymu obliczano na 25 ml poszczególnych wyciągów. Liczby przedstawiają wartości reprezentatywne dla danej grupy doświadczeń. Gruntowne badanie wpływu czasu, rodzaju moderatora, ilości czynnika rozcierającego, gęstości zawiesin bakteryjnych itp. pozwoliło na opracowanie optymalnych warunków dezintegracji. Wyniki zawarte w powyższej tabeli przedstawiają

wartości aktywności wyciągów dla warunków optymalnych. Przewyciężenie poważnych trudności związanych z otrzymywaniem aktywnych bezkomórkowych wyciągów umożliwiło dalszą pracę nad oczyszczaniem enzymu.

Tabela II
Aktywność preparatów enzymatycznych w zależności od rodzaju i stopnia oczyszczenia

Rodzaj preparatu	Jednostki aktywności	Azot białkowy	Aktywność specyficzna
Zawiesina komórek nieuszkodzonych	115	—	—
Proszek acetonowy	820	—	—
Surowy wyciąg enzymatyczny	590*	125	4,7
Wyciąg enzymatyczny po usunięciu kwasów nukleinowych i lipidów	500	96	5,2
Osad białka wytrąconego przy całkowitym nasyceniu siarczanem amonu	330	55	6,0
Fracja białkowa otrzymana przy 35—45% nasycenia siarczanem amonu	220	10	22,0
Fracja białkowa 35—45% nasycenia strącona ponownie	180	6,4	28,0

*) Jak wykazały moje spostrzeżenia różnica pomiędzy aktywnością enzymatyczną proszku acetonowego, a aktywnością surowego wyciągu spowodowana jest trudnościami całkowitej ekstrakcji enzymu, a w mniejszym stopniu inaktywacją enzymu zachodzącą podczas dezintegracji.

IV. Oczyszczanie enzymu.

Bezkomórkowy wyciąg enzymatyczny otrzymany na drodze mechanicznej dezintegracji proszku acetonowego z tlenkiem glinu zawierał w porównaniu do innych wyciągów najmniejszą ilość ciał lipidowych, a największą ilość białka czynnego enzymatycznie. Służył on jako materiał wyjściowy do celów oczyszczania transaminazy.

Przed frakcjonowaniem białek, lipidy z wyciągu usuwano przez zamrożenie do kilku stopni poniżej 0, a kwasy nukleinowe przez wytrącenie siarczanem protaminy dodawanym w ilościach 2 mg/1 ml wyciągu (1) i odwirowanie.

Białka ekstraktu frakcjonowano siarczanem amonu w substancji po doprowadzeniu pH ekstraktu do 5,4 za pomocą 3 M moderatora octanowego. Osad białka wytrąconego przy całkowitym nasyceniu siarczanem amonu odwirowywano i rozpuszczano w moderatorze fosforanowym o pH 7,4. Część nierozpuszczalną odwirowywano ponownie i odrzucano.

Dalsze frakcjonowanie wykazało maksimum aktywności przy 35—45% nasycenia siarczanem amonu. Frakcję tą strącano ponownie przy takim samym nasyceniu siarczanem amonu.

Dializę przeprowadzano w woreczkach celofanowych wobec moderatora fosforanowego pH 7,4 kilkanaście godzin w temp. 3°C. Wyniki podano w tabeli II.

W tabeli II obliczono aktywność enzymatyczną dla 4,2 g wilgotnej masy komórek bakteryjnych nieuszkodzonych, 0,6 g proszku acetonowego i wyciągu otrzymanego z 0,6 g proszku acetonowego. Aktywność specyficzną obliczano dzieląc jednostki aktywności przez mg azotu białkowego oznaczonego metodą mikro-Kjeldahla. Dalsze oczyszczanie preparatu transaminazy za pomocą frakcjonowania alkoholem lub acetonem i adsorbcji na żelu fosforanu wapnia (trójzasadowy) nie dało przyrostu aktywności specyficzej.

V. Badania jednorodności oczyszczonego preparatu transaminazy.

Preparat transaminazy poddano rozdzielowi przy pomocy elektroforezy bibułowej w temp. pokojowej. Obraz elektroforetogramu wykazuje obecność 3 frakcji globulinowych odpowiadających α_1 , α_2 , β globulinom surowicy. Frakcja α_1 globulin zawierała około 75% całkowitej zawartości białka preparatu transaminazy. Nie udało się oznaczyć aktywności enzymatycznej żadnej frakcji, ponieważ w czasie 10 godz. elektroforezy następowała całkowita inaktywacja enzymu.

Mimo niejednorodności oczyszczony preparat transaminazy nie zawierał takich enzymów jak dezamidazy, dezaminazy, dekarboksylazy aminokwasów i innych, które towarzyszą transaminazie w surowym wyciągu enzymatycznym, a nawet w pierwszych stadiach oczyszczania.

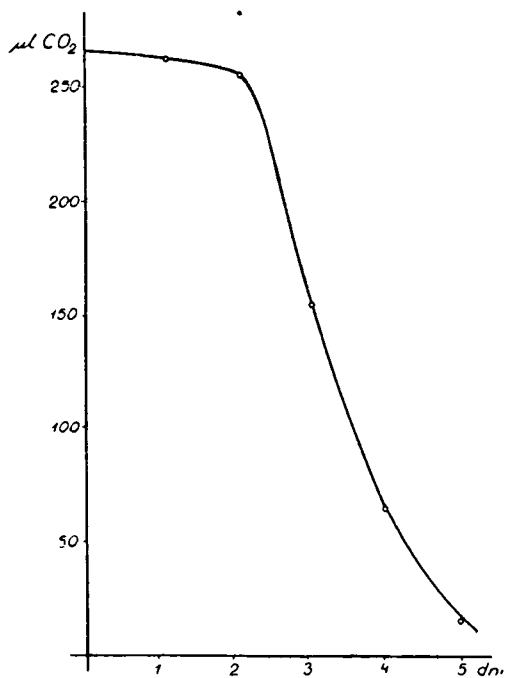
VI. Trwałość preparatu transaminazy.

Częściowo oczyszczony preparat enzymatyczny jest nietrwały nawet przy przechowywaniu w temperaturze kilku stopni poniżej 0. Po kilku dniach następowała całkowita inaktywacja enzymu (ryc. 1) Trwalsze były surowe wyciągi enzymatyczne.

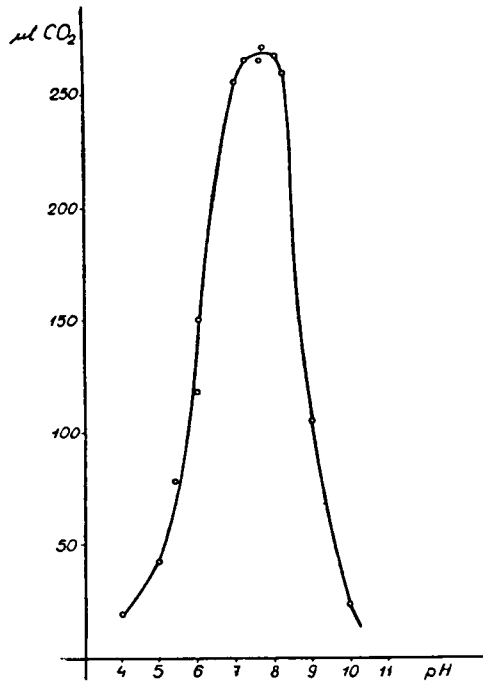
Dodatek cysteiny, jako stabilizatora, nie zapobiegał inaktywacji. Również dodatek wyciągu serca myszy zawierającego koenzym transaminazy nie reaktywował enzymu. Ogrzanie preparatu do temperatury 60°C przez 5 min. powoduje całkowitą inaktywację transaminazy.

VII. Optymalne pH preparatu transaminazy.

Transaminaza, tak w surowych wyciągach, jak i w częściowo oczyszczonych preparatach jest aktywna w zakresie pH od 6—8,5. Inaktywacja enzymu zachodzi przy pH poniżej 4,5 i powyżej 9,5 pH. Zależność aktywności transaminazy od pH przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 1. Zależność aktywności enzymu od czasu przechowywania preparatu.



Ryc. 2. Zależność aktywności enzymu od pH środowiska

Warunki doświadczenia: $2,5 \cdot 10^{-4}$ M Asp, $3,5 \cdot 10^{-4}$ M KG, preparat enzymatyczny o zawartości 0,5 mg azotu białkowego, bufor fosforanowy. Obj. mieszaniny inkubacyjnej 6 ml. Dane dotyczące ilościowego oznaczania podano w tekście.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Podjęmowane przez wielu autorów próby otrzymania krystalicznych, a przynajmniej wysoce oczyszczonych i jednorodnych transaminaz nie dały wyników pozytywnych. Główną przyczyną niepowodzeń należy upatrywać w nietrwałości enzymu i trudności dokładnego oddzielenia go od innych białek.

Dogodnym źródłem dla izolowania i oczyszczania transaminaz są tkanki zwierzęce, z których udało się otrzymać w dość znacznym nawet stopniu oczyszczone preparaty enzymatyczne (8, 22, 19). Na większe trudności napotyka się przy izolowaniu transaminazy Asp-Glu i innych transaminaz z materiału bakteryjnego. Preparaty transaminaz bakteryjnych otrzymane przez Altenberna i Hou-

sewrighta, (1), oraz Rudmana i Meistera (21) wykazywały niski stopień oczyszczenia.

W pracy naszej nad transaminazą Asp-Glu z *M. phlei* nie udało się całkowicie przewyciężyć trudności związanych z oczyszczaniem enzymu. Otrzymany preparat kilkakrotnie oczyszczony okazał się nie trwały. Różni się on pod tym względem od oczyszczonego preparatu z serca świni (22), który wytrzymuje ogrzewanie przez 1 godz. w temp. 60°C, a przechowywany w lodówce nie traci aktywności w ciągu 2 tygodni. Przynależność do frakcji wytrącającej się przy 35—45% nasyceniu siarczanem amonu i obraz elektroforetogramu pozwalają przypuszczać, że enzym należy do globulin. Optimum pH dla transaminazy Asp-Glu z *M. phlei* leży w zakresie 7—8 pH, w przeciwieństwie do transaminazy u *E. coli* dla której optimum pH wynosi 8,5 (13)

Przypuszczenie Nisonoffa i współp. (18), że moderator fosforanowy wpływa stabilizująco na transaminazę znalazło potwierdzenie w świetle niniejszych badań.

Specjalnego omówienia wymaga sprawa metodyki dezintegracji *M. phlei*. O ile izolowanie enzymów z tkanek zwierzęcych i niektórych drobnoustrojów jest stosunkowo łatwe, to izolowanie enzymów z prątków kwasoodpornych nastęrcza poważne trudności, na co zwraca uwagę również Zeller i współp. (25). Nasunęło to potrzebę dokładnego przebadania poszczególnych metod dezintegracji.

Z szeregu dostępnych metod stosowanych w naszej pracy najlepszą okazała się dezintegracja mechaniczna z tlenkiem glinu, szczególnie kiedy rozcierano proszek acetonowy, a nie wilgotną masę bakteryjną.

Już Edson (5) oceniając dotychczasowe wyniki prac nad metabolizmem prątków kwasoodpornych wysuwa przypuszczenie, że trudności ekstrakcji enzymów związane są z dużą zawartością lipidów w prątkach. Dlatego posługiwanie się preparatami częściowo odtłuszczonymi, jakimi są proszki acetonowe, dawało lepsze wyniki.

Trzeba tu podkreślić, że tak w metodzie rozcierania w móżdzie-rzu, jak i podczas mielenia w młynku bakteryjnym, decydującą rolę odgrywa dobranie odpowiedniej ilości środka rozcierającego.

Czas dezintegracji mechanicznej wynoszącej wg McIlwaina kilka minut jest niewystarczający dla ekstrakcji transaminazy z *M. phlei*. Również izolowanie oksydazy kwasu mlekowego przez

Edsona (4) wymagało 4 godz. mielenia *M. phlei* w młynie Booth-Greena (3).

Jak wykazały doświadczenia własne nad dezintegracją ultradźwiękową niezmiernie ważną rzeczą jest dobranie odpowiedniej gęstości homogennej zawiesiny bakteryjnej. Jeżeli gęstość zawiesiny jest zbyt wielka, wtedy energia fal ultrakrótkich zamienia się przeważnie na energię cieplną; przedłuża to znacznie czas dezintegracji i stwarza dodatkowe trudności w chłodzeniu materiału dezintegrowanego. Kolbki z wklęsłym dnem skupiające fale w swym wnętrzu podwyższają znacznie efekt działania ultradźwięków.

Nie wszystkie sposoby stosowane w naszej pracy dały dobre wyniki. Autoliza, plazmoliza, a nawet ekstrakcja n-butanolem okazały się nieprzydatne do celów izolowania transaminazy. Fakt powyższy podkreśla konieczność przebadania różnych metod i doświadczalnego ustalenia warunków dezintegracji i ekstrakcji w pracach nad izolowaniem enzymów z materiału bakteryjnego.

Kierownikowi Zakładu Prof. dr J. Opieńskie j-Blauth za wskazówki i kierownictwo pracą składam podziękowanie. Praca wykonana została przy technicznej pomocy laboranta St. Trojnar a.

PIŚMIENNICTWO

1. Altenbern R. A., Housewright R. D.: *J. Biol. Chem.* 204, 159, 1953.
2. Barrolier J.: *Naturwiss.* 42, 416, 1955.
3. Booth V. H., Green D. E.: *Biochem. J.* 32, 855, 1938.
4. Edson N. L.: *Biochem. J.* 41, 145, 1947.
5. Edson N. L.: *Bact. Rev.* 15, 147, 1951.
6. Edson N. L., Hunter G. J.: *Biochem. J.* 41, 139, 1947.
7. Fincham J. R. S.: *J. Gen. Microbiol.* 5, 793, 1951.
8. Green D. E., Leloir L. F., Nocito V.: *J. Biol. Chem.* 161, 559, 1945.
9. Housewright R. D., Thorne C. B.: *J. Bact.* 60, 89, 1950.
10. Kański M., Sakławska-Szymonowa O., Szymona M.: *Acta Biochem. Pol.* 1, 277, 1954.
11. Krebs H.: *Biochem. J.* 47, 605, 1950.
12. Levinson H. S., Sevag M. G.: *Arch. Bioch. Bioph.* 50, 507, 1954.
13. Lichstein H. C., Cohen P. P.: *J. Biol. Chem.* 157, 55, 1945.
14. Mc Ilwain H.: *J. Gen. Microbiol.* 2, 288, 1948.
15. Mc Ilwain H., Hughes D. E.: *Biochem. J.* 38, 187, 1944.
16. Meister A., Sober H. A., Tice S. V.: *J. Biol. Chem.* 189, 591, 1951.
17. Morton R. K.: *Nature* 166, 1092, 1951.
18. Nisonoff A., Henry S. S., Barnes F. W.: *J. Biol. Chem.* 199, 713, 1951.
19. O'Kane D. E., Gunsalus J. C.: *J. Biol. Chem.* 170, 425, 1947.
20. Perez I. I.: *Isolement, purification et cristallization des proteides, Techniques de Laboratoire*, 1947, Paris.
21. Rudman D., Meister A.: *J. Biol. Chem.* 200, 591, 1953.
22. Schlenk F., Fischer A.: *Arch. Bioch.* 12, 69, 1947.
23. Utter M. F., Werkman C. H.: *Biochem. J.* 36, 485, 1942.
24. Wiame J. M., Storck R.: *Bioch. Bioph. Acta* 10, 268, 1953.
25. Zeller E. A., Van Orden L. S., Kircheimer W. F.: *J. Bact.* 67, 153, 1954.

РЕЗЮМЕ

Для очищения аспарагиново — глутаминовой трансминазы от *Mycobacterium phlei* применялись разные методы дезинтеграции, из которых самыми лучшими оказались механическая дезинтеграция посредством окиси алюминия и ультразвуковая. Очищенные препараты трансминазы составили при фракционировании сернокислым аммонием фракцию 35 — 45% насыщения, а при электрофоретическом разделянии — фракцию α_1 глобулин.

Очищенные от *Mycobacterium phlei* препараты трансминаз отличаются огромной непрочностью и уже спустя несколько дней подвергаются полной инактивации.

SUMMARY

For isolating aspartic-glutamic transaminase from *Mycobacterium phlei* various methods of desintegration were used, of which mechanic desintegration with aluminium oxide and ultrasound desintegration proved best. Purified transaminase preparations, when fractionated with ammonium sulphate, belonged to the fraction precipitated at 35—45 per cent of saturation: when separated electrophoretically, they belonged to the α_1 -globulin fraction.

Purified transaminase preparations obtained from *Mycobacterium phlei* show a great lability, undergoing complete inactivation after a few days.