

Z Katedry i Zakładu Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej
w Lublinie

Kierownik: prof. Dr Janina Opieńska-Blauth

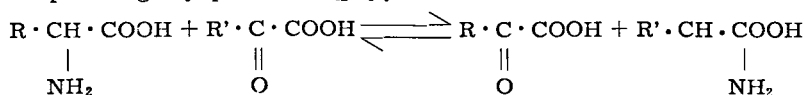
Olga SAKŁAWSKA-SZYMONOWA

Reakcje transaminacji u *Mycobacterium phlei*

Реакции трансаминирования у *Mycobacterium phlei*

Transamination Reactions in *Mycobacterium phlei*

W całości kształcie przemian aminokwasowych reakcje transaminacji zajmują jedną z zasadniczych pozycji, ponieważ dzięki nim odbywa się w żywych organizmach endogenna synteza aminokwasów. Reakcje transaminacji zachodzące pomiędzy α -aminokwasami i α -ketokwasami polegają na przeniesieniu grupy aminowej aminokwasu na ketokwas i, jako proces odwracalny, mogą być przedstawione w sposób ogólny przez następujące równanie chemiczne:



Po raz pierwszy enzymatyczną reakcję transaminacji wykazali w tkankach zwierzęcych Braunstein i Kritzmanowa (2) na międzycząsteczkowej przemianie kwasu glutaminowego i szczawiooctowego bez pośredniego uwalniania amoniaku. Następujące po tym odkryciu szerokie badania tych procesów wykazały powszechność ich w całym świecie istot żywych. W świecie drobnoustrojów po raz pierwszy opisano reakcje transaminacji w zawiesinach dwunastu różnych szczepów bakteryjnych w r. 1945 (11).

U *Mycobacteriaceae* transaminację asparagino- α -ketoglutarową wykazano w r. 1954, stosując zawiesinę i proszek acetonowy z saprofitycznego szczepu *Mycobacterium phlei* (8). Następnie Ito i Sugano (8) opisali u szczepu ptasiego transaminację asparaginy, glicyny, fenyloalaniny, leucyny, waliny, alaniny i kwasu asparaginoowego i wpływ hamujący hydrazidu kwasu izonikotynowego. Yone-mura i Iizuka (13) przebadali transaminację 20 aminokwasów w obecności kwasu α -ketoglutarowego w szczepie wirulentnym bydłęcym i znaleźli tylko transaminację glutaminowo-pyrogrońową i glutaminowo-szczawiooctową. W r. 1956 Sakławska-Szymonowa i Gąsior (12) wskazali na obecność transaminacji asparagino- α -ketoglutarowej w szczepach *Mycobacterium tuberculosis H37Ra*, *Mycobacterium friburgi* i *Mycobacterium pellegrini*, oraz transaminacji aspa-

raginowo-pyrogronowej u *Mycobacterium phlei*. Gąsior (3) otrzymał preparat transaminazy asparaginowo- α -ketoglutazarowej z *Mycobacterium phlei* w stanie częściowo oczyszczonym i podał jego własności. Halpern i Grossowicz (6) opisali reakcje transaminacji u *Mycobacterium phlei* i *Mycobacterium tuberculosis var. bovis* BCG przy zastosowaniu różnych aminokwasów i kwasu α -ketoglutazarowego i podali własności transaminazy asparaginowo α -ketoglutazarowej i glutaminowo-pyrogronowej otrzymanych z *Mycobacterium phlei*. Youatt (14), badając działanie hydrazynu kwasu izonikotynowego na transaminazy u *Mycobacterium tuberculosis* BCG, wykazała w tym szczepie transaminacje pomiędzy niektórymi aminokwasami a kwasem α -ketoglutazarowym, szczawiooctowym i pyrogronowym.

Celem niniejszej pracy było zbadanie procesów transaminacji u *Mycobacterium phlei* przy stosowaniu aminokwasów dotychczas jeszcze nie badanych, jak grupa aminokwasów zasadowych w szczególności ornityna i cytrulina i amidów kwasu glutaminowego i asparaginowego.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Drobnoustrój.

Do badań używany był saprofityczny szczep *Mycobacterium phlei* pochodzący z Instytutu Gruźlicy w Warszawie.

Podłoże i hodowle.

W większości doświadczeń prątki hodowano na podłożu stałym Loewensteina (5) w butlach Roux w ciągu tygodnia przy 37°C i dalszych 2—3 dni w temperaturze pokojowej lub 0—4°C. Podłoże z jednej butli Roux posiewano pięcioma ml wodnej zawiesiny prątków zebranych z jednej siedmiodniowej hodowli na podłożu skośnym. Po ukończeniu inkubacji masę bakteryjną zbierano z podłoża przy pomocy ezy i przemywano wodą destylowaną około 10 razy. Wydajność jednej hodowli wynosiła przeciętnie 10 g mokrej masy.

Preparat acetonowy.

Przemytą masę bakteryjną traktowano 4 razy pięciokrotną objętością oziębionego acetonu (−15°C) mieszając i odwirowując za każdym razem, po czym suszono w eksykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem aż do uzyskania jasnokremowego proszku. Waga suszonych acetonem bakterii stanowiła około 17% wagi mokrej masy. Proszek acetonowy przechowywany w temperaturze 0° zachowywał swoją aktywność enzymatyczną w ciągu kilku miesięcy.

Substraty.

L — asparagina (Asp-NH₂) f-my J. D. Riedel E. de Haen

DL — asparaginowy kwas (Asp) f-my Schuchard, NRF

DL — histydyny HCl (His) f-my L. Light

L — argininy HCl (Arg) f-my B. D. H. Laboratory Reagent, London

DL — ornityna (Orn) f-my B. D. H. Laboratory Reagent, London

L — lizyny HCl (Lys) f-my L. Light

DL — cytrulina (Cit) f-my B. D. H. Laboratory Reagent, London

DL — glutamina (Glu-NH₂) — preparat otrzymany od P. Mastalerza (Wrocław).

Sporządzano 0,04 M roztwory L-aminokwasów i 0,08 M roztwory DL-aminokwasów w buforze fosforanowym, 0,04 M, pH 8,2. Aminokwasy w postaci chlorowodorków były doprowadzane do odpowiedniego pH przy pomocy 1 N KOH. Roztwór kwasu α -ketoglutazarowego (f-my L. Light, Ltd. London) sporządzany był w stężeniu 0,08 M i doprowadzany do odpowiedniego pH jak wyżej.

Doświadczenia polegały na 3-godzinnym inkubowaniu w temperaturze 37°C proszku acetonowego w buforze fosforanowym z dodatkiem substratów. Jeżeli w tekście nie podano inaczej, w końcowej objętości 1 ml każdej próbki znajdo-

wało się 50 mg proszku, 20 mikromoli α -ketoglutaranu, 10 mikromoli formy I-aminokwasu i 30 mikromoli buforu fosforanowego pH 8,2.

Inkubację przerywano przez dodanie 0,1 ml 25% kwasu trójchlorooctowego i po oddzieleniu białka przy użyciu suchych sączków, filtry poddawano chromatografii.

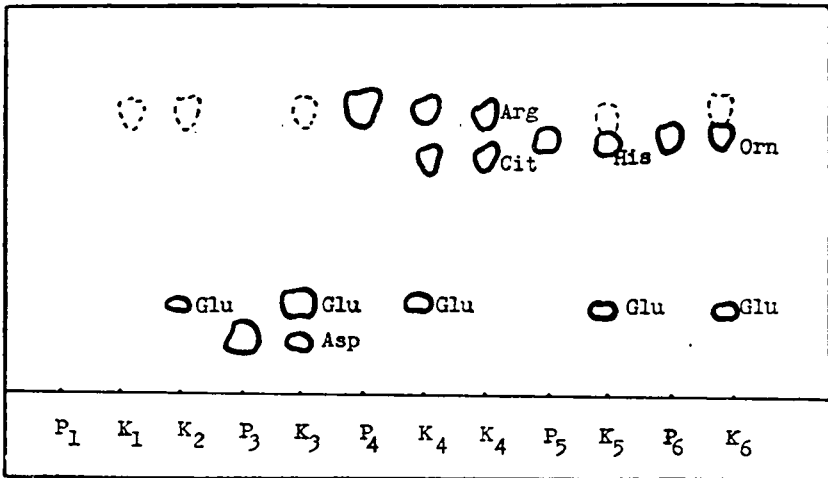
Posługiwano się techniką wstępującą jednokierunkową w układzie fenol-woda (7:3) w atmosferze par amoniaku, oraz dwukierunkową w układach propanol-woda (7:3) i fenol-woda (7:3). Dla rozdzielenia argininy, cytruliny i ornityny używano fenol zbuforowany (6,3% cytrynian sodu i 3,7% NaH_2PO_4) + kwas octowy lodowaty (0,5 ml/100 ml), oraz układ własny o składzie: aceton-pirydyna-etanol-woda-dwuetyloamina (40:20:20:15:5). Stosowano wyłącznie bibułę Whatmana Nr 1.

Wywoływanie plam aminokwasów przeprowadzano przy pomocy acetonowego roztworu ninhydryny 0,2% i odczynnika PDABA (paradwumetylo-aminobenzaldehydu w butanolu nasyconym 5% HCl, 1% roztwór), dającego z cytruliną żółte plamy. Oznaczenia ilościowe wykonywano metodą Barrolliera (1) i Kańskiego (10). Postępując wg tej ostatniej metody, chromatogramy wywoływano w temperaturze 60°C odczynnikiem stanowiącym mieszaninę propanolu (25 ml), etanolu (25 ml), pirydyny (50 ml) i 0,1 g ninhydryny, a następnie utrwalano przez zanurzenie w 0,1% roztworze acetonowym sublimatu. Plamy kwasu glutaminowego wycinano wg stałego szablonu i po wyluowaniu 5 ml metanolu natężenie barwy eluatu oznaczano w fotometrze Pulfricha stosując filtr S-53.

BADANIA WŁASNE

Pierwsza seria doświadczeń miała na celu wykrycie w badanym drobnoustroju enzymów katalizujących transaminację pomiędzy kwasem α -ketoglutazarowym a aminokwasami zasadowymi. Doświadczenia wstępne tej serii wykonane przy użyciu proszku acetonowego z hodowli stałej nie dały całkowicie zadowolających wyników. Preparat enzymatyczny zawierał znaczne ilości aminokwasów endogennych, utrudniających śledzenie tworzenia się kwasu glutaminowego w procesie transaminacji. W związku z tym podjęto próby otrzymania preparatu pozbawionego własnych aminokwasów. W tym celu sporządzono preparaty acetonowe: 1) z bakterii hodowanych na podłożu syntetycznym DGK (4); 2) z bakterii głodzonych w ciągu 48 godzin w chłodni; 3) z bakterii hodowanych na podłożu zubożonym, zawierającym tylko kwas glutaminowy w buforze fosforanowym pH 7,0; 4) z preparatu acetonowego autolizowanego przy pH 8,2 w ciągu 24 godzin w temp. 37° i ponownie traktowanego acetonem. Jedynie metoda autolizy dała pozytywne rezultaty. Uzyskany preparat acetonowy zachowuje aktywność transaminacyjną w stosunku do badanych aminokwasów, przy czym nie zawiera na początku inkubacji kwasu glutaminowego ani też żadnych innych związków reagujących z ninhydryną pozytywnie. Ponadto preparat rozkłada asparaginę do kwasu asparaginowego oraz argininę do cytruliny.

Wyniki doświadczeń wykonanych na tym preparacie są przedstawione na ryc. 1 i ryc. 2 oraz w tab. 1.



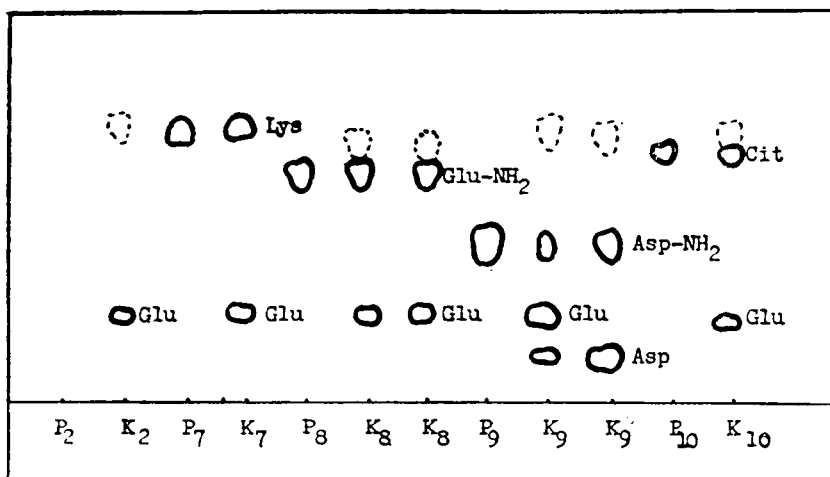
Ryc. 1. Transaminacje w proszku autolizowanym.

P — próby początkowe (zerowe), **K** — próby końcowe (po 3 godz. inkubacji), **P₁** i **K₁** — Kontrole bez dodatku substratów, **P₂** i **K₂** — Kwas α -ketoglutarowy, **P₃** i **K₃** — Kwas asparaginowy + Kwas α -ketoglutarowy, **P₄** i **K₄** — Arginina + Kwas α -ketoglutarowy, **K'₄** — Arginina, **P₅** i **K₅** — Histydyna + Kwas α -ketoglutarowy, **P₆** i **K₆** — Ornityna + Kwas α -ketoglutarowy, **P₇** i **K₇** — Lizyna + Kwas α -ketoglutarowy, **P₈** i **K₈** — Glutamina + Kwas α -ketoglutarowy, **K'₈** — Glutamina, **P₉** i **K₉** — Asparagina + Kwas α -ketoglutarowy, **K'₉** — Asparagina, **P₁₀** i **K₁₀** — Cytrulina + Kwas α -ketoglutarowy.

Transamination reactions in autolysed powder;

P — initial (zero) tests, **K** — final tests (after 3 hrs. incubation), **P₁** and **K₁** controls without substrates, **P₂** and **K₂** α -ketoglutaric acid, **P₃** and **K₃** aspartic acid + α -ketoglutaric acid, **P₄** i **K₄** arginine + α -ketoglutaric acid, **K'₄** arginine, **P₅** and **K₅** histidine + α -ketoglutaric acid, **P₆** and **K₆** ornithine + α -ketoglutaric acid. **P₇** and **K₇** lysine + α -ketoglutaric acid, **P₈** and **K₈** glutamine + α -ketoglutaric acid, **K'₈** glutamine, **P₉** and **K₉** asparagine + α -ketoglutaric acid, **K'₉** asparagine, **P₁₀** and **K₁₀** citrulline + α -ketoglutaric acid

Jak widać, kwas glutaminowy powstaje w wyniku transaminacji na kwas α -ketoglutarowy grup aminowych wszystkich badanych aminokwasów i amidów (w próbie 8a również na skutek dezamidacji). W próbach 9a i 9b tworzy się kwas asparaginowy w wyniku działania dezamidazy asparaginowej, zaś w próbach 4a i 4b powstaje cytrulina jako produkt dezaminacji argininy. Identyfikację tego ostatniego aminokwasu przeprowadzono, stosując różne układy rozpuszczalników, w tym własny, oraz reakcję barwną, jaką cytrulina daje na bibule z parawumetyloaminobenzaldehydem.



Ryc. 2. Transaminacje w proszku autolizowanym (objaśnienia vide Ryc. 1).
 Transamination reactions in autolysed powder. For explanations see Fig. 1.

Tabela 1

Aminokwasy 10 mikromoli formy L- 20 " " DL-	Kwas glutaminowy w mikromolach na 1 ml mieszaniny po 3 godz. inkubacji	Aktywność w %
L-arginina	0,30	4,1
DL-asparaginowy kwas	7,32	100,0
L-asparagina	4,40	60,0
DL-cytrulina	0,40	5,4
DL-glutamina	0,93	12,0
DL-histydyna	1,00	13,5
L-lizyna	0,13	1,7
DL-ornityna	0,80	11,0

Następna seria doświadczeń dotyczyła wpływu fosforanu pirydoksalu, który jest koenzymem transaminaz, na przebieg wykrytych reakcji transaminacji. W tym celu do poszczególnych prób zawierających preparat enzymatyczny dodawano fosforan pirydoksalu (f-my KEG Laboratories, INC) w ilości 24 µg i preinkubowano w ciągu 15 minut przed dodaniem właściwych substratów. Wyniki przedstawione są w tab. 2.

Jak wynika z tab. 2 — fosforan pirydoksalu wywiera dodatni wpływ na przebieg transaminacji zwiększając powstawanie kwasu glutaminowego w granicach od około 20—35%.

Tabela 2

Aminokwasy 10 mikromoli formy L- 20 „ „ DL-	Kwas glutaminowy w mikromolach na 1 ml mieszaniny po 3 godz. inkubacji	
	bez fosforanu pirydoksalu	z fosforanem pirydoksalu
L-arginina	0,33	0,43
DL-asparaginowy kwas	7,26	8,60
L-asparagina	3,88	4,60
DL-histydyna	0,90	1,20
L-lizyna	0,15	0,20
DL-ornityna	0,90	1,08

Tabela 3

Nr	Nazwa aminokwasu	Występowanie aminokwasu po 24 godz. autolizy proszku:			
		ogrzewanego przed autolizą		nieogrzewanego	
		pH 8,2	pH 4,5	pH 8,2	pH 4,5
1	Kwas asparaginowy	++	++	++++	+++
2	Kwas glutaminowy	++++	++++	+++	+
3	Seryna	+	+	+++	++
4	Glicyna	+	+	++	+
5	Treonina			+++	+
6	Alanina	++	++	++++	+++
7	Tyrozyna			+	+
8	Ornityna			++	+
9	Lizyna	++	++	++	++
10	Arginina			+	+
11	Histydyna			++	+
12	Cytrulina			++	
13	Kwas α -amino-masłowy			+	++++
14	Kwas γ -amino-masłowy			++	
15	Walina, tryptofan, metionina			++++	+++
16	Leucyna, izoleucyna			++++	++++
17	Fenylalanina			+++	+
18	Prolina			++	+
X ₁	Niezidentyfikowane			++++	-
X ₂				+++	-
X ₃				++	-

Zagadnieniem dodatkowym, które wyłoniło się w trakcie pracy i zostało opracowane, był proces autolizy pierwotnego preparatu acetonowego*. Wykazano, że w czasie autolizy przyrasta azot α -aminowy. Ponadto stwierdzono, że uwalnianie się podczas autolizy aminokwasów jest procesem enzymatycznym i że zależnie od środowiska, w jakim

proceedzi się autolizę (pH 4,5 i pH 8,2) ilość i jakość uwalniających się aminokwasów jest różna. Skład aminokwasowy autolizatów określony przy pomocy chromatografii dwukierunkowej podano w tab. 3.

Przy interpretacji chromatogramów oraz tab. 2 zwraca uwagę fakt, że w proszkach gotowanych, jak również w próbach początkowych znajduje się znacznie więcej kwasu glutaminowego niż w proszkach nie gotowanych po 24 godzinnej autolizie. Równocześnie powstaje kwas γ -aminomasłowy (szczególnie przy pH 4,5), stanowiący, jak wykazano następnie techniką manometryczną, produkt dekarboksylacji kwasu glutaminowego. Kwas γ -aminomasłowy został zidentyfikowany chromatograficznie.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

W badaniach naszych posługiwano się wyłącznie preparatami acetonowymi *Mycobacterium phlei*, ponieważ, jak to zaobserwowano w poprzednich pracach (3, 9), preparaty acetonowe zachowują niezmienną zdolność do transaminacji przez dłuższy okres czasu, nawet do ośmiu miesięcy, a poza tym należy przypuszczać, że przy stosowanej przez nas metodzie przygotowywania preparatów, zachowują one tylko nieznacznie zmienione układy enzymatyczne.

Spośród nie zbadanych jeszcze u *Mycobacterii* aminokwasów transaminujących interesowały nas szczególnie aminokwasy zasadowe ze względu na ich swoisty udział w metabolizmie azotowym. Ponadto jako substraty do transaminacji posłużyły glutamina i asparagina, ta ostatnia często stosowana w podłożach syntetycznych. Jako akceptora używano wyłącznie kwas α -ketoglutazarowy.

W proszku acetonowym przygotowanym w sposób ogólnie przyjęty udało się wprawdzie wykazać reakcje transaminacji aminokwasów zasadowych, ale obecność kwasu glutaminowego już w samym preparacie przed dodaniem substratów utrudniała ocenę ilościową wyników. W celu usunięcia kwasu glutaminowego z preparatu pierwotnego przeprowadzono wiele prób, jak hodowanie bakterii na podłożach syntetycznych zubożonych, głodzenie, a w końcu autolizę pierwotnego preparatu acetonowego. Jedynie tylko na drodze autolizy uzyskiwano materiał nie zawierający kwasu glutaminowego, a zachowujący nienaruszoną aktywność transaminacyjną. Należy przypuszczać, że w preparatach acetonowych,

* 5 g proszku acetonowego z hodowli stałej zawieszono w 100 ml buforu fosforanowego (pH 4,5 lub 8,2) i inkubowano z dodatkiem 1,0 ml toluenu w temp. 37°C. Po upływie 24 godzin wirowano. Płyn z nad osadu odbiarczano CCl_3COOH i po odsoleniu na kolumnach z żywicami Dowex-50 lub SDW-3 analizowano aminokwasy techniką chromatografii dwukierunkowej. Osad przemywano wielokrotnie wodą destylowaną i traktowano acetonem w sposób opisany uprzednio.

w których struktura komórkowa jest częściowo zachowana, autoliza nie niszczy układu enzymatycznego dla transaminacji, podczas gdy przechowywanie w temperaturze kilku stopni poniżej 0 preparatów oczyszczonych drogą frakcjonowania bezkomórkowych wyciągów enzymatycznych z proszku acetonowego *Mycobacterium phlei* siarczanem amonu w całkowitym wysyceniu i w wysyceniu 35—45% oraz dializy, powoduje całkowitą utratę ich aktywności w ciągu kilku dni (3). W autolizatach stwierdzono przyrost azotu aminowego w miarę czasu autolizy, oraz wykryto chromatograficznie pełny komplet dwudziestu kilku aminokwasów, między innymi cytrulinę jako produkt deziminacji argininy i kwas γ -aminomasłowy, jako produkt dekarboksylacji kwasu glutaminowego.

W doświadczeniach z aminokwasami zasadowymi oraz asparaginą i glutaminą przy zastosowaniu kwasu α -ketoglutazarowego jako akceptora grup aminowych stwierdzono w preparacie autolizowanym, transaminację dla wszystkich badanych substratów. Na podstawie oznaczeń ilościowych kwasu glutaminowego daje się ułożyć malejący szereg aktywności dla poszczególnych aminokwasów. Jeżeli przyjmiemy transaminację kwasu L-asparaginowego za 100, to: L-asparagina 60% > DL-histydyna 13,5 > DL-glutamina 13% > DL-ornityna 11% > DL-cytrulina 5,6% > L-arginina 4,0% > L-lizyna 1,7%.

Wyniki badań transaminacji na różnych szczepach *Mycobacterii* dają różne wyniki. I tak Youatt (14) nie wykazała u *Mycobacterium tuberculosis* BCG transaminacji argininy, histydyny i lizyny. Ponadto autorka ta nie wykrywa również transaminacji asparaginy, która jej zdaniem jest bardzo szybko metabolizowana do kwasu asparaginowego i nie może być bezpośrednio wiązana z reakcją transaminacji. Przeciwnie Ito i Sugano (8) stwierdzili transaminację asparaginy u szczepu ptasiego. Z doświadczeń Halperna i Grossowicza (6) przeprowadzonych na zawiesinach i ekstraktach bezkomórkowych *Mycobacterium phlei* i *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG wynika, że w transaminacjach uczestniczą: kwas asparaginowy, arginina, histydyna i lizyna. Aktywności trzech pierwszych substratów pozostają w zgodzie z naszymi wynikami, natomiast lizyna według naszych doświadczeń wykazuje bardzo słabą aktywność (1,7%, a u Halperna i Grossowicza 10% (6) w stosunku do transaminacji kwasu asparaginowego przyjętej za 100), co jest bardziej zbliżone do wyników Youatt (14). Natomiast o transaminacji ornityny i cytruliny u jakichkolwiek szczepów *Mycobacterii* nie znajdujemy żadnych danych w piśmiennictwie.

Według naszych badań asparagina i glutamina w obecności kwasu α -ketoglutazarowego podlegają równoczesnej transaminacji i dezamidacji. Wielokrotnie stwierdzono, że fosforan pirydoksalu jest koenzymem

transaminaz. Odnośnie *Mycobacterii* Kański i współpracownicy (9) nie wykazali wpływu pirydoksaminy i ATP, oraz przegotowanego wyciągu mięśnia serca (źródło fosforanu pirydoksalu) na aktywność transaminazy asparaginowo- α -ketoglutazarowej w proszku acetonowym *Mycobacterium phlei*, prawdopodobnie na skutek obecności tych kofaktorów w dostatecznych ilościach w badanym materiale. Również Halpern i Grossowicz (6) nie stwierdzili aktywowującego działania fosforanu pirydoksalu na aktywność wyciągów bezkomórkowych, co można tłumaczyć nieoddzieleniem się kofaktora od enzymu, natomiast otrzymali aktywację transaminacji asparaginowo α -ketoglutazarowej w około 20% w wyciągu przepuszczonym przez żywicę jonowymienną. Według Youatt (14) dodatek fosforanu pirydoksalu nie był konieczny do przebiegu transaminacji w zawiesinach komórkowych i ekstraktach surowych, natomiast znaczna aktywacja reakcji w około 50% wystąpiła dla preparatu enzymatycznego wytrąconego siarczanem amonu i dializowanego w ciągu kilku dni w obecności buforu octanowego przy pH 4, co wskazuje na to, że w warunkach wytrącania siarczanem amonu enzym ulega dysocjacji i kofaktor może być oddzielony drogą dializy.

W podanych doświadczeniach stwierdziliśmy zwiększenie aktywności transaminacji dla badanych aminokwasów, tj. kwasu asparaginowego, asparaginy, ornityny, histydyny i lizyny. Zakres aktywacji wahał się w granicach od około 20—35%, histydyna 33% = lizyna 33% = > arginina 30% > ornityna 20% > kwas asparaginowy 18% = asparagina 18%.

Według Halperna i Grossowicz (6) i Youatt (14) wiązanie między koenzymem i enzymem u *Mycobacterium* jest trwałe i może ulec rozerwaniu dopiero po zastosowaniu drastycznych środków.

Porównując własne doświadczenia poprzednie (9) i obecne należałoby przypuszczać, że dwudziestoczwierogodzinna autoliza, a następnie wielokrotne przemywanie i ponowne traktowanie acetonem, może powodować częściowe uwalnianie się koenzymu i dlatego dodatek tego ostatniego do proszku po autolizie daje dodatni efekt aktywacji.

Dekarboksylację kwasu glutaminowego do γ -aminomasłowego u *Mycobacterium phlei* wykazali już poprzednio Halpern i Grossowicz (7). Wyniki naszych doświadczeń były zgodne z wynikami wymienionych autorów. Zeller i współpracownicy (15) opisali reakcje rozkładu z wydzielaniem się amoniaku niektórych pochodnych gwanidynowych, między innymi również i argininy dla różnych szczepów *Mycobacterium smegmatis* i jednego szczepu *Mycobacterium phlei*.

W naszych doświadczeniach stwierdzono rozkład argininy do cytruliny, co może zachodzić na drodze reakcji deziminacji. Na podstawie wyników naszych badań dochodzi się do następujących wniosków:

1. Stwierdzono transaminację na kwas α -ketoglutarowy cytruliny i ornityny, które nie były dotychczas badane u *Mycobacterium*.

2. Potwierdzono udział w transaminacjach argininy, histydyliny, lizyny oraz asparaginy i glutaminy.

3. Aktywność transaminacji dla badanych substratów była różna: Kwas asparaginowy 100% > asparagina 60% > histydylina 13,5% > glutamina 13% > ornityna 11% > cytrulina 5,6% > arginina 4,0% > lizyna 1,7%.

4. Wykryto w reakcji dezaminacji argininy cytrulinę jako produkt pośredni.

5. Potwierdzono u *Mycobacterium phlei* dekarboksylację kwasu glutaminowego do γ -aminomasłowego.

6. Potwierdzono chromatograficznie reakcję dezamidacji asparaginy i glutaminy.

7. Wykazano, że dodatek fosforanu pirydoksalu zwiększał aktywność transaminacji w granicach około 20—35%.

8. Stosując metodę autolizy preparatów acetonowych z *Mycobacterium phlei*, uzyskano materiał bardziej odpowiedni do badań transaminacji, ponieważ nie zawierał endogennego kwasu glutaminowego i zachował nie zmienioną aktywność transaminacyjną.

9. Dla rozdzielenia argininy, cytruliny i ornityny opracowano nowy układ rozwijający: aceton, pirydyna, etanol 95%, woda, dwuetyloamina, która odgrywa istotną rolę przy rozdzielaniu.

* Składam serdeczne podziękowanie Pani Prof. Dr Janinie Opieńskiej-Blauth, Kierownikowi Zakładu i mojemu promotorowi, za kierownictwo pracą, opiekę i wskazówki przy opracowywaniu materiałów do pracy.

P I S M I E N N I C T W O

1. Barrolier J.: Ein Ninhidrinreagenz für quantitative Aminosäurenbestimmungen auf Papierchromatogrammen., *Naturwiss.*, **42**, 416, 1955.
2. Braunstein A. E., Kritzman M. G.: *Enzymologia*, **2**, 129, 1937. Cyt. wg.: Braunstein A. E.: Transamination and the Integrative Functions of the Dicarboxylic Acids in Nitrogen Metabolism. *Advances in Protein Chemistry*, **3**, 1—52, 1947.
3. Gąsior E.: Transaminaza asparaginowo-glutaminowa u *Mycobacterium phlei*, *Ann. Univ. M. Curie Skłodowska Sec. D.* **11**, 162—174, 1956.
4. Głębiński T., Jałowicka K., Sym E. A.: Metabolizm rozwojowy prątków gruźliczych szczepów H37Rv IL, hodowanych na pożywce DGK., *Gruźlica*, **18**, 413—426, 1950.
5. Gradwohl R. B. H.: *Clinical Laboratory — Methods and Diagnosis*, St. Louis, 1356, 1948.
6. Halpern Y. S., Grossowicz N.: Transamination Reactions in *Mycobacteriaceae*, *Bul. Res. Council Israel*, **6E**, 21—26, 1956.
7. Halpern Y. S., Grossowicz N.: Determination of L-Glutamic acid by Use of L-Glutamic Acid Decarboxylase from *Mycobacterium phlei*, *Proc., Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 370—373, 1956.

8. Ito R., Sugano T.: Transaminases of Avian Tubercle Bacilli, *Kekkaku*, **29**, 368—371, 1954; *Chem. Abstr.* **49**, 1841e, 1955.
9. Kański M., Sakławska-Szymonowa O., Szymona M.: Transaminacja Asparagino- α -Ketoglutarowa u *Mycobacterium phlei*. *Acta Bioch. Polon.*, **1**, 277—284, 1954.
10. Kański M.: (doniesienie ustne), 1959.
11. Lichstein H. C., Cohen P. P.: Transamination in Bacteria., *J. Biol. Chem.* **157**, 85—91, 1945.
12. Sakławska-Szymonowa O., Gąsior E.: Transaminazy u *Mycobacterii*. *Acta Microbiol. Polon.* **5**, 105—106, 1956.
13. Yonemura T., Iizuka M.: Metabolism of Amino Acids in Tubercle Bacilli. II. Mechanism of the Appearance of Free Amino Acids in the Medium. *Jap. J. Tuberc.*, **3**, 22, 1955; *Chem. Abstr.* **50**, 14037f, 1956.
14. Youatt J.: The Action of Isoniazid on the Transaminases of *Mycobacterium Tuberculosis* (B. C. G.), *Biochem. J.* **68**, 193—197, 1958.
15. Zeller E. A., Van Orden L. S., Kirchheimer W. P.: Enzymology of *Mycobacteria*. VI. Enzymatic Degradation of Guanidine Derivatives. *J. Bacteriol.* **67**, 153—158, 1954.

Р Е З Ю М Е

Произведены исследования по трансаминированию основных аминокислот и амидов с α -кетоглутаровой кислоты у *Mycobacterium phlei*. Для исследования были использованы ацетоновые препараты, автолизированные в течение 24 часов при температуре 37°C, а затем снова высушенные с помощью ацетона. Так приготовленные препараты не содержали эндогенной глютаминовой кислоты, присутствие которой в неавтолизированных порошках в значительной степени затрудняло количественные определения. Для исследований трансаминирования автор применял метод хроматографии на бумаге, пользуясь одномерной восходящей техникой при системе растворителей: фенол — вода 7:3 на бумаге Whatman № 1. Для проявления был употреблен раствор нингидрина 0,2% в ацетоне.

Для разделения цитрулина, аргинина и орнитина автором была разработана новая система растворителей. Пятна цитрулина выявлялись с помощью специфического теста с пара-диметиламинобензальдегидом. Обозначения количества глютаминовой кислоты проводились по методу Барроллиера в спектрофотометре „Unicam” и по видоизмененному методу Каньского в фотометре Пульфриха.

Установлено трансаминирование с α -кетоглутаровой кислотой разной активности для следующих субстратов: для аспарагиновой кислоты 100%, аспарагина 60%, гистидина 13,5%, глютамина 13%, орнитина 11%, цитрулина 5,6%, аргинина 4,0% и лизина 1,7%. Прибавление фосфорнокислого пиридоксала усиливало активность трансаминирования в автолизированных препаратах.

Наряду с реакцией трансаминирования автором были обнаружены с помощью хроматографического метода реакция декарбоксилирования глютаминовой кислоты до γ -аминомасляной кислоты, реакция дезаминирования аргинина до цитрулина и реакция дезамидирования аспарагина.

Рис. 1. Трансаминирование в автолизированном порошке Р — начальные пробы (нулевые), К — конечные пробы (после 3-х часовой инкубации), Р₁ и К₁ — контроли без добавления субстратов, Р₂ и К₂ — α -кетоглутаровая кислота, Р₃ и К₃ — аспарагиновая кислота + α -кетоглутаровая кислота, Р₄ и К₄ — аргинин + α -кетоглутаровая кислота, К₄ — аргинин, Р₅ и К₅ — гистидин + α -кетоглутаровая кислота, Р₆ и К₆ — орнитин + α -кетоглутаровая кислота, Р₇ и К₇ — лизин + α -кетоглутаровая кислота, Р₈ и К₈ — глютамин + α -кетоглутаровая кислота, К₈ — аспарагин, Р₉ и К₉ — аспарагин + α -кетоглутаровая кислота, К₉ — аспарагин, Р₁₀ и К₁₀ — цитрулин + α -кетоглутаровая кислота.

Рис. 2. Трансаминирование в автолизированном порошке (объяснения как на рис. 1).

Табл. 1. Трансаминирование в автолизированном порошке. Числовые величины, представленные в таблице, представляют собой средние арифметические для трех определений (вычтена величина контрольной пробы).

Табл. 2. Влияние фосфорнокислого пиридоксала на реакции трансаминирования у *Mycobacterium phlei*. Числовые величины представлены в таблице, представляют собой среднюю арифметическую для трех обозначений (вычтена величина контрольной пробы).

Табл. 3. Аминокислотный состав автолизатов.

S U M M A R Y

Investigations were carried out on transamination reactions of basic amino acids and amides with α -ketoglutaric acid in *Mycobacterium phlei*. The author used acetone powders autolysed at 37°C for 24 hours and again dried with acetone. Such preparations are free from endogenous glutamic acid, which, when present in non-autolysed powders, makes quantitative estimations difficult. Transamination was investigated by means of paper chromatography with the use of the one-dimensional ascending technique in the system phenol-water 7:3 on Whatman filter paper Nr 1. Detection of the spots took place in 0.2 per cent solution of ninhydrin in acetone.

A new system of solvents was prepared for the separation of citrulline, arginine and ornithine. Citrulline spots were visualized by the specific test with para-dimethylaminobenzaldehyde. Quantitative determinations of glutamic acid were carried out by Barrolier's method in the spectrophotometer „Unicam” and by the modified method according to K a ń s k i in the Pulfrich photometer.

Relative transamination activities for α -ketoglutaric acid with various substrates were as follows: aspartic acid 100% > asparagine 60% > histidine 13.5% > glutamine 13% > ornithine 11% > ci-

trulline 5.6% > arginine 4.0% > lysine 1.7%. An addition of pyridoxal phosphate increased the activity of transamination in autolyzed preparations.

Besides the transamination reaction, the chromatographic method revealed the decarboxylation reaction of glutamic acid to γ -aminobutyric acid, the desimination of arginine to citrulline, and the desamination of asparagine.

