

УДК 576.8.098+576.858

Академик АН Армянской ССР М. А. Тер-Карапетян, Г. А. Семерджян

Азотсодержащие компоненты и аминокислотный состав инфузорий рода *Ophryoscolex*

(Представлено 14/V 1969)

Инфузорий—симбионты, обитатели рубца жвачных животных характеризуются весьма строгими потребностями к условиям существования (источники азотного и углеродного питания, витамины, строгий анаэробноз), в силу чего их культивирование в искусственной среде является чрезвычайно сложной задачей (1).

Выделение суммарной инфузорной фракции, тем более выделение представителей отдельных родов и видов из сложного содержимого рубца в достаточно чистом состоянии, затруднительно. Этими обстоятельствами объясняется редкость сведений, касающихся химии и метаболизма этих организмов (2).

По вопросу азотного обмена имеются данные об общем азоте (3,4), аминокислотном составе суммарной инфузорной фракции (4-7) и родов *Entodinium*, *Diplodinium*, *Isotricha* и смеси родов *Ophryoscolex* (60%) *Diplodinium*, (40%) (4) и зависимости содержания аминокислот в инфузориях от вида рациона (5,8). Фракционирование азотсодержащих соединений биомассы рода *Isotricha* (*I. prostoma*—80—90% + *I. intestinalis*—10—20%) показало, что они состоят из водорастворимой (5,3%), липонидной (3,5%), высокомолекулярных и надмолекулярных (структурных) (90,4%) форм азота. Водорастворимая фракция оказалась богатой аммонием, аланином, лизинем, глутаминовой кислотой и глицином и в меньшей степени другими аминокислотами (9).

Вышеуказанные факты носят ограниченный характер, они недостаточно освещают пути осуществления важнейшей функции инфузории рубца, а именно: превращение комплекса аминокислот, входящего в состав белков растительных кормов в новый комплекс животного белка. Для разрешения этой задачи необходимо изучение азотного обмена инфузорий разных таксономических групп, с особым вниманием к процессам азотного питания отдельных родов и видов. Необходимость этой работы диктуется существенными расхождениями путей азотного метаболизма различных видов

Настоящая работа посвящена изучению азотного и аминокислотного состава целой биомассы и легко-растворимой фракции (запасной фонд) рода *Ophryoscolex* в разные периоды рубцового пищеварения, а именно: натощак, 3, 6, 9 часов после скармливания. В литературе этот вопрос освещен в отношении общего азота (3) и аминокислотного состава суммарной инфузорной фракции, состоящей из представителей нескольких родов (7).

Фракция *Ophryoscolex* отделяется по способу, разработанному Вильямсом и сотр. (10) с некоторыми модификациями: 100 мл содержимого рубца фильтруется через многослойный фильтр из марли, остаток на фильтрате промывается буферным раствором (KH_2PO_4 —1 г + K_2HPO_4 —3 г + NaCl —5 г в одном литре воды, $\text{pH}=7,3$). (11), используя всего 300 мл, последнего; фильтрат, состоящий из суспензии (инфузорной) ставится в термостат при температуре 38°C в течение 1 часа. Образуется серовато-белый осадок, состоящий из инфузорий с преобладанием рода *Ophryoscolex* (80%) и смеси из родов *Metadinium* и *Entodinium* (20%). Надосадочная жидкость декантируется с целью удаления остатков кормов и бактерий, осадок снова заливается буфером, перемешивается, оставляется в термостате 5 мин для осаждения инфузорной массы. Последняя операция повторяется не менее 20 раз.

В навеске свежей биомассы определяется общий азот (по микрокельдалю) и суммарный аминокислотный состав после гидролиза в 6 н. HCl ; наибольшая часть биомассы подвергается экстрагированию этанолом (80%) или последовательно ацетоном (90%), затем этанолом (80%) по разработанной нами методике. В отдельных экстрактах или же из смеси до и после гидролиза, а также в гидролизате всей биомассы определяются аминокислоты методом бумажной хроматографии.

1. *Общий и аминный азот биомассы инфузорий.* Результаты исследований по двум овцам сведены в табл. 1 и нанесены на рис. 1.

Таблица 1

Общий азот и аминный азот в биомассе инфузорий рода *Ophryoscolex*.
Данные в процентах от абсолютно сухой биомассы

Дата отбора проб	N общий			N—NH ₂			
	натощак	3	6	9	натощак	3	6

О в ц а 5

8/XII 1965	5,7	5,2	8,8	11,0	4,8	5,0	8,0	6,5
22/XII 1965	5,6	2,9	4,3	8,5	5,2	3,1	2,3	2,7
12/I 1966	9,0	6,0	6,4	7,8	5,5	4,5	4,2	4,5
10/II 1966	9,2	2,3	3,6	6,0	7,2	2,0	3,0	4,3

О в ц а 6

22/I 1966	7,4	4,0	6,3	6,0	6,3	3,9	5,6	5,1
24/II 1966	6,6	2,5	4,1	6,3	5,3	1,8	3,8	4,7
10/III 1966	4,8	3,4	4,4	6,4	3,8	3,2	3,2	5,3

Значительные колебания в уровнях указанных форм азота являют-

ся результатом скармливания животных сеном с разным соотношением (углеводы).

Полученные данные показывают, что уровень общей и аминной форм азота в биомассе приобретает минимальные значения в первые 3 часа после скармливания. Одновременно в этот период, считавшийся

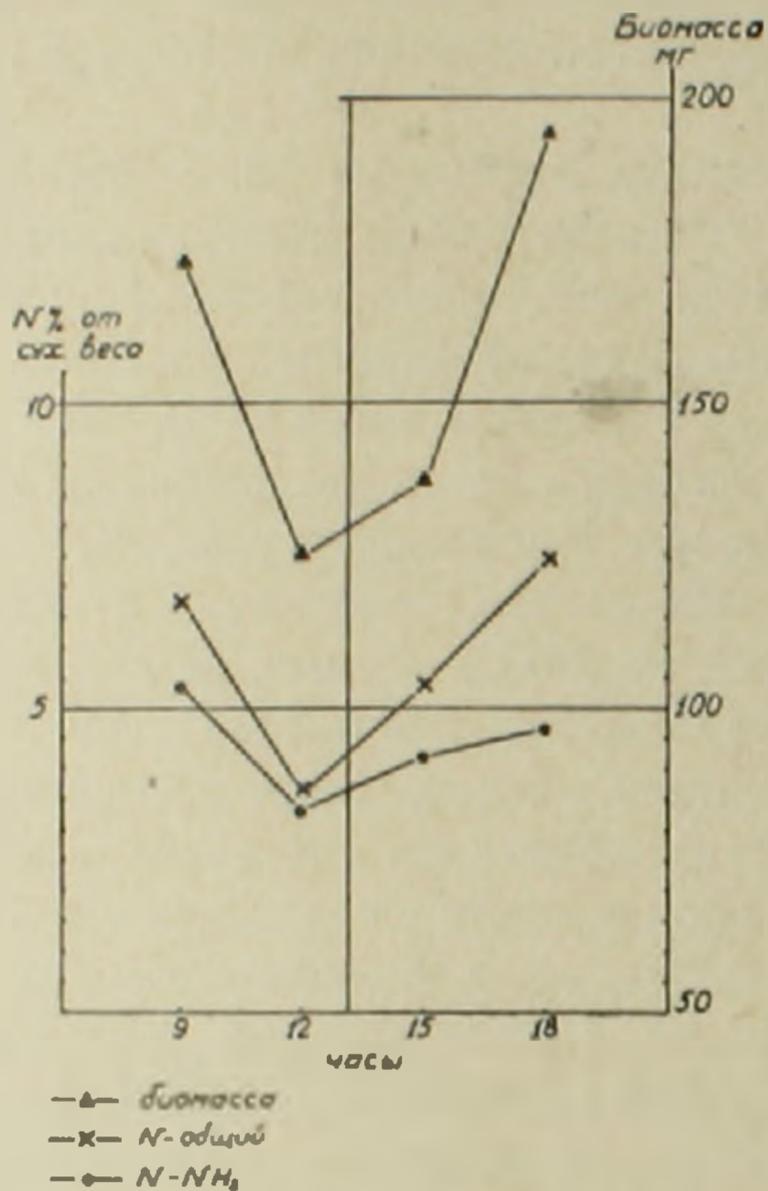


Рис. 1

лаг фазой размножения нового поколения инфузорий в соответствии с количеством принятого корма и воды, происходит относительное снижение инфузорий в содержимом рубца. Через 3—6 часов после приема корма начинается размножение инфузорий и одновременно с этим уровень обеих форм азота, накапливаемых в биомассе, поднимается, достигая максимального значения к 9 часам (иногда к 12—14 часам) после скармливания, затем до следующего утра содержание азота в биомассе приближается к исходному уровню ($\pm 10\%$). Другим признаком глубокой перестройки состава азотистых компонентов клеток является постоянное изменение соотношения аминного азота к общему. Максимальное значение соотношения (80—95%) совпадает с периодом, который считаем лаг фазой роста, в то время как в клетках в состоянии относительного покоя животного (натошак) или в поздние сроки после скармливания, доля неаминовых форм азота превышает суммы аминовых.

2. Фракционирование аминного азота запасного фонда биомассы инфузорий. Запасной фонд был извлечен вышеуказанным способом экстрагирования. С каждым растворителем обработка проводилась многоступенчато (4—5 раза) вплоть до отсутствия аминного азота в последнем экстракте. Результаты приведены в табл. 2 и на рис. 2.

Полученные данные показывают наличие в биомассе двух категорий легкорастворимых азотсодержащих соединений. Этанол оказался относительно более эффективным растворителем, так как его непосредственное применение извлекает столько же, а иногда несколько больше азота, по сравнению с последовательной обработкой биомассы ацетоном и этанолом.

Таблица 2

Фракции азота биомассы *Orthyoscolex*, растворимые в ацетоне и в этаноле. Данные в мг % от абсолютно сухой биомассы

Дата выделения инфузорий	Последовательность экстракции	В экстрактах			$\frac{\text{Этанол}}{\text{АЦ} + \text{ЭТ}} \times 100$ $\left(\frac{1}{2 + 3} \right)$
		этаноловом	ацетоновом	этаноловом после ацетонного	
13/VII 1966	1	98	81	41	
	2	68	3	19	
	3	3	1	9	
	4	1	—	1	
	В сумме	170		70	
26/VII 1966	1	146	85	58	
	2	18	76	7	
	3	10	10	3	
	4	3	—	—	
	В сумме	177	89	68	
12/VIII 1966	1	86	74	53	
	2	75	21	17	
	3	24	7	14	
	4	9	4	10	
	5	2	1	5	
	6	1	—	—	
В сумме	197	107	99	96	
27/VIII 1966	1	121	50	75	
	2	21	7	21	
	3	7	3	10	
	В сумме	149	60	106	

Каждая экстракция проводилась с модулем растворитель (биомасса $(v/p) = 10$).

Извлечение азотистых соединений происходит после 3—5 последовательных обработок. Почти во всех изученных пробах аминный азот, экстрагируемый этанолом, превышает таковой ацетоновой фракции.

3. *Аминокислотный состав ацетоновой и спирто-растворимой фракции биомассы.* Данные по аминокислотному составу последовательно полученных ацетоновых и этаноловых экстрактов приведены на рис. 3.

Фракции, выделенные ацетоном и этанолом наглядно отличаются своим аминокислотным составом. В ацетоновом экстракте преобладают лейцин, изолейцин, валин, метионин, аланин, серин, т. е. моно-амино-

N-NH₃ Экстрактов биомассы

Ornithodoros

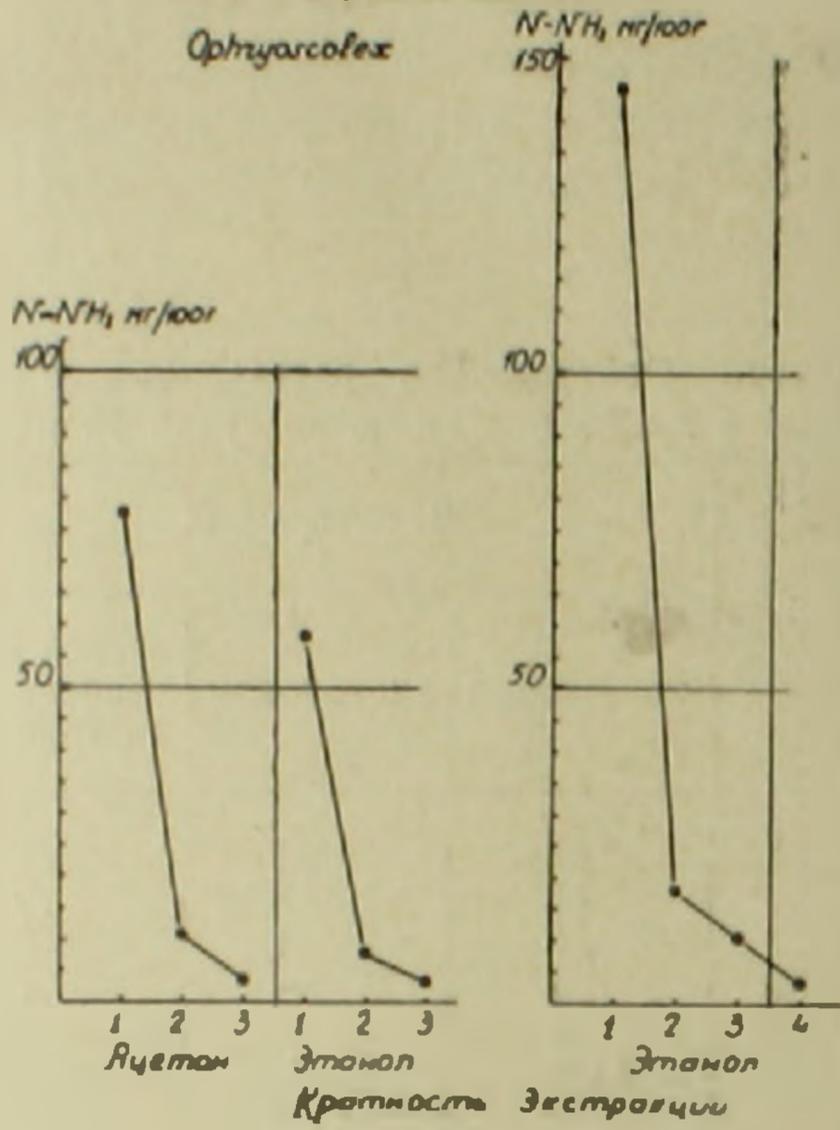


Рис. 2

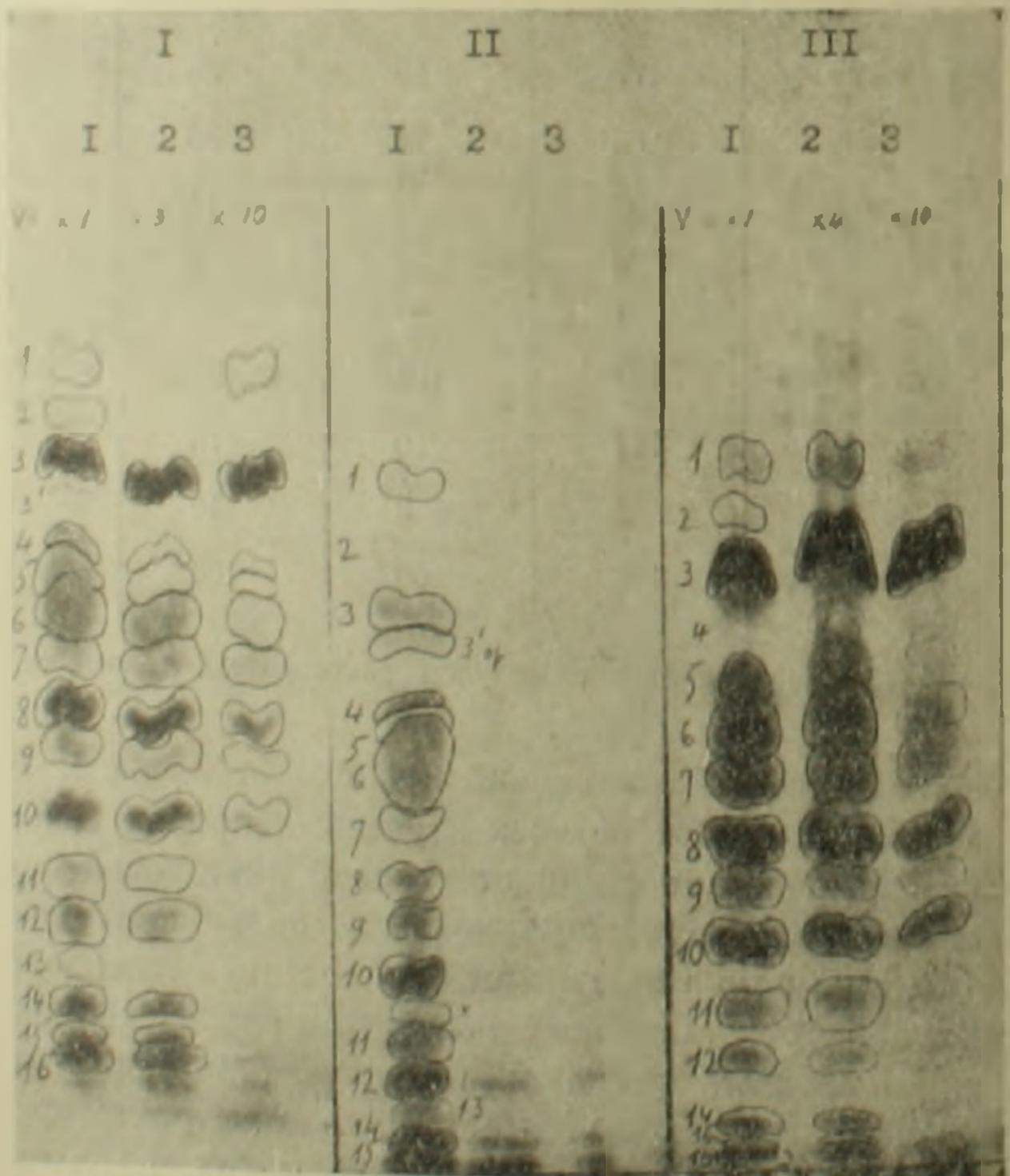


Рис. 3

карбоновые кислоты с низкой полярностью. В этаноловом экстракте преобладают лизин, глутаминовая кислота, т. е. аминокислоты с высокой полярностью, а также некоторые количества серина, глицина, аланина. Приведенный факт указывает на то, что легко растворимые (так называемые «свободные») аминокислоты запасного фонда связаны со структурными компонентами клетки силами разной энергии.

Аминокислотный состав объединенных этаноловых экстрактов биомассы, выделенной натошак и через 6 часов после скармливания (соответствующего суммарной ацетон и этанол растворимым фракциям) и определяемого после гидролиза, дает характеристику запасного фонда аминокислот, в которой преобладающими являются следующие: глутаминовая кислота, пролин, фенилаланин, лейцин (изолейцин) (рис. 4).

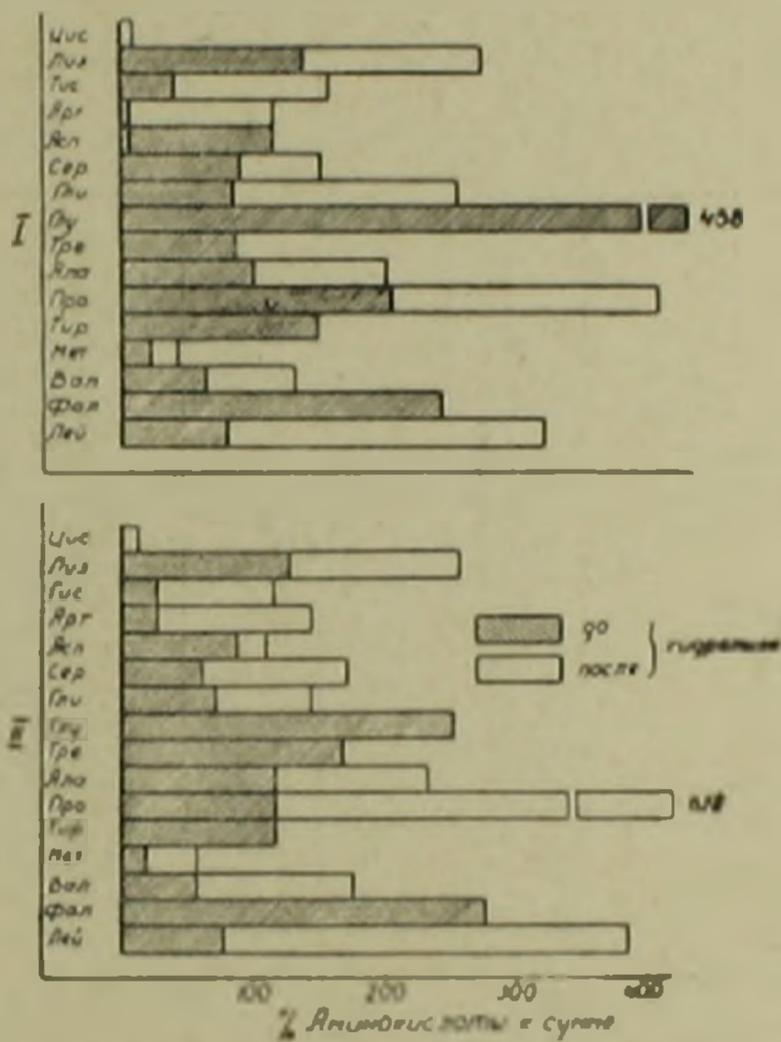


Рис. 4

Однако в пробах взятых в разные сроки, доля соответственных аминокислот в общей сумме существенно не варьирует. Увеличение во время гидролиза суммарного аминного азота, а также количества, почти всех аминокислот экстрактов свидетельствует о том, что часть аминокислот вовлечена в пептидные соединения, за исключением аспарагиновой, глутаминовой кислот, треонина, тирозина, фенилаланина, количества которых не подвергаются изменениям при гидролизе.

4. Аминокислотный состав суммарных белков биомассы (табл. 3).

Аминокислотный состав биомассы *Orhyoscolex* характеризуется высоким содержанием глутаминовой кислоты, лейцина, изолейцина, треонина, лизина, фенилаланина, низким содержанием метионина, аланина, серина, глицина, аспарагиновой кислоты, что в основном согласуется с данным литературы (4), кроме аспарагиновой кислоты, содержание которой в исследованных нами пробах низкое.

Данные наглядно показывают количественные изменения суммарного аминокислотного состава биомассы инфузорий в пробах, отобранных в разные сроки, соответствующих разным фазам роста клеток, а именно: I—стационарная фаза—конец цикла роста, II—клетки в лаг-фазе, III—клетки середины или конца логарифмической фазы; однако, в последовательно отобранных пробах существенных изменений в долях отдельных аминокислот в суммарном белке не обнаружено.

Таблица 3

Аминокислотный состав суммарных белков биомассы инфузорий рода *Ophryoscolex*. Данные: 1. В процентах от абсолютной сухой биомассы. 2. Доля отдельных аминокислот в сумме в процентах (**)

Аминокислоты в гидролизате	9 час		12 час		15 час		18 час	
	1	2*	1	2*	1	2*	1	2*
Цистеин	1,98	3,7	8,8	5,1	1,91	5,1	0,58	1,0
Лизин	4,18	7,8	1,71	10,0	3,00	8,0	3,82	8,3
Гистидин	1,98	3,7	1,52	8,9	1,13	3,0	1,31	2,9
Аргинин	2,13	4,0	0,48	2,3	1,83	14,9	1,23	2,6
Аспарагиновая к-та	3,93	7,3	0,93	5,4	3,39	9,0	2,27	5,0
Серин	1,80	3,3	0,85	4,9	0,91	2,4	0,29	0,6
Глицин	1,52	2,8	0,16	0,9	0,71	0,1	2,65	5,8
Глутаминовая к-та	8,30	15,5	1,37	8,0	5,30	14,4	5,46	11,8
Треонин	5,70	10,6	1,62	9,3	3,43	9,1	4,28	9,3
Аланин	2,08	3,8	0,58	3,4	1,54	4,1	1,95	4,2
Пролин	2,97	5,5	1,05	6,2	2,24	6,0	3,35	7,3
Тирозин	2,97	5,5	0,95	5,5	2,14	5,7	3,40	7,4
Метионин	0,91	1,7	0,32	1,9	0,67	1,8	1,06	2,3
Валин	2,73	5,1	0,98	5,8	2,01	5,3	3,18	6,9
Фенилаланин	3,90	7,3	1,35	7,9	2,42	6,5	4,22	9,2
Лейцин/Изолейцин	6,23	11,7	2,40	14,0	4,78	12,8	6,44	14,0
Сумма аминокислот	53,53	99,3	17,17	100,0	37,42	99,24	45,91	98,6
Сумма N(NH ₂) аминокислот	5,3		1,8		3,8		4,8	
N(NH ₂) гидролизата по Хардингу	5,3		1,5		3,8		4,7	

* пересчитана по α — NH₂ азота, кроме пролина по изатину.

** округленные данные.

Ереванский государственный университет

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս Մ. Ա. ՏԵՐ-ՎԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Հ. Հ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ

Ophryoscolex ցեղի ինֆուզորիաների ազոտ պարունակող բազադրիչները և ամինաթթվային կազմը

Հետազոտվել է *Ophryoscolex* ցեղի ինֆուզորիաների բիոմասայի բնդհանուր և ամինային ազոտը, ամինաթթվային կազմը, ինչպես նաև բջիչների ացետոնային (90%) և էթանոլային (80%) ձգվածքների ամինային ազոտը և ամինաթթվային կազմը՝ նախքան հիդրոլիզը և նրանից հետո:

Կատարված հետազոտություններից հետևում է՝

1. Կենդանու կերակրմանը հաջորդող առաջին 3 ժամվա ընթացքում ինֆուզոր բիոմասայում ամինային և բնդհանուր ազոտի ձևերը հասնում են նվազագույն մակարդակի, իսկ նրանց

Հարաբերությունը բարձրանում է Կերը ընդունելուց 3—6 ժամ հետո ինֆուզորիաների բազմացման զուգընթաց բիոմասսայում բարձրանում է ընդհանուր և ամինային ազոտների մակարդակը, որը հասնում է առավելագույն արժեքի կերակրումից 9—12 ժամ հետո: Հետագայում մինչև հաջորդ առավոտ ազոտի պարունակությունը մոտենում է ելակետային մակարդակին ($\pm 10\%$):

2. Ինֆուզոր բջիջներում դոյություն ունեն 2 կարգի հեշտ լուծվող ազոտային միացություններ: Այդ որում էթանոլը հանդիսանում է ավելի ուժեղ լուծիչ քան ացետոնը:

3. Ացետոնային և էթանոլային մզվածքները իրենց ամինաթթվային կազմով նկատելիորեն տարբերվում են: Առաջինում գերակշռում է թույլ ընեոականոթյամբ օժտված մոնոամինոմոնոկարբոքսի ամինաթթուները, վերջինում՝ բարձր ընեոականոթյամբ օժտված մոնոկարբոքսի դիամինաթթուները: Սա ցույց է տալիս, որ պաշարային ֆոնդի ամինաթթուները բջջի կառուցվածքային բաղադրիչների հետ կապված են տարբեր էներգիա պարունակող կապերով:

Մզվածքների ամինաթթուների մի մասը ընդգրկված են պեպտիդային միացությունների մեջ:

4. *Ophryoscolex* ցեղի ինֆուզորիաների գումարային սպիտակուցներում գերակշռում է գլուտամինաթթու, լեյցին (իզոլեյցին), թրեոնին, լիզին և ֆենիլալանին ամինաթթուները:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ R. Hungate, Biochemistry and Physiology of Protozoa New-York, 1955: p. 159. ² R. Hungate, M. Bryant, R. Mah—Ann. Rev. Biochem. 18, 131, 1964. ³ M. McNaught, E. Owen, K. Henry, S. Kon—Biochem. J. 56, 151, 1954. ⁴ H. Höllar, I. Harmeyer—Ztbl. Veterinärmed. A11, 244, 1964. ⁵ R. Weller, Austral. J. Biol. Sci. 10, 384, 1957. ⁶ D. Purser, S. Buchler, J. Dairy Sci. 49, 81, 1966. ⁷ M. Тер-Каранетян, Т. Арутюнян, Г. Семерджян, Биол. ж. Армении, 19 (5), 11 (1966). ⁸ W. Bergen, D. Purser, J. Cline, J. Anim. Sci. 27, 1497, 1968. ⁹ J. Harmeyer, Ztschr. Tierphysiol, Tierernähr. Futtermitt. 21, 211, 1966. ¹⁰ P. Williams, R. Davls, R. Doetsch, J. Gutierrez, Appl. Microbiol. 9, 405 (1961). ¹¹ McDougall, in Heald & Oxford. Biochem. J. 53, 516 (1953).