

БИОХИМИЯ

УДК 576.8.098+576.858

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

Углеводные компоненты и моносахаридный состав инфузорий рода
Ophryoscolex

(Представлено 3/VIII 1970)

Метаболизм углеводов анаэробных инфузорий, обитателей преджелудков жвачных животных, является одной из наиболее важных, но еще недостаточно раскрытых сторон жизнедеятельности этих одноклеточных, принадлежащих к некоторым таксономическим группам типа Protozoa (¹).

В связи с этим представляет интерес изучение природы углеводных компонентов клеток анаэробных инфузорий при разных физиологических состояниях и условиях питания различными источниками углерода.

Из углеводов анаэробных инфузорий преджелудков наиболее известен так называемый «паралликоген», изолированный из родов *Isotricha*, *Dasytricha*, приближающийся по своей природе скорее к амилопектину, чем к собственному гликогену (²). Детально изучена разветвленная структура инфузорного амилопектина, его чисто полиглюкзанная структура (^{3, 4}) и до некоторой степени механизм его ферментативного распада и синтеза из неразветвленных цепей при помощи разветвляющего фермента (branching enzyme) (⁵).

Другие исследования были посвящены изучению суммарного содержания и моносахаридного состава углеводов двух фракций микроорганизмов, изолированных из рубца, и в которых, вероятно, преобладают инфузории (⁶). В гидролизатах этих фракций охарактеризованы, кроме глюкозы, являющейся преобладающим моносахаридом, некоторые количества арабинозы, ксилозы, рамнозы и рибозы.

Настоящая работа преследует цель—изучить количество и моносахаридный состав суммарных углеводов и полисахарида, выделенных из фракции малоресничных инфузорий, в которой преобладают (85%) представители рода *Ophryoscolex* (^{7, 8}).

Объектом исследования служили малоресничные инфузории, изолированные из содержимого рубца овец через хронические рубцовые фистулы по ранее предложенной методике (⁷).

В биомассе инфузорий исследовались суммарные углеводы, а также полисахаридная фракция, экстрагируемая 40%-ным водным раствором КОН с последующим осаждением в 70%-ном (конечная концентрация) этиловом спирте (9).

Биомасса инфузорий и полисахаридная фракция подвергались кислотному гидролизу в 1 н НСІ в кипящей водяной бане до достижения постоянной концентрации редуцирующих веществ; последние определялись микрометодом феррицианида.

В нейтрализованных гидролизатах исследовались и определялись моносахариды методом бумажной хроматографии. Гидролизаты выпаривались досуха, остаток экстрагировался смесью бутанол—вода (5:1), последний выпаривается, его остаток растворялся в минимальном объеме дистиллированной воды, раствор наносился на бумагу в желаемом объеме. Этот прием позволял получать хроматограммы с четко разграниченными пятнами; при этом некоторая часть редуцирующих веществ оставалась неэкстрагируемой и, следовательно, не идентифицировалась.

1. *Кинетика гидролиза суммарных углеводов и полисахаридной фракции.* Биомасса инфузорий изолировалась из содержимого рубца, взятого у овец натошак. Гидролиз проводился непосредственно после изолирования. Гидролиз полисахаридной фракции проводился после осаждения и промывания без высушивания. Результаты гидролиза, выраженные по редуцирующим веществам (р. в.), приведены в табл. 1. Для сравнения параллельно проведен гидролиз гликогена из печени кролика (марки „Blomed“ Warszawa) и амилопектина (марки “Gee Lawson Chemicals”, London).

Кинетика гидролиза всех субстратов вычислялась по константе реакции первого порядка — $K = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$, где t — продолжительность гидролиза, a — исходное, $a-x$ — расщепленное количество субстрата, а также периоду полураспада субстратов по формуле — $t_{0,5} = \frac{0,693}{K}$.

Полученные данные показывают значительные расхождения в темпах гидролиза суммарных углеводов инфузорий и полисахаридной фракции, выделенной из той же биомассы.

Константы скорости гидролиза показывают для полисахаридной фракции инфузорий величины несколько ниже, а для целостной биомассы значительно ниже констант скорости гидролиза амилопектина и гликогена печени. Следовательно, по своей структуре полисахаридная фракция инфузорий в некоторой степени отличается от последних. Кроме того, фактическое постоянство константы K на протяжении всего времени гидролиза свидетельствует об однородности связей, лежащих в основе структуры полисахарида.

Для целостной биомассы низкие значения ее константы могут быть

объяснены не только большой стойкостью связей между мономерами или между моносахаридами и другими клеточными компонентами (нуклеиновые кислоты, белки и др.), но также «структурным» фактором, а именно, доступностью катализатора к глюкозидным связям, включенным в интактную биомассу.

Таблица 1

Гидролиз суммарных углеводов и полисахаридной фракции инфузорий рода *Ophryoscolex*

(данные редуцирующих веществ (р. в.) кроме 0 момента, умножались на коэффициент 0,9; период полураспада установлен путем экстраполирования на кривую динамики гидролиза)

Время гидролиза (мин.)	Целостная биомасса — гидролизат		Полисахариды инфузорий		Амидопектин		Гликоген печени кролика	
	р. в.	K	р. в.	K	р. в.	K	р. в.	K
0	2,2	—	0,060	—	0,70	—	1,30	—
5	—	—	0,38	0,028	20,5	0,033	23,0	0,056
10	—	—	0,69	0,036	38,5	0,059	44,5	0,067
15	—	—	0,90	0,035	48,1	0,056	51,7	0,056
20	6,3	0,021	0,99	0,026	55,8	0,053	60,7	0,057
25	—	—	1,15	0,030	60,7	0,052	68,4	0,057
30	—	—	1,35	0,033	63,9	0,048	68,4	—
35	—	—	1,51	0,035	65,2	0,043	75,3	0,051
40	7,7	0,015	1,63	0,036	70,2	0,046	81,4	0,039
45	—	—	1,90	0,051	70,2	—	81,4	—
50	—	—	1,90	—	70,2	—	84,6	0,057
55	—	—	2,10	—	75,1	0,042	84,6	0,052
60	9,1	0,014	2,10	—	75,1	—	89,5	—
65	—	—	—	—	83,2	—	89,5	—
70	—	—	—	—	83,2	—	—	—
80	9,9	0,013	—	—	—	—	—	—
100	12,0	0,017	—	—	—	—	—	—
120	12,0	—	—	—	—	—	—	—
140	12,8	0,016	—	—	—	—	—	—
160	14,0	—	—	—	—	—	—	—
180	14,0	—	—	—	—	—	—	—
t _{0,5} (мин.)	—	50	—	23	—	12	8	11

Достоверность гипотезы о том, что кинетика гидролиза полисахарида характерна для реакции первого порядка, показана на рис. 1, где сопоставление времени гидролиза (на ординате) с $\log (a-x)$ (на абсциссе) показывает прямолинейную закономерность в процессе расщепления наибольшей доли полисахарида.

2. Суммарные углеводы и фракция полисахаридов инфузорий в разные сроки пищевого рубца. Исследованные пробы биомассы соответствуют клеткам, находящимся в разных фазах своего цикла роста. Результаты приведены в табл. 2 и на рис. 2.

Полученные данные показывают, что в разные сроки после скармливания содержание как суммы углеводов, так и полисахаридной фракции в биомассе инфузорий значительно варьирует.

Выделенная вышеуказанным методом полисахаридная фракция достигает около 20—30% от суммарных углеводов биомассы, а в течение

сутки, когда клетки переходят от состояния голодания в упитанность, уровень полисахаридной фракции подвергается более резким измене-

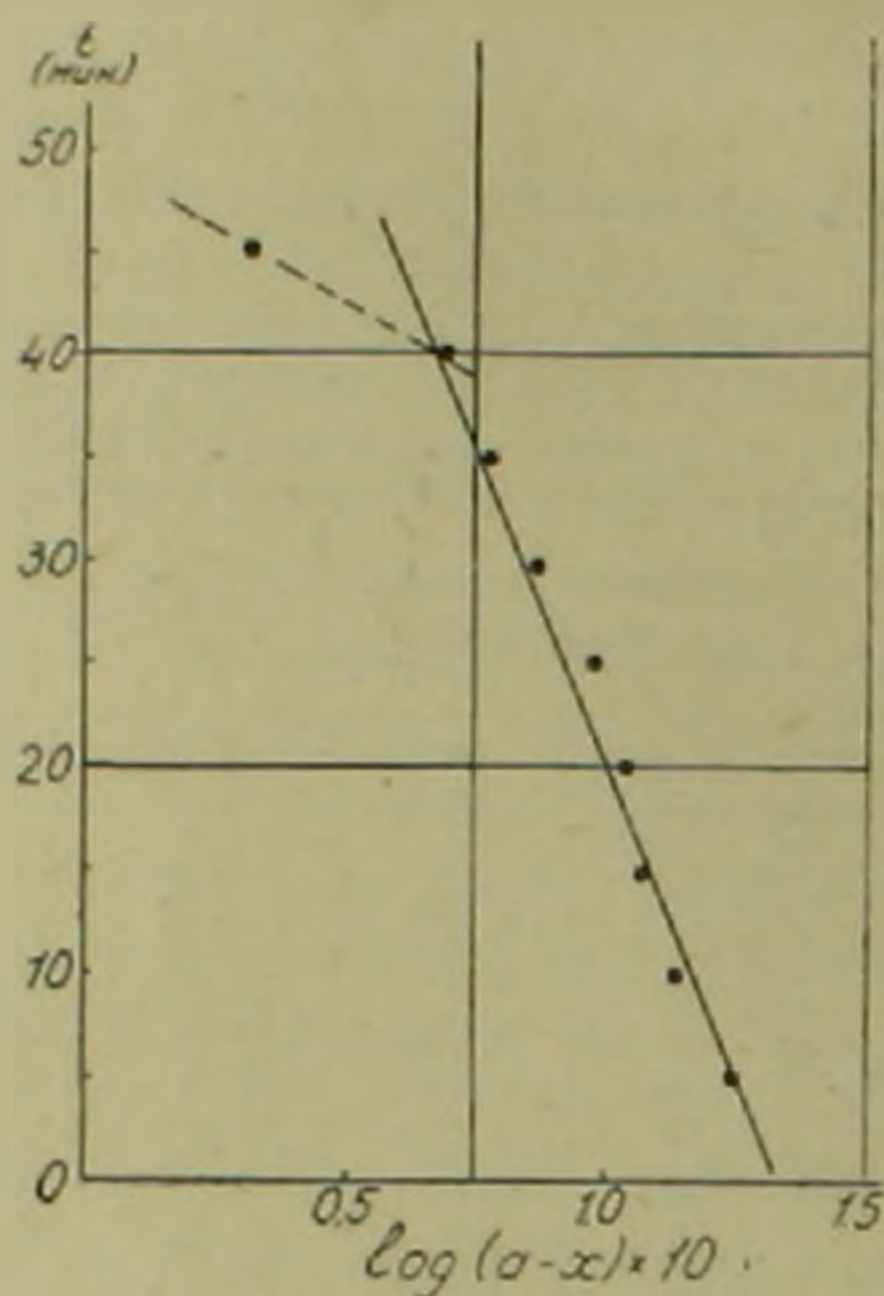


Рис. 1. Кинетика гидролиза полисахаридной фракции из инфузории рода *Ophryoscolex*

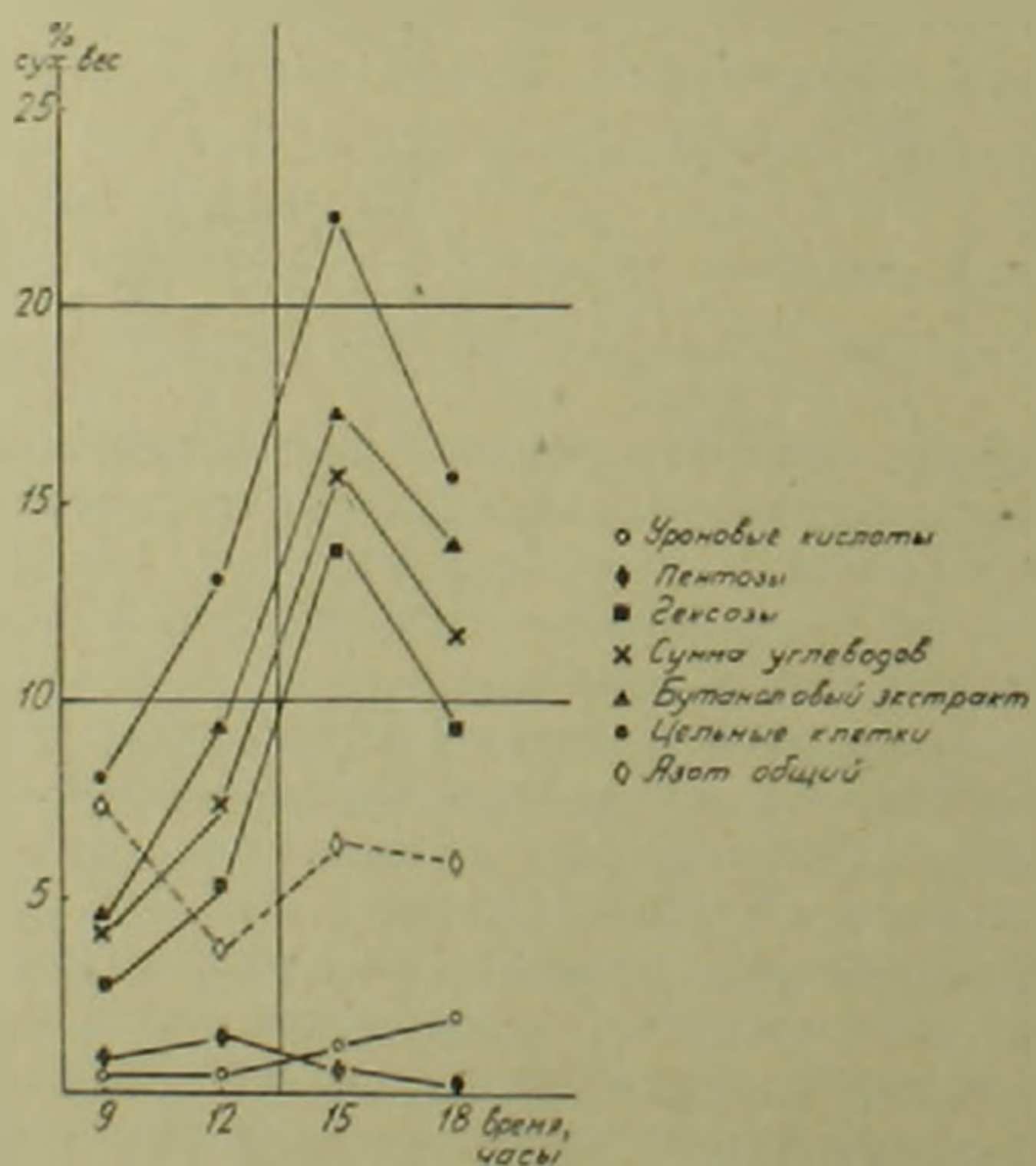


Рис. 2. Углеводы, урановые кислоты и общий азот в биомассе инфузорий, выделенные в разные сроки в течение суток

ниям, чем у суммарных углеводов; это хорошо согласуется с запасной ролью, приписываемой полисахариду.

Найденные между пробами инфузорий, выделенные в разные даты, расхождения в уровнях полисахарида и суммарных углеводов являются результатом значительных изменений скорее качества окармливаемого корма, чем видового состава выделенных инфузорий (проверенных микроскопически).

Таблица 2

Суммарные углеводы и фракция полисахаридов инфузорий, изолированных в разные сроки пищеварения рубца
(в % от абсолютно сухой биомассы инфузорий)

Дата взятия пробы	Номера подопытных животных	Суммарные углеводы				Фракция полисахаридов			
		Натощак	часов после скармливания			Натощак	часов после скармливания		
			3	6	9		3	6	9
3/III 1965 г.	5	—	—	—	—	0,9	1,0	1,0	4,0*
12/I 1966 г.	5	7,3	10,1	16,4	19,1	—	—	—	—
10/II 1966 г.	5	12,4	8,6	15,1	15,3	—	—	—	—
22/I 1966 г.	6	8,8	10,6	22,6	16,0	—	—	—	—
24/II 1966 г.	6	8,8	8,9	18,5	30,6	0,68	0,3	5,8	8,1
10/III 1966 г.	6	6,3	12,7	15,4	18,8	0,7	1,9	2,5	5,3
5/IV 1967 г.	6	—	—	—	—	2,0	—	8,3	7,6
19/IV 1967 г.	6	—	—	—	—	0,3	0,3	9,5	9,5
5/V 1967 г.	6	—	—	—	—	0,8	4,1	7,1	5,0
15/XII 1967 г.	7	12,0	22,0	38,7	37,4	—	—	—	—
4/III 1968 г.	10	7,0	17,0	23,0	22,4	—	—	—	—
25/III 1968 г.	10	8,0	13,1	22,3	15,8	—	—	—	—
17/IV 1968 г.	10	7,9	12,6	17,5	18,4	—	—	—	—

* Образцы 12 час—2,0; 24 час. Натощак на следующее утро —1,2.

В начальные сроки после окармливания животного (0—6 час), когда благодаря поступлению питательных веществ начинается развитие инфузорий рубца, обнаружена обратная коррелятивность между суммарными углеводами и общим азотом, накопившимся в биомассе. Происходит заметное увеличение количества углеводов с одновременным понижением уровня азотистых соединений (рис. 2).

3 *Моносахариды суммарных углеводов и полисахаридной фракции.* Исследования проводились на инфузориях, изолированных из проб содержимого рубца, выделенных натощак и через 3, 6, 9 часов после скармливания. Ввиду того, что гидролизаты цельных клеток даже после тщательной нейтрализации давали на бумаге хроматограммы с не совсем четко ограниченными пятнами, гидролизаты выпаривались под вакуумом, сухой остаток экстрагировался бутанолом при 110—115° и в этом экстракте определялись как сумма редуцирующих веществ, так и отдельные моносахариды (возможно и олигосахариды) после хроматографирования на бумаге.

Полученные результаты приведены в табл. 3 и на рис. 3.

В гидролизатах цельных клеток инфузорий при помощи хромато-

графического анализа выявлено не менее 10 пятен, большинство которых считается моносахаридным, из них идентифицированы: глюкоза (Глю), преобладающая над всеми, ксилоза, арабиноза, рибоза, галактоза и рамноза и некоторые малоподвижные пятна, соответствующие, вероятно, уроновым кислотам и дисахаридам.

Таблица 3

Моносахариды суммарных углеводов и полисахаридной фракции инфузорий
(в % от абсолютно сухой биомассы инфузории)

Дата опыта	Исследуемый препарат или соединение	Время отбора проб			
		Натощак	часов после скармливания		
			3	6	9
25/III 1968 г.	Весь гидролизат	8,0	13,1	22,3	15,8
	Экстракт в бутаноле	4,5	9,4	17,4	14,0
	Олигосахариды, уроновые кислоты	0,58	0,54	1,3	2,0
	Глю+(гал)	2,8	5,4	13,9	9,3
	Пентозы	0,96	1,5	0,76	0,4
	Сумма	4,2	7,4	15,8	11,7
17/IV 1968 г.	Весь гидролизат	7,9	12,6	17,5	18,4
	Экстракт в бутаноле	4,4	7,1	10,2	12,3
	Олигосахариды—уроновые кислоты	0,4	1,4	2,0	2,6
	Глю+(гал)	1,93	2,6	7,5	7,5
	Пентозы	1,4	1,0	0,7	0,5
	Сумма	3,73	5,0	10,2	10,6

В гидролизатах полисахаридной фракции основным компонентом является глюкоза, но ей сопутствует значительное количество ксилозы и следы малоподвижных соединений, соответствующие также уроновым кислотам или олигосахаридам, являющимся не вполне гидролизованными осколками полисахаридов.

Примечателен тот факт, что моносахаридный состав суммарных углеводов и тем более полисахаридной фракции значительно меняется в инфузориях, выделенных в разные периоды рубцового пищеварения, представляющие клетки в разном физиологическом состоянии. Данные как качественного анализа, иллюстрированные на хроматограммах, так и количественного определения, показывают, что в гидролизатах цельных клеток доля пентоз достигает наибольшей величины в инфузориях, выделенных натощак, а во время пищеварения по мере развития инфузорных популяций постепенно уменьшается (^{1, 10, 7}). Более наглядны изменения доли разных видов мономеров в гидролизатах полисахаридной фракции. В пробах, отобранных в разные сроки, в течение суток происходит резкое уменьшение ксилозы и коррелятивное с ней увеличение глюкозы и пятен, оцененных как уроновые соединения. Содержание

рибозы в гидролизатах цельных клеток легко объясняется гидролизом нуклеиновых кислот, а следы арабинозы — остатками растительных частиц в цитоплазме. Факт о высоком содержании ксилозы в гидролизатах цельных клеток, особенно полисахаридной фракции, вряд ли можно объяснить наличием упомянутых растительных частиц. В данном случае наиболее вероятной кажется гипотеза о накоплении в клетках или двух полисахаридов — одного гексозана, другого пентозана, сопутствующих друг другу в процессе их выделения, или же одного полисахарида смешанного типа.

Երևանский государственный
университет

Հայկական ՍՍՀ ԴԱ Կոլագեմբիկոս Մ. Ա. ՏԵՐ-ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Զ. Զ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ

Ophryoscolex ցեղի ինֆուզորիաների ամրագրատային և մոնոսախարիդային կազմը

Հետազոտվել է Ophryoscolex ցեղի ինֆուզորիաների ամրոզջական քիչ-չիքի գումարային ամխաջրերի, ինչպես նաև քիչներից անջատված պաշարային պոլիսախարիդի քանակությունը և մոնոսախարիդային կազմը:

Կատարված հետազոտություններից հետևում է՝

1. Ինֆուզոր պաշարային պոլիսախարիդի, ինչպես նաև համեմատության համար վերցված ճապարի լյարդի գլիկոգենի և ամիլոպեկտինի հիդրոլիզի արագության կոնստանտների միջև եղած տարբերությունները ցույց են տալիս, որ ինֆուզոր պոլիսախարիդը իրեն կառուցվածքով որոշ չափով տարբերվում է ճապարի լյարդի գլիկոգենից և ամիլոպեկտինից:

2. Հիդրոլիզի ընթացքում ճեղքման կոնստանտի հաստատուն լինելը ցույց է տալիս պոլիսախարիդի կառուցվածքի հիմքում ընկած կապերի միատեսակ լինելը:

3. Կենդանու կերակրումից հետո տարբեր ժամկետներում ինֆուզոր կենսազանգվածում գումարային ամխաջրերի և պաշարային պոլիսախարիդի քանակությունը տատանվում է զգալի չափերով: Ընդ որում, ամխաջրերի քանակությունն ունի ցածր արժեքներ կենդանու ծոմ վիճակում և կերակրումից 3 ժամ հետո, իսկ բարձր՝ կերակրումից 6—9 ժամ հետո:

4. Ինֆուզորիաների ամրոզջական քիչների հիդրոլիզատում հայտնաբերվել է գլյուկոզ (որի քանակությունը գերակշռում է բոլորին), արաբինոզ, ռիբոզ, գալակտոզ, ռամնոզ և մի քանի այլ հեմիքսեր, որոնք համապատասխանում են ուրոնական թթուներին ու դիսախարիդներին:

5. Պոլիսախարիդային ֆրակցիայի հիմնական բաղադրիչն է հանդիսանում գլյուկոզը, որին զուգակցում է բավականին քանակությամբ քսիլոզ:

6. Առաջադրվել է հիպոթեզ, ըստ որի ինֆուզոր քիչներում որպես պաշարանյութ կուտակվում է կամ 2 պոլիսախարիդ՝ մեկը հեքսոզան, մյուսը պենտոզան և կամ խառը տիպի մեկ պոլիսախարիդ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԴԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ В. А. Догель, Ю. И. Полянский, Е. М. Хейсин, Общая протозоология, М., 1962.
- ² F. M. Masson, A. E. Oxford, J. Gen. Microbiol. 5, 664 (1951). ³ G. Forsyth, E. L. Hirst, A. E. Oxford, J. Chem. Soc., 2030 (1953). ⁴ G. Forsyth, E. L. Hirst, J. Chem. Soc. 2132 (1953). ⁵ D. L. Mould, J. S. Thomas, Biochem. J. 69 327, 1958. ⁶ P. J. Heald, The British. J. Nutr. 5, (1), 75, 84 (1951). ⁷ М. А. Тер-Карапетян, Т. Г. Арутюнян, Г. А. Семерджян, „Биол. журн. Армении“, т. 23, № 1 (1970). ⁸ М. А. Тер-Карапетян, Г. А. Семерджян, ДАН Арм. ССР, т. XLIX, № 4 (1969). ⁹ В. С. Асатиани, Методы биохимических исследований, Медгиз, 1956. ¹⁰ М. А. Тер-Карапетян, Т. Г. Арутюнян, Г. А. Семерджян, „Биол. журн. Армении“, т. 19, № 5 (1966).