

БИОХИМИЯ

М. А. Тер-Карапетян, академик АН Армянской ССР, Э. Х. Азарян

Образование растворимых аминокислот из белков
 растительных тканей при силосовании

(Представлено 18.XI.1958)

Комплекс микробиологических и ферментативных процессов, происходящий при инкубации свежих растительных тканей в анаэробных условиях, называемый силосованием, характеризуется расщеплением углеводов с образованием углекислого газа и низкомолекулярных органических кислот: молочной, уксусной, пропионовой, масляной и др.

Известно, что при силосовании расщепление белков происходит больше под действием протеолитических ферментов растительных тканей, чем в результате жизнедеятельности микроорганизмов (^{1, 2}). Предполагается, что белки превращаются в легкорастворимые низкомолекулярные соединения, в частности, в полипептиды и аминокислоты, а в отдельных случаях аминная группа последних выделяется в виде аммиака.

До настоящего времени прямые факты, доказывающие образование в силосе свободных аминокислот из более сложных азотистых соединений (полипептиды, белки и проч.) растительных тканей, все еще неизвестны. Неизвестно также, свободные аминокислоты, обнаруженные в силосе с первого же дня после закладки, представляют ли собой соединения, присутствующие в свежем растительном материале, или являются продуктами распада белковых молекул. Наряду с этим в последние годы были приведены некоторые данные о распаде аминокислот при созревании и хранении силоса (^{3, 4}).

Настоящая работа ставит цель — определить степень распада белковых веществ и идентификацию образуемых при силосовании аминокислот в точно контролируемых экспериментальных условиях. Вопрос этот представляет важнейший интерес для оценки качества переваримости и питательной ценности силоса.

Опыты проводились по следующей методике: объектом исследования служила свежескошенная масса люцерны, размельченная в кусочки длиной в 1—2 см. Закладка проводилась в бутылках ем-

костью 500 мл, где зеленая масса тщательно уплотнялась. Бутылки затыкались резиновыми пробками, в которые были вставлены стеклянные трубки длиной 1 м. Сок, вытекающий из массы во время бурного брожения, поднимался вверх по этим трубкам, благодаря чему потери сводились к минимуму. В процессе созревания продолжительностью в 30 дней бутылки ставились в темную комнату при температуре 15—20° С. В промежутках через 3, 7, 15, 30 дней открывалось по одной бутылке, содержимое ее подвергалось анализу согласно следующей схеме: свежая масса влажностью $80 \pm 2\%$ обрабатывалась 96° этиловым спиртом молотом, равным 10, при температуре кипения спирта в течение 1 часа для экстрагирования свободных аминокислот и низкомолекулярных белковых соединений (пептиды, полипептиды и т. д.). Остаток спиртовой экстракции высушивался при температуре 90°. В каждом образце определялся общий азот как в спиртовых экстрактах, так и в сухом остатке. Спиртовые экстракты подвергались прямому хроматографированию на бумаге после сгущения в 5 раз для распределения и идентификации свободных аминокислот.

Экстракты хроматографировались также после гидролиза 20% HCl, для идентификации связанных в виде пептидов аминокислот.

При хроматографировании использовалась в качестве растворителя смесь бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5), которая пропусклась через бумагу 4 раза. Проявителем служил 0,5% раствор нингидрина в смеси бутанол—вода (1:1).

Во всех случаях наносились на исходные точки бумаги равные количества общего азота в пределах $15 \pm 3 \gamma$.

1. *Экстрагируемые спиртом азотные соединения.* В табл. 1 приведены результаты определения в исходном сырье и в силосе общего азота, экстрагируемого 85% спиртом. Таковой соответствует свободным аминокислотам и неосаждающимся трихлоруксусной кислотой азотистым соединениям, в частности полипептидам.

Таблица 1

Влажность исходного сырья 79,3 %					
Наименование исследуемого образца	Навеска для анализа абс. сух. вещ. в г	Объем экстракта в мл	N в экстракте мг в 100 мл	N в общем экстракте	Общий N в абс. сух. материале %
Исходное сырье	6,21	276,0	7,70	21,3	0,34
3-дневный силос	4,02	185,0	30,24	55,0	1,36
7- " "	1,96	95,0	33,60	31,9	1,63
15- " "	2,00	97,0	40,30	39,1	1,95
30- " "	1,88	95,0	51,52	48,9	2,60

Общий N сырья в абсолютно сухом веществе 3,45 %.

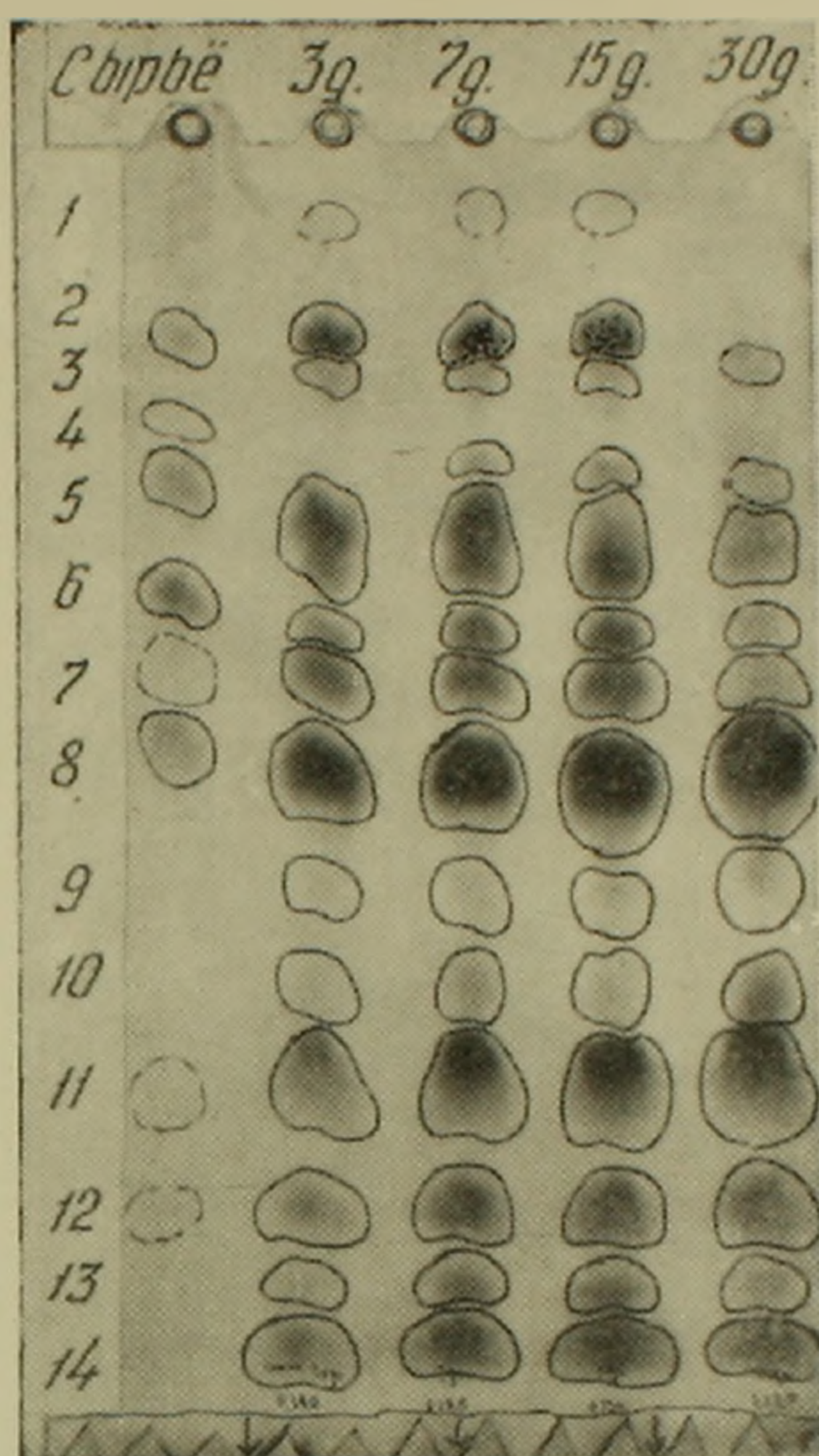


Рис. 1.

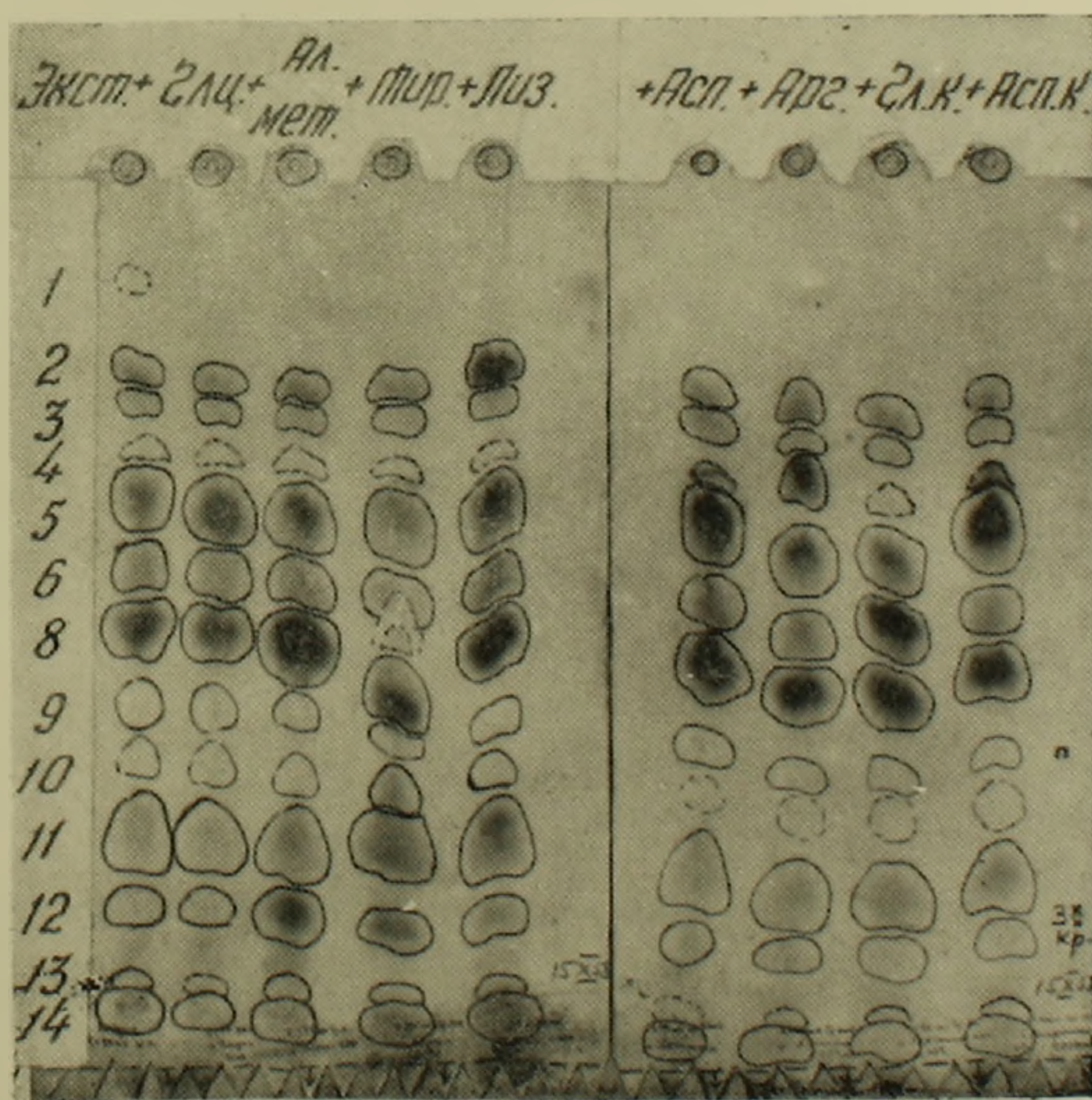


Рис. 2.

Полученные данные показывают, что при силосовании имеет место постепенное возрастание количества экстрагируемых спиртом азотистых соединений, что указывает на значительное расщепление белков клеточных структур исходного сырья.

2. *Свободные аминокислоты спиртовых экстрактов.* Состав свободных аминокислот спиртовых экстрактов исходного растительного материала, а также силосов разного срока созревания приведен в табл. 2.

Таблица 2

Цвет пятен	Rf	Идентификация пятен	Площадь пятен в мм²				
			сырье	возраст силоса в днях			
				3	7	15	30
Фиолетовый	0,05	Цист(е)ин	—	30	30	30	—
•	0,09	Лизин	—	100	120	120	—
Оранжевый	0,12	Аспарагин	85	80	75	75	60
Темно-лиловый	0,15	Аргинин	56	—	55	50	30
Фиолетовый	0,22	Аспарагиновая кислота + глицин	155	225	200	150	40
•	0,27	Не идентифицировано	120	80	100	125	40
Темно-фиолетовый	0,30	Глютаминовая кислота	50	125	115	150	100
Лиловый	0,38	Аланин	65	250	320	420	500
Желтый	0,43	Пролин	—	75	60	75	90
Фиолетовый с лиловым оттенком	0,48	Тирозин	—	80	75	65	70
Темно-лиловый	0,55	Амино-масляная кислота	следы	150	180	200	220
Лиловый	0,62	Валин-метионин	следы	130	140	150	160
Фиолетовый	0,74	Фенилаланин	—	50	125	125	125
Лиловый	0,80	Лейцин	—	140	140	160	150

На рис. 1 приведена распределительная хроматограмма аминокислот спиртовых экстрактов исходного сырья и силосов разного срока созревания.

На рис. 2 приведена серия хроматограмм аминокислот спиртового экстракта 3-дневного силоса с дополнительным нанесением на всех пятнах, кроме первого, известных аминокислот с целью более точной идентификации отдельных пятен.

Полученные данные показывают, что в процессе силосования происходят значительные качественные и количественные изменения состава свободных аминокислот растительных тканей. В экстракте свежих тканей обнаружены в малых количествах пять аминокислот или их производных: аспарагин, группа аспарагиновая кислота — глицин — серин, глютаминовая кислота, аланин, аргинин, а также неизвестное соединение с *Rf* = 0,27, следы амино-мас. яной кислоты, группы валин - метионин; остальные же аминокислоты отсутствуют.

В экстрактах силосов обнаружены 14 аминокислот. В составе таковых преобладают девять аминокислот или производных, а имен-

но: лизин, аспарагин, группа аспарагиновая кислота — глицин — серин, неизвестное соединение с $Rf = 0.27$, глютаминовая кислота, аланин, группа валин — метионин и лейцины. Присутствуют в малых количествах пять аминокислот, а именно: аргинин, пролин, тирозин, фенилаланин и следы цист(е)ина.

Поскольку на все исходные точки нанесены объемы экстрактов, содержащих одинаковые количества общего азота, определение площади пятен показывает, что в процессе силосования происходит резкое увеличение количества свободных аминокислот.

Образование аминокислот происходит главным образом за счет или клеточных структур, или же растворимых, но не проявляемых нингидрином и не осаждаемых трихлоруксусной кислотой соединений белкового ряда (полипептиды и пр.). В настоящее время возможность этих гипотез исследуется в нашей лаборатории.

Изложенные выше результаты показывают также значительные изменения количества идентифицированных аминокислот в процессе созревания силоса. Так, например, образованные до третьего дня закладки лизин и цист(е)ин полностью исчезают на тридцатый день, за этот же период аминокислоты группы аспарагиновая кислота — глицин — серин глютаминовая кислота и фенилаланин в начале возрастают, а затем от пятнадцатого до тридцатого дня уменьшаются. Что касается аланина, пролина и аминомасляной кислоты, то они постепенно возрастают.

Повышение количества аминомасляной кислоты может быть истолковано на основании декарбоксиляции глютаминовой кислоты.

Вышеприведенные исследования устанавливают новые прямые факты наличия механизма расщепления белков до аминокислот в процессе силосования.

Они дают также более полное представление о динамике распада некоторых аминокислот в течение месячного периода созревания силоса. В ранних исследованиях при идентификации или определении ограниченного числа аминокислот устанавливается только распад глютаминовой кислоты, группы серин — цистин и лейцина^(3,4).

Полученные данные доказывают, кроме этого, значительный распад аминокислот группы аспарагиновая кислота — глицин — серин, группы валин — метионин, фенилаланин и, наоборот, повышение содержания аланина, аминомасляной кислоты и фактическое постоянство лейцина.

Институт животноводства и ветеринарии
МСХ Армянской ССР

Մ. Ա. ՅԵՐ-ՎԱՐԱՊԵՏՅԱՆ ԵՎ Է. Խ. ՄԶՍՐՅԱՆ

Միլիոնացման ժամանակ բուսական հյուսվածքների օպիումակոցներից
լուծելի ամինաթթուների անջատումը

Միլիոնացման ընթացքում բուսական հյուսվածքներում տեղի ունեցող միկրորրիոլո-
գիական և ֆերմենտատիվ պրոցեսների կապվածությամբ բնութագրվում է ամինաթթուների ճեղք-

մամբ, որի հետևանքով առաջանում է ածխածնի և ջրածրածուխի օրգանական թթուներ՝ կաթնաթթու, քաղցրախաթթու, պրոպիոնաթթու, յուղաթթու և այլն:

Հայտնի է, որ սիլոսացման ժամանակ սպիտակուցների ճեղքումն ավելի շուտ զնում է բուսական հյուսվածքների պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների ազդեցության տակ, քան միկրօօրգանիզմների կենսագործունեության հետևանքով: Ներառվում է, որ այդ պրոցեսում սպիտակուցները վեր են ածվում հեշտ լուծելի ցածրամոլեկուլ միացությունների՝ մասնավորապես պոլիպեպտիդների և ամինոթթուների. իսկ որոշ դեպքում էլ այդ վերջինի ամինային խումբն անջատվում է ամինալի ձևով: Մինչև այժմ սիլոսացման ընթացքում բուսական հյուսվածքներում գտնվող սպիտակուցները և նման բարդ ազոտային միացություններից ազատ ամինոթթուներն առաջացած ուղղակի փոփոխություններ չկան: Հայտնի չէ նաև, թե սիլոսացման հաջորդ օրվանից նրա մեջ հայտնաբերված ազատ ամինոթթուներն իրենցից ներկայացնում են բուսական հյուսվածքներում գոյություն ունեցող միացություններ, թե հանդիսանում են նրանց կազմի մեջ մտնող սպիտակուցային մոլեկուլի քայքայման հետևանք:

Սույն աշխատանքի նպատակն է եզել պարզել սիլոսացման ընթացքում սպիտակուցային նյութերի քայքայման աստիճանը և բնութագրել առաջացած ամինոթթուները: Այդ հարցի պարզարանումը կարևոր է առաջված սիլոսի սրահի, ինչպես նաև նրա մարմնիության և սննդաբար արժանիքների գնահատման համար: Ուսումնասիրությունները տարվել են թարմ առվույտի և նրանից պատրաստված սիլոսի վրա, ըստ հասունացման 3, 7, 15 և 30 օրերի, 10 մոդուլ սպիրտային էքստրահաներում:

Ազատ ամինոթթուներն բաժանման և բնութագրման համար, սպիրտային էքստրակտները հինգ անգամ խառնելուց հետո, ենթարկվել են խրոմատոգրաֆիայի թղթի վրա: Ստացված տվյալները ցույց են տվել՝

1. Սիլոսացման տարրեր ժամկետներում (3, 7, 15 և 30 օր) տեղի է ունենում սպիրտում էքստրակտվող ազոտային միացությունների աստիճանական աճ, որը հաստատում է սիլոսացման ընթացքում ելանյութի մեջ գտնվող սպիտակուցների զգալի ճեղքման փաստը (0,34-ից հասնում է 2,6 տոկոսի, ազոտակ 1):

2. Բուսական հյուսվածքներում գտնվող ազատ ամինոթթուները նույնպես սիլոսացման ընթացքում քանակական և որակական գոյի փոփոխություններ են կրում, օրինակ՝ մինչև սիլոսացումը հումքի սպիրտային էքստրակտներում հայտնաբերվել են քիչ թվով ամինոթթուներ կամ նրանց ածանցյալները՝ ասպարագին, ասպարագինաթթու-գլիցին-սերին խումբը, գլյուտամինաթթու, ալանին, արգինին և անհայտ ամինոթթու 0,27 Rf-ով, ինչպես նաև ամինոյուգաթթվի վալին-մեթիոնին խմբի հետքեր: Մնացած ամինոթթուները քաղցկայում են:

Սիլոսների սպիրտային էքստրակտներում հայտնաբերվել են 14 ամինոթթուներ, որոնցից դերակշռում են հետևյալ իննը ամինոթթուները կամ նրանց ածանցյալները՝ լիզին, ասպարագին, ասպարագինաթթու-գլիցին-սերին խումբը, անհայտ միացություն 0,27 Rf-ով, գլյուտամինաթթու, ալանին, վալին-մեթիոնին խումբը և լեյզին: Հայտնաբերված են նաև հետևյալ հինգ ամինոթթուները, սակայն ավելի պակաս քանակությամբ՝ արգինին, պրոլին, տիրոզին, ֆենիլալանին և ցիստ(ե)ինի հետքեր (ադ. 2, նկ. 1, 2):

Այնքան, որքան բոլոր դեպքերում ելակետային նյութը պարունակել է ազոտի հավասար քանակություններ, թղթի վրա արտահայտված ամինոթթուների հետքերի մակերեսների չափումը նույնպես ցույց է տվել, որ սիլոսացման ընթացքում տեղի է ունենում ազատ ամինոթթուների քանակների խիստ ավելացում:

Ամինոթթուների անջատումը գլխավորապես տեղի է ունենում կամ քիմիային ըստ-բուկտուրայի քայքայման հաշվին, կամ լուծվող, սակայն նինհիդրինով չհայտնաբերվող և եռլորթացախաթթվով չնստող սպիտակուցային կարգի միացությունների հաշվին (սլուի-պեպտիդներ և այլն):

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ A. J. Virtanen, Cattle Fodder and Human Nutrition, London, 1938. ² А. А. Зубилин, Научные основы консервирования зеленых кормов, М., 1947. ³ А. Дж. Барнет, Процессы брожения в силосе, Русский перев., М., 1955. ⁴ К. Шapper и К. Рэкер, Z. f. Tierphysiol, Tiererenähr und Futhermittelk. 13, b. 2, 65; 1953.