

VATSAS SÜNTEESITAVA MIKROOBSE PROTEIINI KOGUSE MÄÄRAMINE URIINI PURIINDERIVAATIDE KAUDU

O. Kärt, I. Kibbal, M. Ots

Vatsas sünteeditava mikroobse proteiiniga katavad mäletsejalised suurema osa oma proteiinitarbust. Seepärast oleks oluline teada, kui palju erinevate söödaratsioonide puhul vatsas mikroobset proteiini sünteeditakse. Vatsafüsioloogiliste uuringute käigus on välja töötatud ja aegade jooksul kasutatud väga mitmeid erinevaid meetodeid. Siinjuures tuleb aga kohe märkida, et väga täpset ja lihtsat meetodit seni veel leitud ei ole.

Üheks küllaltki täpseks meetodiks on osutunud mikroobse proteiini sünteesi ulatuse määramisel valgubaba söödaratsiooni kasutamine. Sel juhul söödetakse katseloomadele lämmastikuallikana mittevalgulist proteiini (näiteks karbamiidi) ning eeldatakse, et kogu vatsast duodeenumisse jõudnud valguline proteiin (*resp.* lämmastik) on mikroobse päritoluga. Analüüsidest kuumuse proteiinisisaldust ja leides sööda liikumise kiiruse seedekanalis, saame arvutada mikroobide poolt sünteeditud proteiini hulga. Meetodit saab kasutada eelkõige teoreetiliste arvutuste tegemisel, mitte aga otsese söötade mõju hindamiseks mikroobse proteiini sünteetile.

Küllalt ulatuslikult on kasutatud sünteeditava mikroobse proteiini koguse hindamisel ka diaminopimeliinhappe (DAPA) määramisel põhinevat meetodit. Nimelt sisaldavad vaid vatsabakterite rakukestad DAPA-t. Söödad, välja arvatud mikroobsed söödad, seda ei sisalda. On kindlaks tehtud, et DAPA sisaldus bakterite rakukestas on konstantne, varieerudes vaid mõnevõrra erinevate bakteritüvede vahel. Meetodi puuduseks on, et ei võeta arvesse sünteeditavat ainuraksete massi, sest nende rakukest DAPA-d ei sisalda.

Kõige täpsemaks meetodiks mikroobse proteiini sünteesi ulatuse määramisel on osutunud ³⁵S, ¹⁵N või ³²P isotoopide kasutamine, kuid problemaatiliseks on osutunud radioaktiivsete isotoopide käsitlemine. Probleeme tekitab ka asjaolu, et selle meetodi kohaselt määratakse vaid vatsavedelikus assotsieeruvaid mikroorganisme, kuid teatavasti koloniseerub vatsasisu tahketel osakestel enam baktereid kui vatsavedelikus.

Kõigi eelnimetatud meetodite kasutamine eeldab, et lehmad oleksid varustatud peensoole fistulitega. See seab piirangud katsetes kasutatavate loomade arvu suhtes ja teeb eksperimentide läbiviimise keerukaks. Seepärast näib olevat väga perspektiivne võimalus selgitada mikroobse valgu sünteesi ulatust puriinderivaatide kaudu, määrates nende sisaldust kas piimas või uriinis.

Puriinderivaatide metabolism

Puriinderivaatide kaudu mikroobse proteiini sünteesi ulatuse määramine põhineb mäletsejaliste organismis toimuvate ribonukleiinhapete (DNA ja RNA) katabolismi lõpp- ja vaheproduktide analüüsil. Teine oluline lähtekoht on see, et söötades olevad ribonukleiinhapped ja nende derivaadid hüdrolüüsuvad vatsa mikroorganismide poolt sünteeditud ensüümide toimel lõplikult süsihappegaasiks, veeks ja ammoniaagiks ning neid ei inkorporeerita bakterivalgu koostisesse. Seega on peensooles imenduvad nukleiinhapped vaid mikroobse päritoluga.

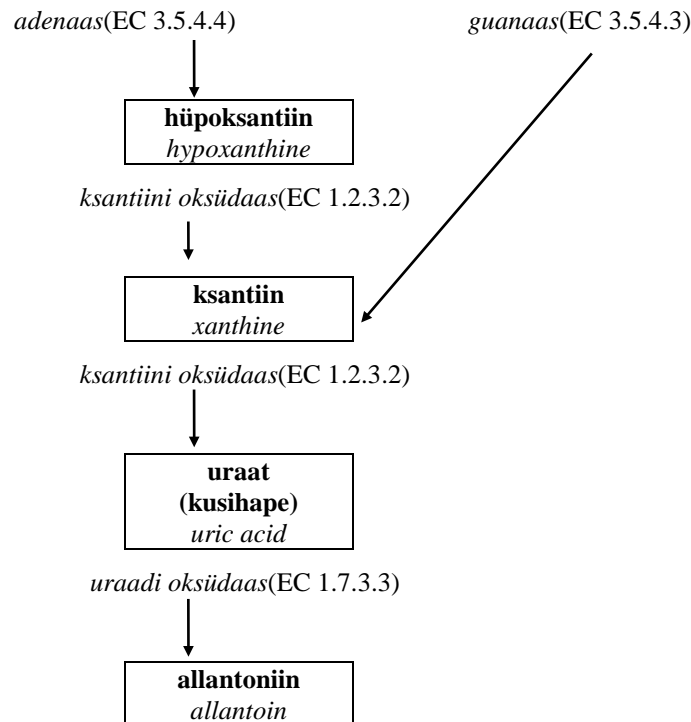
Mikroobse päritoluga ribonukleiinhapete seeduvus seedekanalis on suhteliselt konstantne – 75...85% (Stangassinger jt., 1995). Absorptsiooni eeltingimuseks on, et ribonukleiinhapped peavad olema eelnevalt looma enda poolt produtseeritud ja endogeensete ensüümide poolt hüdrolüüsitud.

DNA ja RNA koosnevad paljudest monomeeridest, mis moodustavad pikki ahelaid. Iga monomeer, mida nimetatakse nukleotiidiks, koosneb fosfaadist, suhkrust ja kas puriin- või pürimidiinialustest. Nii DNA kui RNA struktuuris esineb kaks erinevat puriinialust – adeniin ja guaniin – ning üks pürimidiinialust – tsütosiin. Peale selle leidub vaid DNA-s pürimidiinialust – tümiin – ja RNA-s pürimidiinialust – uratsiil (Franson, Spurgeon, 1992).

Organismis allutatakse puriin- ja pürimidiinialused omakorda intensiivsele hüdrolüüsile, mis saab alguse juba absorptsiooni käigus soolemukoosas. Peale soolemukoosi esineb puriinialuseid hüdrolüüsuvaid ensüüme ka mujal organismis, näiteks maksas, neerudes, lihastes ja veres. Kui pürimidiinialused lagundatakse organismis väga kiiresti ammoniaagiks ning atsetüül-CoA-ks või suksiniüül-CoA-ks ja kasutatakse ära mitmetes anaboolsetes ja kataboolsetes protsessides, siis puriinialuste katabolism ei lähe mäletsejaliste organismis lõpuni. Puriinialuste katabolismi lõpp-produktiks mäletsejaliste organismis on allantoiin (vt. joonis 1), mis väljutatakse organismist uriiniga (Tohver, 1977). Tuleb aga märkida, et allantoiini kõrval leidub uriinis ka teisi puriinialuste hüdrolüüsi vaheprodukte, nagu ksantiin, hüpoksaantiin ja kusihape. Ksantiini ja hüpoksaantiini leidub uriinis siiski võrreldes teiste derivaatidega suhteliselt vähe, mistõttu pole nende määramine ka alati obligatoorne, seda eriti veiste puhul.

adeniin
adenine

guaniin
guanine



Joonis 1. Puriinaluste katabolism

Figure 1. Catabolism of purine bases

Puriinderivaatide sisaldus ning üksikute derivaatide omavaheline suhe uriinis pole veistel ja lammastel ühesugune. Puriinaluste hüdrolyüüsil tuleb pidada võtmeensüümiks ksantiini oksüdaasi (EC 1.2.3.2.), mille aktiivsus on lammastel tunduvalt väiksem kui lehmadel. Seetõttu on lammaste uriinis võrreldes lehmadega ka allantoiini mõnevõrra vähem kui teisi puriinderivaate. Täpsemate arvestuste tegemisel on osutunud otstarbekaks määrata lammaste uriinis nii allantoiini kui kusihappe sisaldust, lehmade puhul piisab tavaliselt vaid allantoiini määramisest.

Mikrobiaalse proteiini sünteesi ulatuse määramisel puriinderivaatide kaudu peame arvestama veel asjaoluga, et mitte kõik uriinis leiduvad derivaadid ei pärine mikroorganismide ribonukleinhapetest. Uriinis on ka nn. endogeense päritoluga puriinderivaate, mis satuvad sinna kehavalkude katabolismi tulemusena, ja neid pole kasutatud keharakkude *de novo* sünteesiks. Endogeense päritoluga puriinderivaatide hulk uriinis sõltub eelkõige looma ainevahetusmassist, aga ka looma vanusest ja ainevahetuse kiirusest. Noortel loomadel on ainevahetus intensiivsem kui täiskasvanud loomadel. Seetõttu toimub noorloomadel ka keharakkude katabolism kiiremini kui täiskasvanud loomadel, mistõttu noorloomade uriinis on endogeense päritoluga puriinderivaate suhteliselt rohkem kui täiskasvanud loomadel.

Paljude katsetega on kindlaks tehtud, et täiskasvanud veised väljutavad uriiniga endogeense päritoluga puriinderivaate keskmiselt 2,5 mmol (12,4 mg N)/kg W^{0,5} ja lambad 0,42 mmol (2 mg N)/kg W^{0,5} päevas, mis moodustab vastavalt 2,8% ja 1,1% kogu uriiniga väljutatavast endogeensest lämmastikust (Stangassinger jt., 1995). Seega tuleb täpsete arvutuste tegemisel kogu uriiniga väljutatavast puriinderivaatide kogusest endogeense päritoluga puriinderivaadid maha arvestada.

Lüpsvad lehmad väljutavad puriinderivaate ka piimaga, mis filtreeruvad udarasse verest. Siiski on nende osatähtsus piimas suhteliselt väike ja see sõltub eelkõige nende kontsentratsioonist veres. Giesecke jt. (1994) andmeil väljutatakse piimaga kogu ekskreeteeritud allantoiinist vaid 1,6% ja kusihapest 3,1%. Kuigi autorid ei leidnud statistiliselt usutavaid korrelatsioone vatsas sünteesitud mikroobse proteiini koguse ja nimetatud puriinderivaatide vahel piimas, jätkatakse sellesuunalisi uuringuid, sest piima kogumine ja piimast puriinderivaatide määramine on suhteliselt lihtne.

Materjal ja meetodika

Katse lammastega mikroobse proteiini sünteesi ulatuse määramiseks puriinderivaatide kaudu korraldati Eerika katselaudas nelja täiskasvanud jääraga ainevahetuspuurides. Bilansskatse jooksul kogutud uriinist määrati

allantoiini ja kusihappe sisaldus Cheni ja Gomesi (1992) poolt kirjeldatud meetodika järgi. Lammastele söödeti vaid *ad libitum* silo. Katse eelperiood kestis kaheksa päeva ja põhiperiood seitse päeva. Põhiperioodi jooksul määrati silo söömused, silo seeduvus *in vivo* ja lämmastiku bilanss. Kõik söödaanalüüsid tehti üldlevinud zooanalüüsi meetodikate järgi (vt. Kärt, 1996). Mikroobse proteiini sünteesi ulatus vatsas kalkuleeriti uriini allantoiinisalduse järgi. Kasutati Rysi jt. (1975) valemit, millist on refereerinud ja kasutanud oma uurimustes ka Puchala ja Kulasek (1992).

Katseloomadele söödeti põldheinast (50% kõrrelisi + 50% liblikõielisi, loomise lõpul) valmistatud rullisilo, mille tegemisel konservante ei kasutatud. Silo sisaldas 22,5% kuivainet. Kuivaines oli 19,2% proteiini ja 30,4% toorkiudu. Üks kuivaine kilogramm sisaldas 8,14 MJ metaboliseeruvat energiat. Katsesilo pH oli suhteliselt kõrge (4,8), samuti sisaldas silo suhteliselt palju ammoniaaklämmastikku (13,15% üldlämmastikust). Siinkohal piirdatakse vaid nende katsetulemuste analüüsiga, mis on seotud mikroobse proteiini sünteesi ulatuse määramisega puriinderivaatide kaudu.

Tulemused ja arutelu

Kokkuvõtlikult on katsetulemused esitatud tabelis 1, kust selgub ka loomadevahelised erinevused nii silo kuivaine, proteiini kui energia söömuse osas. Jäär nr. 3 söi silo oluliselt vähem kui teised katses olnud jäärad. Et nimetatud katseloomal märgatavaid haigustunnuseid ei esinenud, arvestati siiski saadud andmeid üldistuste tegemisel.

Tabel 1. Silo söömused, puriinderivaatide ekskretsioon uriiniga ja sünteesitud mikroobse proteiini kogus

Table 1. Silage intake, urinary excretion of purine derivatives and yield of microbial protein synthesis

Jäär nr. <i>No. of ram</i>	Söömused, päevas <i>Intake, per day</i>			Uriiniga väljutati, päevas <i>Urinary excretion, per day</i>		Mikroobne proteiin, g/päevas <i>Microbial protein, g/per day</i>
	kuivaine, g <i>dry matter, g</i>	met.energia, MJ <i>met. energy, MJ</i>	proteiin, g <i>protein, g</i>	allantoiin-N, mg <i>allantoin-N, mg</i>	kusihape-N, mg <i>uric acid-N, mg</i>	
Jäär 1 <i>Ram 1</i>	953	7,76	186	526,7	31,9	11,7
Jäär 2 <i>Ram 2</i>	1061	8,64	204	550,2	44,2	12,2
Jäär 3 <i>Ram 3</i>	513	4,17	99	389,0	20,2	8,6
Jäär 4 <i>Ram 4</i>	957	8,21	186	479,1	33,0	10,6

Tulemuste statistilisel töötlemisel leidsime tiheda korrelatsiooni kuivaine söömuse ja uriiniga väljutatud allantoiini vahel ($r = 0,953$), kuivaine söömuse ja uriiniga väljutatud kusihappe vahel ($r = 0,923$) ning kuivaine söömuse ja vatsas sünteesitud mikroobse proteiini vahel ($r = 0,951$). Energia söömused korreleerus nimetatud näitajatega vaid pisut nõrgemini kui kuivaine söömused ($r =$ vastavalt 0,918; 0,900 ja 0,916). Uriiniga väljutatud allantoiini ja kusihappe kogused korreleerusid samuti hästi proteiini söömusega ($r =$ vastavalt 0,951 ja 0,912).

Et uriiniga väljutatava allantoiini ja kusihappe kogused korreleerusid hästi nii kuivaine kui proteiini söömusega, arvutati ka nendevahelised regressioonvõrrandid:

$$\text{allantoiin-N, mg/päevas} = 244 + 0,278 \text{ kuivaine söömused, g/päevas, } R^2 = 90,8$$

$$\text{allantoiin-N, mg/päevas} = 244 + 1,43 \text{ proteiini söömused, g/päevas, } R^2 = 90,5$$

$$\text{kusihappe-N, mg/päevas} = 0,00 + 0,0371 \text{ kuivaine söömused, g/päevas, } R^2 = 85,1$$

$$\text{kusihappe-N, mg/päevas} = 0,4 + 0,189 \text{ proteiini söömused, g/päevas, } R^2 = 83,2$$

$$\text{allantoiin-N, mg/päevas} = 244 + 0,78 \text{ kuivaine söömused, g/päevas} - 2,6 \text{ proteiini söömused, g/päevas, } R^2 = 91,0$$

$$\text{kusihappe-N, mg/päevas} = 0,08 + 0,611 \text{ kuivaine söömused, g/päevas} - 2,96 \text{ proteiini söömused, g/päevas, } R^2 = 99,7$$

Kokkuvõte

Katsetulemustest selgub, et allantoiini ja kusihappe ekskretsioon uriiniga on tihedas seoses nii kuivaine kui proteiini söömusega. Kuigi uriiniga väljutatava allantoiini kogus korreleerub energia ja proteiini söömusega mõnevõrra paremini kui uriiniga väljutatava kusihappe hulk, saadakse kõige usutavamad tulemused siis, kui mikroobse proteiini sünteesi ulatuse määramisel arvestatakse kuivaine ja proteiini söömuse koosmõju ning

uriiniga eritatavatest puriinderivaatidest määratakse nii allantoiini kui kusihappe sisaldused. Saadud katsetulemused langevad hästi kokku kirjanduses leiduvatega (Puchala, Kulasek, 1992, Stangassinger jt., 1995, Vagnoni jt., 1997; Johnson jt., 1998) ning see julgustab nimetatud meetodit kasutama mäletsejaliste proteiini ainevahetuse edasisel uurimisel.

Kirjandus

- Chen X. B., Gomes M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of the technical details. – Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, UK, Publication. 23 pp.
- Frandsen R. D., Spurgeon T. L. 1992. Anatomy and Physiology of Farm Animals. – Lea and Febiger, Philadelphia. 572 pp.
- Giesecke D., Ehrentreich L., Stangassinger M., Ahrens F. 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. – J. Dairy Sci. 77:2376..2381.
- Johnson L. M., Harrison J. H., Riley R. E. 1998. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using uric acid or allantoin. – J. Dairy Sci. 81:2408...2420.
- Kärt O. 1996. Uurimused veiste söödaratsiooni energiasisalduse suurendamise võimaluste kohta. – Dissertatsioon. Tartu, 181 lk.
- Puchala R., Kulasek G. W. 1992. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives. – Can. J. Animal Sci., 72: 821...830.
- Stangassinger M., Chen X. B., Lindberg J. E., Giesecke D. 1995. Metabolism of purines in relation to microbial production. – Ruminant Physiology. Procc. of the Eight International Symposium on Ruminant Physiology, 387...406.
- Tohver V. 1977. Üldine biokeemia. – Tallinn, Valgus, 924 lk.
- Vagnoni D. B., Broderick G. A., Clayton M. K., Hatfield R. D. 1997. Excretion of purine derivatives by holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. – J. Dairy Sci. 80:1695...1702.

Estimation of Microbial Protein Synthesis in Rumen Using Urinary Excretion of Purine Derivatives

O. Kärt, I. Kibbal, M. Ots

Summary

In the article a review about the metabolism of purine derivatives in the ruminants is given. Possibilities of estimating the amount of microbial protein synthesized in the rumen by the use of urinary excretion of purine derivatives are summarized. The experiments were carried out with adult rams fed silage *ad libitum*. The results indicated that there was a high correlation between urinary excreted allantoin and dry matter intake ($r = 0.953$) and between urinary excreted uric acid and dry matter intake ($r = 0.923$). Correlation was high also between urinary excreted allantoin and protein intake ($r = 0.951$) and between urinary excreted uric acid and protein intake ($r = 0.912$).