

УКРАИНСКАЯ АКАДЕМИЯ АГРАРНЫХ НАУК  
УКРАИНСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

*На правах рукописи*

**РИЗЕЛЬ**  
Сергей Артемович

**ИССЛЕДОВАНИЕ  
ФОНДА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ  
РУБЦОВОЙ СРЕДЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

03.00.04 — биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Львов — 1992



00815031 (1)

Работа выполнена в лаборатории биофизики Украинского научно-исследовательского института физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук ПУПИН И. Г.

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор СКО-РОХИД В. И., доктор биологических наук, профессор ЯНОВИЧ В. Г.

**Ведущая организация:** Львовский зооветеринарный институт.

Защита диссертации состоится « 2 » июня 199 2 г. в 10 часов на заседании специализированного совета Д. 020.14.01 в Украинском научно-исследовательском институте физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных.

Адрес института: 290034, г. Львов, ул. В. Стуса, 38.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Украинского научно-исследовательского института физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных.

Автореферат разослан « 30 » апреля 1992 г.

*Ученый секретарь  
специализированного совета,  
кандидат биологических наук*

РОБАК В. Е.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Процессы поступления в организм жвачных животных жизненно важных питательных веществ в значительной мере зависят от особенностей рубцового пищеварения. В протекании рубцового пищеварения важнейшую роль играют микроорганизмы. Их метаболизм оказывает непосредственное влияние на обмен веществ животных в целом [Annisson, 1956]. Так, потребности жвачных животных в аминокислотах в значительной степени удовлетворяются за счет микробального белка. Он может обеспечивать до 85% потребности жвачных в протеине [Buttery, Foulds, 1985].

Исходя из вышесказанного, актуальным для теории и практики животноводства является выяснение основных факторов, влияющих на содержание и метаболизм свободных аминокислот в рубцовой среде крупного рогатого скота с целью углубления научных основ повыше- ния трансформации протеина корма в белки получаемых продуктов животноводства. В частности, научно-практический интерес представляет суточная и часовая динамика свободных аминокислот, участие отдельных аминокислот в синтезе микробального белка, степень их катаболизма, взаимопревращения, а также зависимость этих процессов от содержания в рубцовой среде нитратов и нитритов.

Несмотря на интенсивное изучение в последние годы указанных вопросов [Czerkowski, 1984; Гулий и др., 1987; Тараканов и Соколовская, 1988; Szylił et. al, 1988; Антова, 1989; Боев, 1991], ряд их аспектов изучен недостаточно или не изучен вовсе.

Цель и задачи исследований. Целью диссертационной работы являлось изучение фонда свободных аминокислот рубцовой среды у крупного рогатого скота. В план исследований входили следующие основные задачи:

1. Исследовать уровень фонда свободных аминокислот рубцовой среды крупного рогатого скота и его возможные колебания.
2. Изучить участие свободных аминокислот в процессах биосинтеза микробных белков.
3. Получить новые данные о метаболизме отдельных свободных аминокислот в рубцовой среде.
4. Исследовать зависимость использования свободных аминокислот рубцового фонда микроорганизмами от поступления из внешней среды дополнительных количеств нитратов, нитритов и некоторых других веществ.

Научная новизна. Получены новые данные об особенностях функ-

ционирования микробной экосистемы рубца крупного рогатого скота, фонде свободных аминокислот рубцового содержимого и отдельных его составляющих. Получены также новые данные о влиянии на рубцовый фонд свободных аминокислот и отдельных его составляющих экзогенных нитрата и нитрита натрия.

Практическая ценность работы. Полученные данные можно использовать в организации питания жвачных животных для обеспечения максимального биосинтеза микробного белка в рубце. Возможно более эффективное использование имеющихся кормов за счет уменьшения негативного влияния нитратов на рубцовый метаболизм.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались на 6-й конференции молодых ученых-биологов "Биологические аспекты повышения продуктивности животных и растений" (Рига, 1984), конференции молодых ученых и аспирантов Украинского научно-исследовательского института физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных (Львов, 1988), VII Всесоюзном симпозиуме "Канцерогенные N-нитрозосоединения и их предшественники - образование и определение в окружающей среде" (Таллинн, 1990).

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 144 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, научно-практических рекомендаций и списка литературы. Цифровой материал представлен в 19 таблицах. Список литературы включает 190 наименований, из них 98 иностранных.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть работы проводилась в опытном хозяйстве "Чушки" Украинского НИИ физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных на протяжении 1982-1988 гг. до в.

Поставленная в работе задача исследовать уровень фонда свободных аминокислот содержимого рубца крупного рогатого скота и его возможные колебания, решалась путем количественного определения содержания аминокислот в рубцовой жидкости. Этот показатель определялся в динамике, в течение времени между утренним и вечерним кормлениями.

Также определялся уровень свободных аминокислот содержимого рубца в разные дни 30-дневного периода - через 120 и 240 минут после утреннего кормления.

Проводился также инкубационный опыт по изучению влияния на уровень фонда свободных аминокислот рубцовой среды нитрата и

нитрита натрия в дозе 7,5 мкмоль/мл. Кроме того, исследовалось влияние на уровень свободных аминокислот в содержимом рубца нитрата натрия, поступающего с кормом в дозе 10 г/100 кг массы. Материал для исследований отбирался через 120 и 240 минут после утреннего кормления.

Изучение влияния повышения уровня концентрации свободных аминокислот в рубцовой среде на интенсивность процессов биосинтеза белка проводилось при помощи инкубационных опытов. При этом проводилось добавление в инкубационную среду 1,5 и 3,0 мг/мл смеси аминокислот вышеуказанного состава. В эксперименте использовался бикарбонат аммония, содержащий в качестве источника метки тяжелый изотоп азота -  $\gamma^{15}\text{N}_2$ .

Проводились инкубационные опыты по изучению зависимости включения в микробную массу содержимого рубца метки радиоактивного углерода из  $\gamma\text{I-}^{14}\text{C}$ глицина,  $\gamma\text{2-}^{14}\text{C}$ глицина,  $\gamma\text{I-}^{14}\text{C}$ аланина в зависимости от поступления в среду бикарбоната и сахарозы; опыты по включению метки из  $\gamma\text{I-}^{14}\text{C}$ глицина; опыты по включению метки в тела рубцовых микрорганов из  $\gamma\text{5-}^{14}\text{C}$ глутаминовой кислоты,  $\gamma\text{4-}^{14}\text{C}$ аспарагиновой кислоты,  $\gamma\text{2-}^{14}\text{C}$ метионина в зависимости от дополнительного поступления в среду нитрата или нитрита натрия.

Были проведены исследования по включению метки радиоактивного углерода из  $\gamma\text{I-}^{14}\text{C}$ смеси аминокислот микроорганизмами проб содержимого рубца, отобранного у животных, в организм которых с питьевой водой и кормом в течение соответственно 2-3 и 47-48 дней поступал нитрат натрия в количестве 6 и 10 г/100 кг массы в день.

Кроме того, в инкубационных опытах было исследовано включение метки из  $\gamma\text{I-}^{14}\text{C}$ шипрс инограднокислого натрия и  $\gamma\text{I,2-}^{14}\text{C}$ кетоглутаровой кислоты в целые и разрушенные ультразвуком микробные клетки. Изучалось также влияние на этот процесс незначительных сульфата аммония, глюкозы и пировинограднокислого натрия.

Материалом исследований служило свежее содержимое рубца бычков черно-пестрой породы с вполне сформировавшимся преджелудочным пищеварением, содержащихся на рационах зимне-стойлового периода. Содержимое отбиралось через фистулу рубца предварительно прооперированных животных. Для инкубационных опытов рубцовая жидкость отбиралась через 120 минут после начала утреннего кормления.

В случае использования радиоактивно меченных субстратов, осадок содержимого рубца подвергался экстракции по Фолчу (Гэдди, 1979). В результате этой операции получали сухой безлипидный остаток содержимого рубца и смесь липидных компонентов в растворе.

И тот, и другой материал исследовались с целью определения их относительной радиоактивности.

Изучение относительной радиоактивности проводилось при помощи жидкостного сцинтилляционного счетчика СЭС-2 производства Опытного завода ВНИИМП. При этом использовались описанные в литературе методики [Остерман, 1983].

Для определения включения метки  $^{14}\text{C}$  в белки рубцовых микроорганизмов их сухой безлипидный остаток подвергался кислотному гидролизу [Мешкова, Северин, 1979]. Полученная в результате смесь аминокислот изучалась при помощи двумерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле с использованием золя кремниевой кислоты [Кирхнер, 1981; Беленький и др., 1984]. Эта же методика применялась и для определения концентрации в рубцовой среде свободных аминокислот.

Количественное определение аминокислот в пятнах на аминокрограммах осуществлялось при помощи денситометрии [Шаллард, 1971].

Изучение включения метки радиоактивного углерода в отдельные аминокислоты определялось либо методом зонального элиза, либо автордиографией.

При определениях концентрации метки  $^{14}\text{C}$  в выделяющемся в ходе инкубаций углекислом газе, он улавливался концентрированным раствором щелочи, а затем аликвоты просчитывались на сцинтилляционном счетчике.

Если в инкубационном опыте использовалась метка азота-15, то азотистые вещества выделялись по методу полумикро-Кьельдаля. Изотопный состав азота белков микроорганизмов и аммиака определялся при помощи масс-спектрометра МИ-1201Б.

Все полученные результаты статистически обрабатывали на персональных компьютерах "ПК-ОИ Львов" и Olivetti M-240 при помощи самостоятельно разработанного программного обеспечения с использованием стандартных формул Стьюдента.

В существующие методики нами были внесены усовершенствования, на которые получены Удостоверения на рационализаторские предложения, принятые УНИИВЭСХХ: №24 от 12 июля 1982 г., №38 от 09 октября 1986 г., №39 от 09 октября 1986 г., №42 от 13 мая 1988 г., №43 от 20 июня 1988 г., №47 от 05 июля 1989 г.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1. Исследование уровня фонда свободных аминокислот

содержимого рубца крупного рогатого скота и его колебаний

Данные, полученные при изучении изменений фонда свободных аминокислот содержаемого рубца крупного рогатого скота указывают, во-первых, на значительные колебания его уровня и, во-вторых, - на гетерогенность его состава.

В течение промежутка времени между утренним и вечерним кормлениями была отмечена зависимость содержания свободных аминокислот рубцового фонда от поступления корма в рубец, состоящая в значительном повышении (более чем в 10 раз) их концентрации после кормления. Однако в разные дни такая зависимость была несколько различной, причем для отдельных аминокислот такие различия носили индивидуальный характер. Правда, для аланина и глутаминовой кислоты, валина и метионина, аргинина, цистеина и гистидина было отмечено и определенное сходство в характере происходивших изменений их концентраций в рубцовой среде.

Кроме того, варьирует и характер этих изменений, так что в разные дни происходят различные изменения уровня фонда свободных аминокислот (таблица I). Следует отметить, что внутри фонда уровень содержания в рубцовой жидкости различных аминокислот изменяются в значительной мере индивидуальным образом. Установлен различный характер изменений суммарных концентраций заменимых и незаменимых свободных аминокислот содержаемого рубца.

Вышесказанное свидетельствует о том, что весь метаболизм рубцовых микроорганизмов как своеобразной микровоскоисотемы, находится в состоянии постоянного колебательного движения. Это согласуется с данными литературы (Mratwa et al., 1978; Madsen et al., 1988). Кроме того, такие колебания у отдельных животных носят довольно выраженный индивидуальный характер.

Такое состояние постоянных колебаний метаболических процессов и вызывает постоянно возникающую проблему методического характера при изучении рубцового пищеварения, выражающуюся в значительной дисперсии получаемых данных, особенно при работе с использованием изотопных меток (из-за высокой чувствительности этих методов).

## 2. Исследования влияния на уровень фонда свободных аминокислот содержаемого рубца крупного рогатого скота и его колебания экзогенного поступления нитрата натрия

Поступление с кормом в рубец животных экзогенного нитрата натрия приводило к заметным изменениям в характере обычных колебаний уровней концентрации в рубцовой жидкости различных свободных аминокислот. Это согласуется с данными литературы о влиянии

Таблица I

Изменения уровня фонда свободных аминокислот рубцовой  
среды в течение 30 дней, мкмоль/100 мл,  $M \pm m$ ,  $n = 6$

: Время :		Аминокислоты			
Дни: отбора :					
от: от нача-					
бора: ла корм-					
проб: ления, :		Заменяю		Незаменяю	
: мин. :					
I :	2 :	3 :	4 :	5 :	6 :
		Глутамат	Аспарат	Валин	Метионин
I	120	193.2±55.0	35.9±8.2	135.0±56.5	130.2±36.2
	240	66.9±15.	25.3±5.1	23.3±7.6	83.5±18.6
3	120	134.6±30.5	23.9±6.1	5.3±3.2	14.5±8.5
	240	127.4±22.1	30.0±7.8	25.7±11.7	20.4±8.7
5	120	48.5±7.3	22.6±6.7	26.9±12.5	35.4±11.5
	240	122.8±34.8	29.9±9.5	7.9±5.1	36.6±20.0
15	120	63.3±14.4	11.0±2.1	111.0±43.7	85.9±30.1
	240	55.8±10.7	16.6±4.6	9.6±5.1	20.4±8.7
30	120	68.4±18.4	16.1±1.3	89.3±43.0	75.0±23.1
	240	41.3±10.0	16.1±1.3	4.8±3.7	8.5±8.5
		Аланин	Серин+Глицин	Лизин	Треонин
I	120	476.0±161.0	128.8±27.5	0.01±0.00	23.8±9.7
	240	92.2±20.4	46.7±13.7	не обнаруж.	22.6±1.7
3	120	138.7±46.1	60.7±21.0	2.5±2.4	41.6±11.8
	240	108.2±45.0	25.3±11.7	0.003±0.002	18.9±9.8
5	120	66.6±28.0	не обнаруж.	не обнаруж.	9.2±6.1
	240	99.6±40.0	10.0±0.01	не обнаруж.	16.4±7.2
15	120	150.5±68.6	24.8±9.5	1.8±1.8	20.7±9.5
	240	89.4±37.9	16.2±7.0	0.062±0.002	58.9±15.0
30	120	283.4±108.3	59.5±25.3	1.9±1.9	32.5±8.7
	240	25.2±5.6	17.2±7.8	не обнаруж.	27.0±7.3

Продолжение таблицы I

I	2	3	4	5	6
		Гистидин	Пролин	Аргинин	Лейцин
I	120	не обнаруж.	104.4±49.3	9.4±5.9	не обнаруж.
	240	3.5±2.5	не обнаруж.	6.8±3.7	не обнаруж.
3	120	не обнаруж.	25.9±15.9	не обнаруж.	не обнаруж.
	240	не обнаруж.	29.7±25.1	не обнаруж.	не обнаруж.
6	120	не обнаруж.	не обнаруж.	не обнаруж.	не обнаруж.
	240	не обнаруж.	не обнаруж.	не обнаруж.	не обнаруж.
15	120	не обнаруж.	76.6±40.3	5.7±3.8	85.6±36.4
	240	0.8±0.6	10.1±6.4	1.6±0.9	7.7±7.7
30	120	0.9±0.6	74.6±34.1	8.4±5.0	15.3±15.3
	240	1.2±1.1	не обнаруж.	8.9±3.6	не обнаруж.
				Цистеин	
I	120			2.5±1.1	
	240			3.9±1.7	
3	120			не обнаруж.	
	240			не обнаруж.	
6	120			не обнаруж.	
	240			не обнаруж.	
15	120			6.2±3.4	
	240			3.2±1.3	
30	120			1.7±1.1	
	240			5.0±1.8	

Примечание: В пробах, отобранных через 120 минут после начала кормления, в первый день обнаруживались следы фенилаланина

поступления в рубцовую среду нитратов на метаболизм микроорганизмов, хотя они и имеют достаточно противоречивый характер (Баканов и др., 1981; Тараканов и др., 1987; Менькин и др., 1989; Sidham et al., 1987).

В инкубационных опытах было выявлено, что наибольшее влияние на концентрацию свободных аминокислот в содержимом рубца оказывал нитрит натрия (таблица 2). Это согласуется с данными литературы о более сильном влиянии нитрит-ионов на микрофлору рубца (Marais, 1983). При этом наиболее чувствительными к его поступлению были уровни концентраций свободных аланина, глутаминовой кислоты, глицина и лизина. Но если концентрация аланина при этом значительно возрастала, то концентрация лизина, наоборот, заметно уменьшалась. Явление сильного увеличения количества аланина, видимо, может свидетельствовать о его сверхсинтезе из-за нарушения метаболизма микроорганизмов (F. Jan, 1968; Cote et al., 1982). В целом же поступления в инкубируемую рубцовую среду экзогенных нитрата или нитрита натрия приводило к замедлению расходования фонда свободных аминокислот (см. табл. 3). Однако если живые клетки не получали нитрат в течение длительного времени с кормом, то это, наоборот, приводило к ускоренному расходованию фонда свободных аминокислот рубцовой среды. Это свидетельствует о том, что длительная нитратная нагрузка вызывает постепенные изменения интенсивности биосинтеза белков. Этот вывод подтверждается и результатами опытов с использованием меченых соединений.

Суммарные концентрации заменимых аминокислот во всех опытах оказывались значительно более сильно подверженными воздействию нитратов или нитритов, чем суммарные концентрации свободных незаменимых аминокислот. Поступление нитрата оказывало заметное воздействие и на изменение соотношения между заменимыми и незаменимыми аминокислотами.

### 3. Исследование влияния повышения уровня концентрации свободных аминокислот в рубцовой среде на интенсивность процессов микробного биосинтеза белка

В инкубационных опытах было показано, что поступление в среду смеси экзогенных свободных аминокислот оказывает значительное воздействие на процессы биосинтеза белка микроорганизмами рубца (таблица 3). При этом было выявлено, что аммонийный азот, поступающий в инкубационную среду в виде бикарбоната аммония, и свободные аминокислоты конкурируют за систему биосинтеза белка. При этом оказывалось, что процесс аммирования с использованием азота

Таблица 2

Концентрация некоторых свободных аминокислот в содержимом рубца, инкубируемом без и с добавлением 7,5 микромоль/мл нитрата или нитрита натрия, микромоль/100 мл,  $M \pm m$ ,  $n = 8$

Аминокислоты	Продолжи- тельность инкубации: мин.	Добавляемые субстраты			P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>
		Без	NaNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>2</sub>		
Глутаминовая кислота	0,5-I	35.3±6.4	97.3±26.6	88.7±23.1	0.03	0.05
	I20	21.8±8.4	42.8±10.0	80.4±27.1	0.2	0.1
Аспарагиновая кислота	0,5-I	5.6±2.8	7.7±3.8	7.1±3.6	0.5	0.5
	I20	не обнару.	2.3±2.3	3.9±3.9	0.5	0.5
Аланин	0,5-I	26.9±9.1	127.7±56.2	85.1±42.7	0.1	0.5
	I20	12.4±3.8	31.2±10.6	459.0±113.0	0.2	0.01
Серин + глицин	0,5-I	2.0±2.0	2.4±2.4	3.2±1.6	0.5	0.5
	I20	не обнару.	не обнару.	2.2±2.2	0.5	0.5
Гистидин	0,5-I	1.6±0.9	6.9±3.7	8.9±4.1	0.2	0.2
	I20	1.2±1.2	1.9±1.0	17.8±8.4	0.5	0.1
Валин	0,5-I	25.6±5.4	38.8±13.8	37.3±10.4	0.5	0.5
	I20	28.9±6.6	31.5±11.7	29.6±16.0	0.5	0.5
Треонин	0,5-I	5.8±3.8	20.1±9.8	21.8±11.9	0.2	0.5
	I20	не обнару.	3.8±3.8	15.2±9.3	0.5	0.2
Лизин	0,5-I	3.7±2.5	не обнару.	не обнару.	0.2	0.2
	I20	0.8±0.8	не обнару.	не обнару.	0.5	0.5
Цистеин	0,5-I	6.9±2.3	18.1±6.1	17.2±4.1	0.2	0.05
	I20	10.9±4.9	9.6±3.0	17.3±6.5	0.5	0.5
Аргинин	0,5-I	24.8±4.7	38.8±10.7	31.7±8.7	0.5	0.5
	I20	11.5±5.2	18.0±4.3	34.9±11.7	0.5	0.1

Примечание. Обнаруживались также следы метионина, лейцина, пролина

аммиака в присутствии свободных экзогенных аминокислот замедлялся, микроорганизмы в значительной мере переключались на непосредственное использование аминокислот в биосинтезе белка. Это сопровождалось увеличением независимости процессов биосинтеза белков от поступления в среду экзогенных источников энергии, а также повышением содержания аммиака в рубцовой среде.

#### 4. Исследование использования микроорганизмами рубца

свободных аминокислот и влияние на него испытуемых веществ

В инкубационных опытах с использованием радиоактивно-меченных соединений было установлено, что свободные аминокислоты в рубцовой среде отчасти декарбоксилируются, отчасти используются для синтеза других соединений. Часть из них преобразуется в иные аминокислоты, а часть включается в микробные белки без изменений. Было выявлено также, что метаболические судьбы различных экзогенных аминокислот в рубце животных индивидуальны. Это подтверждает (1) известными из литературы сведениями (Шманяков и др., 1966; Beauville et al., 1961).

Полученные данные позволяют объяснить значительно более низкую радиоактивность микроорганизмов, инкубированных с  $1-^{14}C$ -глицином по сравнению с инкубированными с  $2-^{14}C$ -глицином (в 2,6-5,8 раз) и характер обнаружения метки в их белках тем, что часть экзогенного глицина, попадая в микробные клетки, преобразуется через серин в пировиноградную и щавелевоуксусную кислоты. При этом первый атом углерода теряется в виде  $CO_2$ , а из щавелевоуксусной кислоты углерод попадает в аспарагиновую кислоту, из которой через треонин - цистеин. Также возможно поступление углерода через пируват в аланин. Из  $2-^{14}C$ -глицина метка может через ацетил-КоА попадать в состав лейцина. Из  $2-^{14}C$ -глицина включается значительно большее количество метки в пролин, чем из  $1-^{14}C$ -глицина. Следовательно, только небольшая часть пролина у рубцовых микроорганизмов образуется из глицина через орнитин. Возможно, метка поступает в пролин через серин, пируват, ацетил КоА, кетоглутарат, а затем глутаминовую кислоту. Это согласуется с известными из литературы данными (Armstrong et al., 1965).

Для экзогенного аланина оказалось характерным преимущественное непосредственное включение в белки рубцовых микроорганизмов.

Такие пути распределения углеродного скелета поступающих в рубцовую среду и преобразующихся экзогенных свободных аминокислот подтверждали и опыты с использованием  $5-^{14}C$ -глутаминовой и  $4-^{14}C$ -аспарагиновой кислот (таблица 4).

Таблица 3

Содержание азота и накопление в нем азота-15 из бикарбоната аммония при инкубации содержащего рубца без и с добавлением смеси экзогенных аминокислот и сахарозы,  $n \pm m$ ,  $n = 6$

Добавляемую субстраты	: Продолжи- тельность: инкубации: мин. :	Показатели		
		: Концентрация: азота белков: мг/100 мл :	: Обогащение, % $^{15}N$ :	: Использовано $^{15}N$ , % от введенного :
$^{15}NH_4HCO_3$ 3,63 мкг/мл	0,5-I	50.67±3.49	0.066±0.004	0.618±0.039
	I20	55.33±6.53	0.606±0.071	6.069±0.763
Р:		>0.5	0.001	0.001
То же + 2 мг/мл сахарозы	0,5-I	52.67±4.65	0.072±0.004	0.700±0.076
	I20	59.67±6.09	1.008±0.179	11.384±0.641
Р:		0.5	0.001	0.001
$^{15}NH_4HCO_3$ + 1,5 мг/мл смеси аминокислот	0,5-I	50.89±4.41	0.073±0.005	0.643±0.049
	I20	58.78±6.11	0.499±0.060	5.309±0.686
Р:		0.5	0.001	0.001
То же + 2 мг/мл сахарозы	0,5-I	46.89±3.09	0.070±0.006	0.573±0.044
	I20	70.89±7.49	0.780±0.148	8.571±0.759
Р:		0.02	0.001	0.001
$^{15}NH_4HCO_3$ + 3,0 мг/мл смеси аминокислот	0,5-I	57.89±4.93	0.050±0.012	0.440±0.106
	I20	69.72±6.80	0.420±0.054	5.284±0.439
Р:		0.05	0.001	0.001
То же + 2 мг/мл сахарозы	0,5-I	54.22±4.90	0.058±0.006	0.574±0.084
	I20	64.39±8.44	0.571±0.059	6.502±0.598
Р:		0.5	0.001	0.001

Таблица 4

Обнаруживаемые при автордиографии пятна радиоактивных аминокислот белковых гидролизатов проб содержимого рубца, инкубированных с  $^{14}\text{C}$ -метионином,  $^{15}\text{C}$ -глутаминовой и  $^{14}\text{C}$ -аспарагиновой кислотами, без и в присутствии нитрата или нитрита,  $n = 3$

Добавляемо помимо субстрата	Продолжи- тельность инкубации : мин.	Меченые субстраты		
		$^{14}\text{C}$ -глутамат	$^{14}\text{C}$ -аспартат	$^{14}\text{C}$ -метионин
Без добавок (контроль)	0,5-1	глутамат валин	глутамат аспартат глицин+серин	метионин
	120	глутамат валин	не обнаруж.	метионин аланин
$\text{NaN}_2$ , 7,5 ммоль/мл	0,5-1	глутамат	аспартат	метионин аланин
	120	глутамат	не обнаруж.	метионин
$\text{NaN}_2$ , 7,5 ммоль/мл	0,5-1	глутамат аспартат	аспартат	метионин аланин
	120	глутамат	аспартат	метионин аланин глутамат

Эксперименты с использованием смеси обочочных аминокислот указывают на то, что характер метаболизма аминокислот в рубцовой среде не является строго определенным и представляют собой сеть метаболических переходов различных аминокислот друг в друга, в другие соединения, а также из свободного состояния в связанное и обратно (таблица 5). Так, сравнительно включения метки из радиоактивного метионина разных активностей (40 и 1 кБк/мл), внесенного в инкубационную среду, в метионин белков микроорганизмов, указывает на возможность того, что именно через метионин углерод скелетов аминокислот и переходит в другие соединения. Это согласуется и со значительным поступлением углерода- $^{14}$  из метионина в липидную фракцию рубцовых микроорганизмов. Подобный процесс происходит и в

Таблица 5

Обнаруживаемые при автораддиографии пятна радиоактивных аминокислот белковых гидролизатов проб содержащего рубца, инкубированных 120 минут в присутствии смеси  $\gamma$ - $^{14}\text{C}$  аминокислот без и с добавленным нитрата или нитрита натрия,  $n = 3$

Группа животных	Добавляемые пометки: субстраты	Характеристика включения метки в аминокислотах
Опытная	Без добавок	Во всех аминокислотах; не обнаруживалась только в аргинине
	Нитрат натрия, 7,5 мг/мл	Во всех аминокислотах; возросло включение в аспарат и глутамат
	Нитрит натрия, 7,5 мг/мл	Во всех аминокислотах; общее уменьшение включения во все аминокислоты; следовое включение в аланин
Контрольная	Без добавок	Во всех аминокислотах; не обнаруживалась только в метионине и треонине; следовое включение в аспарат и глутамат

случае дикарбоновых аминокислот.

Метка радиоактивного углерода из  $\gamma$ - $^{14}\text{C}$  метионина поступала в аланин белков микроорганизмов, по-видимому, через гомоцистеин, цистатионин, кетобутират, сукцинил-КоА, сукцинат, фумарат и аспарат. Это отчасти подтверждается литературными данными [Buttery et al., 1965]. Обращает на себя внимание сравнительно низкая степень дикарбоксилирования этой аминокислоты в рубцовой среде. Метка радиоактивного углерода из  $\gamma$ - $^{14}\text{C}$  метионина поступала, видимо через  $\alpha$ -адонизилметионин, в липиды (6346-6921 импульсов/мин/1 мг).

Опыты с меченой кетоглутаровой кислотой показали, что в микроорганизмах рубцового содержимого осуществляется путь перехода из кетоглутаровой кислоты в глутаминовую кислоту.

Данные о том, что радиоактивный углерод из  $\text{C}^{14}$ -пиридино-гидроксида натрия не обнаруживается в аминокислотах белков рубцовых микроорганизмов, в том числе и в опытах с разрушенными ультразвуком микроорганизмами, говорят о том, что парует утилизируется ранее для других целей.

Метка радиоактивного углерода из глюкозы, включаясь в сухую безлипидную массу рубцовых микроорганизмов (11957-15755 имп/мин/1 мг), не обнаруживается в аминокислотах белков микроорганизмов. Это согласуется с данными литературы [Allison, 1969] и свидетельствует о преимущественном использовании углеродного скелета глюкозы для построения элементов клеточных стенок микроорганизмов.

Различные изучавшиеся нами экзогенные субстраты оказывали определенное влияние на метаболизм свободных аминокислот в содержимом рубца, однако значительных отклонений обнаружить не удавалось. Что касается влияния нитрата и нитрита натрия, то оно особенно выявлялось в опытах *in vitro*. Так, внесение в инкубационную среду нитрата или нитрита натрия замедляло декарбоксилирование глутаминовой кислоты (соответственно в 2,7 и 3 раза). По отношению к аспарагиновой кислоте, наоборот, происходило усиление выделения  $\text{I}^4\text{CO}_2$  (соответственно в 2,4 и 1,5 раза) с одновременным прекращением обнаружения метки радиоактивного углерода в глицине и серине (см. таблицу 4). Это, видимо, объясняется тем, что изменяется преобладающий метаболический путь преобразования аспарагиновой кислоты. Особенно следует отметить воздействие уже на 0,5-1 минуте инкубации, что свидетельствует о быстром проникновении этих соединений в микроорганизмы и воздействии их на быстротекающие процессы микробного метаболизма (см. таблицы 4,5).

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что микробная экосистема рубца крупного рогатого скота функционирует в колебательном режиме, что выражается в следующем: уровень фонда свободных аминокислот рубцового содержимого постоянно изменяется не только в течение времени между кормлениями, но и в течение более длительных промежутков времени. Уровень концентрации отдельных аминокислот внутри фонда изменяется в значительной мере независимо от остальных аминокислот, постоянно и по-разному изменяются суммарные концентрации свободных заменимых и незаменимых аминокислот и их соотношение. У отдельных животных вышеописанные колебания имеют индивидуальный характер.

2. Установлено, что процесс декарбоксилирования свободного

аланина в рубцовой жидкости протекает весьма медленно. Установлено также, что аммонийный азот, поступающий в рубцовую среду, и свободные аминокислоты конкурируют между собой в качестве субстратов биосинтеза микробных белков; при этом аминокислоты являются более предпочтительными.

3. Получены данные о метаболизме отдельных свободных аминокислот в рубцовой среде бычков: показана возможность функционирования в смешанной популяции рубцовых микроорганизмов метаболических путей от  $\alpha$ -кетоглутаровой до глутаминовой кислоты; от аланина до глицина и серина; от метионина до аланина.

4. Установлено, что в процессе метаболизма белков рубцовых микроорганизмов происходят постоянные взаимопревращения аминокислот и их переходы из белков в фонд свободных аминокислот и обратно. Выход атомов углерода из этого циклического процесса осуществляется не столько через декарбоксилирование всех аминокислот, сколько через некоторые из них - метионин и глутаминовую кислоту.

5. Выяснено, что углеродный скелет экзогенной глюкозы в условиях проведенных опытов не используется для синтеза аминокислот микроорганизмами рубца, но активно участвует в построении элементов клеточных стенок бактерий.

6. Установлено значительное воздействие поступающих в рубец нитратов и нитритов на фонд свободных аминокислот рубцовой среды и, следовательно, на метаболизм рубцовых микроорганизмов. Так, показано, что поступление в рубцовую среду экзогенных нитрата или нитрита натрия приводит к изменению путей преобразования свободных дикарбоновых аминокислот. Выявлено, что нитрат и нитрит оказывают влияние на рубцовую микрофлору практически немедленно после поступления в рубец; установлено, что экзогенный нитрит натрия оказывает более сильное воздействие на метаболизм рубцовых микроорганизмов, чем нитрат натрия. При кратковременном (2-3 суток) поступлении в рубец отмечалось увеличение уровня фонда, усиление использования составляющих его свободных аминокислот для биосинтеза микробного белка. При длительном же воздействии нитрата (47-48 дней), наоборот, наблюдалось снижение уровня фонда свободных аминокислот рубцовой среды, уменьшение его использования для синтеза белков микроорганизмами.

Установлено, что метаболизм свободных незаменимых аминокислот рубцового содержимого в целом заметно более устойчив к воздействию экзогенных нитрата и нитрита натрия, чем таковой заменимых аминокислот.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

При организации кормления жвачных животных, с использованием кормов, содержащих нитраты (в дозе, обеспечивающей их поступление в организм на уровне 10 г на 100 кг живой массы в сутки), с целью уменьшения вредного воздействия нитратов на биосинтез белка в рубце жвачных животных, следует периодически, но по возможности часто, исключать из рационов нитратсодержащие корма.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гизоль С.А., Валишевский И.П. Сравнительное исследование скорости включения метки из глицина, глюкозы, сернистого натрия и мочевины в белки микроорганизмов рубца//Тез. докл. 6-й конференции молодых ученых-биологов "Биологические аспекты повышения продуктивности животных и растений". - Рига, 1984. - С.39-40.
2. Гизоль С.А., Пупин И.Г., Гривул Т.П. Интенсивность превращения  $\gamma$ - $^{14}\text{C}$  пирувата и  $\text{glu-}^{14}\text{C}$  глюкозы с накоплением метки в клетках микроорганизмов рубцовой ассоциации и образованием  $^{14}\text{CO}_2$ // Научн.-техн.бюлл.УНИИ физиологии и биохимии с.-х. животных. - 1987. - В.9(1). - С.25-27.
3. Гизоль С.А., Пупин И.Г. Влияние нитрата и нитрита на концентрацию свободных аминокислот в содержимом рубца// Научн.-техн.бюлл.УНИИ физиологии и биохимии с.-х. животных. - 1987. - В.9(2). - С.28-30.
4. Гизоль С.А., Пупин И.Г. Методика количественного определения свободных аминокислот в содержимом рубца крупного рогатого скота//Научн.-техн.бюлл.УНИИ физиологии и биохимии с.-х. животных. - 1988. - В.10(1). - С.28-29.
5. Гизоль С.А., Пупин И.Г. Влияние нитрата натрия на использование свободных аминокислот для синтеза белков рубцовых микроорганизмов//Научн.-техн.бюлл.УНИИ физиологии и биохимии с.-х. животных. - 1988. - В.10(3). - С.31-32.
6. Гизоль С.А. Использование смеси  $\text{glu-}^{14}\text{C}$  аминокислот микроорганизмами содержимого рубца при воздействии нитрат-нитритной формы азота//Тез. докл. VII Всес. симпозиума "Канцерогенные и нитрозосоединения и их предшественники - образование и определение в окружающей среде. 24-25 апреля 1990 г.". - Таллинн, 1990. - С.151-152.

Подписано к печ. 30.03.92. Формат 60×84<sup>1/16</sup>. Печать офсет. Бумага офсет.  
Усл. п. л. 0,93. Усл. кр.-отт. 1,17. Уч.-изд. л. 0,8. Тираж 100 экз. Зак. 2499.  
Бесплатно.

---

Областная книжная типография, 290000, Львов, ул. Стефаника, 11.

467318

Бесплатно

АВ 25.650

A large, stylized handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.A small, illegible handwritten mark or signature in blue ink located in the bottom right corner of the page.