

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

УДК 576.8;577.15.07/08;577.151

**Войтик
Олександр Аркадійович**

**ПЕРЕТВОРЕННЯ ФОРМАТУ І ЙОГО ВПЛИВ НА
ОКРЕМІ МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ В РУБЦІ**

03.00.04 - біохімія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

ЛЬВІВ - 1995

АВ 32,954

Робота виконана в лабораторії обміну речовин Інституту фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук.

Науковий керівник - доктор біологічних наук, професор
КАЛАЧЮК ГРИГОРІЙ ІВАНОВИЧ
Науковий консультант - кандидат біологічних наук,
РОМАНИШНА ЛЮДМИЛА МИХАЙЛІВНА

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук, професор
І. І. РОЗГОНІ
- доктор біологічних наук, професор
Л. І. СОЛОГУВ

Провідна установа - Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАНУ

Захист дисертації відбудеться "10" жовтня 1995 року
о 12 год на засіданні спеціалізованої ради при Інституті
фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук.

Адреса інституту: 290034, м. Львів-34,
вул. В. Стуса, 38

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології і біохімії тварин УААН.

Автореферат розісланий "0" вересня 1995 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
доктор с.- г. наук



Я. І. КИРИЛІВ

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00779424 (X)

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

Загальна характеристика роботи

АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ. Питанням інтермедіарного метаболізму макроорганізму-господаря та метаболізму у мікробіальній екосистемі передшлунків тварин присвячено чимало робіт. Однак, ще недостатньо уваги було приділено вивченню впливу тих чи інших інтермедіатів бродіння на метаболізм мікроорганізмів рубця жуйних.

До одних із важливих інтермедіатів, що утворюються і перетворюються в рубці належить мурашина кислота. Маючи особливу структуру, зокрема наявність альдегідної і карбоксильної групи при одному атомі вуглецю, ця сполука надзвичайно активно вступає в біохімічні реакції (Масу J.M. et al., 1986). Перетворення форміату тісним чином пов'язане із обміном амінокислот, нуклеотидів, ініціацією білкового синтезу. Так, більшість бактерійних клітин при розщепленні пірувату до ацетил-S-CoA, з якого синтезується АТФ, утворюють у середовищі форміат (Allais J.J. et al., 1983). В анаеробних умовах при дисиміляційному відновленні нітратів до нітритів форміат служить донором електронів (Kondratjeva E.N., 1979). Мурашина кислота крім його окисних перетворень включається в різні метаболічні шляхи, ковалентно зв'язуючись із тетрагідрофолієвою кислотою, яка приймає участь у білковому синтезі (Гулий М.Ф., Мельничук Д.О., 1973). Разом із аспарагіновою кислотою, глутаміном, гліцином і CO₂ форміат приймає участь у формуванні пуринового кільця (Mohu W.W., Tiedje J.M., 1990). І взагалі трудно назвати процес, у якому б не приймав участі форміат. Поряд з цим відомі мікроорганізмами, які використовують одновуглецеві сполуки, здатні будувати всі компоненти клітини із них і отримувати необхідну енергію за рахунок їх окислення (Krumholz L.R., Bryant M.P., 1986).

Відомо, що основну роль у рубцевому метаболізмі відіграють бактерії. В передшлунках жуйних розвиваються, в основному, анаеробні бактерії. Між всіма видами мікроорганізмів існує симбіотичний зв'язок. Так, наприклад між лактатпродукуючими і лактатутилізуєчими видами. Активний розвиток одних видів може стимулювати або пригнічувати ріст і розвиток інших. Крім того при зброкуванні бактеріями простих цукрів, в якості кінцевих продуктів з'являються молочна, оцтова, пропіонова кислоти та інші речовини-інтермедіати, які служать субстратами для інших видів рубцевих бактерій (Stewart C.S. and Bryant M.P., 1988).

Судячи з цього актуальність досліджень ролі форміату у метаболізмі рубцевих бактерій не викликає сумніву, оскільки пошук і вивчення біологічно активних речовин, що здатні виконувати пластичні, енергетичні і регуляторні функції, є однією із важливих

проблем сучасної біохімії.

МЕТА ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ. Виходячи із вищесказаного, метою роботи було дослідити метаболізм сумарної фракції рубцевих бактерій та її найхарактерніших представників під впливом формиату. Для досягнення мети вирішувались такі завдання:

- дослідити дію різних концентрацій мурашиної кислоти та її метаболічного попередника - формальдегіду (CH_2O) на метаболічні характеристики змішаної популяції бактерій рубця та чистих штамів - лактатпродукувчого *S. bovis* A024/85 і лактатутилізуючого *M. elsdenii* LC8;
- встановити інтенсивність включення [^{14}C]-формиату та [^{14}C]-формальдегіду у внутрішньоклітинні біополімери чистих штамів та змішаної популяції рубцевих бактерій;
- з'ясувати дію цеоліту на інгібувчі властивості формиату та рівень аміакоутворення рубцевими бактеріями;
- визначити дію мурашиної кислоти на активність деяких дегідрогеназ змішаної популяції та чистих штамів бактерій рубця;
- виділити із *M. elsdenii* LC8, очистити та охарактеризувати ензим, що безпосередньо приймає участь у розщепленні мурашиної кислоти - НАД-залежну формиатдегідрогеназу (ФДГ).

НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ. Вперше встановлені межі фізіологічного оптимуму для формиату у бактерійним комплексі і у чистих штамів, які складають 1-9 мМ. З'ясовано вплив зростаючих концентрацій мурашиної кислоти на метаболічні характеристики змішаної популяції бактерій рубця і важливих представників родів *Streptococcus* та *Megasphaera*. Показаний вплив CH_2O на процеси метаболізму змішаної популяції бактерій рубця в присутності цеоліту. Досліджена дія формиату на активність дегідрогеназ чистих штамів та змішаної популяції бактерій рубця. Встановлено особливості включення [^{14}C]-формиату і [^{14}C]-формальдегіду у внутрішньоклітинні біополімери *Streptococcus bovis* A024/85 і *Megasphaera elsdenii* LC8 та загального комплексу рубцевих бактерій. Запропоновано метод виділення і очистки ФДГ із лактатутилізуючого штам *M. elsdenii* LC8. Показано, що K_m ФДГ для формиату складає 23,5 мМ, а для NAD^+ - 0,21 мМ при оптимумі рН 7,0-8,0 і $T_{\text{опт}}$ - 35-40°C.

ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ. Виконана робота дає змогу розширити знання гб біохімії бактерій рубця жуйних. Дано конкретну відповідь щодо межі фізіологічно-оптимальних концентрацій мурашиної кислоти. Це дає змогу передбачати хід бродіння у рубці при застосуванні формиату для консервування поживних речовин та при інших умовах. З метою підвищення ефективності асиміляції амоній-

ного азоту і форміату мікр. організмами рубця рекомендується використання цесолітів.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО РІЧНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ.

1. Рубцеві бактерії використовують мурашину кислоту у концентрації до 9 мМ, як одне з простих і найдоступніших джерел енергії та вуглецю. Однак, починаючи із концентрації 22 мМ, форміат виступає інгібітором метаболічних процесів у рубці. Формальдегід у всіх досліджуваних концентраціях повністю блокує метаболізм бактерій.

2. Із всього [^{14}C]-форміату, що виключився в клітини 74,7 - 98,0% попадає у нуклеїнові кислоти досліджуваних мікробіальних об'єктів.

3. Мурашина кислота у концентрації 11 мМ проявляє неспецифічний вплив на активність окремих дегідрогеназ і гідратаз сумарної фракції і чистих штамів рубцевих бактерій з різними типом бродиння: лактатпродукуєчких (*S. bovis* А024/85) і лактатутилізуючих (*M. elsdenii* LC8).

4. Форміат у рубці розщеплюється до CO_2 і H_2 НАД-залежною форміатдегідрогеназою, що після виділення, очистки і вивчення властивостей виявилась гомодимером з молекулярною масою субодиниць 62 кДа. Її K_m для НАД $^+$ складає 0,21 мМ, а для форміату - 23,5 мМ при $\text{pH}_{\text{опт}} = 7,0-8,0$ і $T_{\text{опт}} = 35-40^\circ\text{C}$.

АПРОВАЦІЯ РОБОТИ ТА ПУБЛІКАЦІЇ. Матеріали роботи представлялись на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), на конференції молодих вчених (Львів, 1992), науково-виробничій конференції (Львів - Оброшино, 1992), на Всеукраїнській конференції з фізіології і біохімії тварин (Львів, 1995) і на щорічних звітах лабораторії обміну речовин (Львів, 1991-1994). По темі дисертації опубліковано 5 статей, 5 тез і методичні рекомендації з науково-практичним обґрунтуванням.

СТРУКТУРА ТА ОБ'ЄМ РОБОТИ. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів, викладу результатів досліджень та їх обговорення, висновків і списку цитованої літератури (263 джерела). Робота викладена на 121 сторінці друкованого тексту, і ілюстрована 29 рисунками та 10 таблицями.

ДЕКЛАРАЦІЯ З ОСОБИСТОГО ВНЕСКУ ДИСЕРТАНТА У РОЗРОБКУ НАУКОВИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.

Всі експериментальні дослідження по темі дисертації проведені автором особисто.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень правила змішана популяція бактерій рубця великої рогатої худоби та два штами рубцевих бактерій: лак-

татпродукующий - *Streptococcus bovis* А0 24/85 і лактатутилізуючий - *Megasphaera elsdenii* LC8.

Змішану популяцію бактерій рубця отримували за Ченгом (Cheng E.W., et al., 1955) і висівали на універсальне середовище М-10. Ростове середовище для вирощування бактерій рубця виготовлялось із дотриманням усіх вимог анаеробіозу. Чисті штами *Streptococcus bovis* і *Megasphaera elsdenii* люб'язно були надані нам колегами із Інституту фізіології тварин Словацької АН (Kosice, Slovakia), Інституту фізіології і генетики Чеської АН (Praha-Uhrineves, Czechia) та Роветського науково-дослідного Інституту (Aberdeen, United Kingdom). Вказані штами вирощувались також н. універсальному середовищі М-10. Але субстратами у даному випадку служили 0,5% глюкоза (Reanal) для *Streptococcus bovis*, і 0,8% лактат Na (Reanal) та 0,3% тіогліколева кислота (Reanal) для *Megasphaera elsdenii*.

В першій серії досліджень середовище для росту змішаної популяції бактерій рубця, розділялось на 5 варіантів: 1 - контрольне (середовище без добавок формиату); 2, 3, 4, і 5 - дослідні, в ростове середовище яких додавали формиат у концентраціях 4,4 мМ; 11 мМ; 22 мМ; 44 мМ відповідно. Змішана популяція бактерій рубця вирощувалась в термостаті в анаеробних умовах при 39°C. На старті та через 4, 6, 8, 10, та 12 годин визначали концентрацію кінцевих метаболітів у культуральному середовищі кожної групи. Досліджували вплив формиату на класичну криву росту (спектрофотометрично при 540нм), загальну концентрацію ЛЖК - паровою дистиляцією (в апараті Маркгама), концентрацію формиату - хімічним методом (Sleet R., Mah R., 1984), концентрацію аміаку - спектрофотометрич. із використанням реактиву Неслера (Калачняк Г.И., и др., 1981), концентрацію молочної кислоти - ензиматично (Hohorst M., 1959) і вміст білків (при 260нм). На старті і через 14, 18, 22, 26 і 30 годин в культуральному середовищі чистих штамів визначали ті ж метаболічні показники, що і для змішаної популяції бактерій рубця за методами, що зазначені вище.

У другій серії досліджень вивчали включення $[^{14}\text{C}]$ -формиату у внутрішньоклітинні біополімери змішаної популяції бактерій рубця і чистих штамів *S.bovis* А024/85 та *M.elsdenii* LC8. Культури вирощували на відповідних середовищах з попереднім впресненням $[^{14}\text{C}]$ -формиату (40 МБк; С.-Петербург, Росія) у всі культури по 17мкКи/100мл ростового середовища. Культури росли до середини експоненціальної фази в анаеробних умовах при 39°C. Клітини кожного із культур збирали центрифугуванням і двічі промивали 20 мМ β -Na-фосфат. ам буфером рН 7,5, отримуючи таким чином відмивну

фракцію. Із зібраних клітин виділяли низькомолекулярні речовини, нуклеїнові кислоти, білки та ліпіди (Roberts R., et al., 1955; Kennell D., 1967). В одержаніх біополімерах, на рідкіному синтетичному лічильнику Rackbeta -1219 (LKB, Sweden) визначали радіоактивність в імпульсах за хвилину.

У третій серії досліджень із бактерій змішаної популяції і чистих штамів *S.bovis* AO 24/85 та *M.elsdenii* LC8 з допомогою механічного руйнування і диференційного центрифугування одержували безклітинний екстракт, попередньо розділивши середовище кожної із культур на два варіанти: 1 - контроль (без форміату) і 2 - дослід (у середовища вносили додатково мурашину кислоту у концентрації 11 мМ). Культури росли в анаеробних умовах при 39°C до середини експоненціальної фази (log-фази). В одержаному безклітинному екстракті вимірювали активність ензимів у всіх трьох культурах, що вирощувались. Визначали активність лактатдегідрогенази (ЛДГ; КФ 1.1.1.27), форміатдегідрогенази (ФДГ; КФ 1.2.1.2), малатдегідрогенази (МДГ; КФ 1.1.1.37), ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42), малік-ензиму (КФ 1.1.1.40), аконітази (КФ 4.2.1.3) і фумарази (КФ 4.2.1.2). Активність перших п'яти ферментів визначали спектрофотометрично при 340 нм і виражали у нМ НАДН (НАДФН) за 1 хв на 1 мг білка (Norgis J.R. and Ribbons, 1971). Фумаразу при 300 нм по зменшенню кількості фумарату у середовищі, а аконітазу - при 240 нм по утворенню в середовищі цис-аконітату (Хяно И. и др., 1982) і виражали в нМ фумарату і цис-аконітату, відповідно, за 1 хв на 1 мг білку. Білок визначали по Lowry O.N. (1951).

Очистку НАД-залежної форміатдегідрогенази із *M.elsdenii* проводили на колонці (2 x 7см) із ДЕАЕ-целюлозою (Reanal). Колонка урівноважувалась трьома об'ємами 50 мМ Na-фосфатного буферу, що містив 0,05 М тіогліколевої кислоти, 0,01 М форміату Na, 1 мМ EDTA, 2мМ солі Мора, 5% гліцерину. Наносили 2,5 мл неочищеного екстракту і у ролі елюента використовували Na-фосфатний буфер pH 7,0 із градієнтом 50 - 200 мМ.

Фракції після іонообмінної хроматографії з найвищою активністю ФДГ об'єднували і наносили на колонку (2 x 37) з Сефадексом G-200 (Pharmacia, Sweden). Колонка зрівноважувалась 10мМ Na-фосфатним буфером pH 7,0, що містив 2 мМ EDTA і 1 мМ тіогліколевої кислоти. Екстракт у кількості 1 мл наносили на колонку. Білки елювались тим же буфером, що використовувався для калібрування. Фракції із ФДГ-активністю об'єднували і діалізували протягом доби проти 5 мМ Na-фосфатного буферу pH 7,0, використовуючи мембрани з порами 3-5 кДа (Serva, FRG). Молекулярну масу ФДГ визначали за допомогою калібрувального набору білків (Pharmacia, Sweden).

Електрофоретичне дослідження хроматографічних фракцій, отриманих під час очистк препарату ФДГ із *M. elsdenii* LC8, проводили на пластинах поліакриламідного гелю (ПААГ) у присутності додецилсульфату натрію (ДДС-Na) згідно методики, запропонованої Laemmli U.K. (1970). Аліквоти тестованих фракцій (50 мкл) ліофільно висушували, розчиняли у буфері для проб (Laemmli U.K., 1970). Електрофоретичне розділення здійснювали на пластинах ПААГ з градієнтом концентрації акриламіду від 10 до 18 %. Білкові фракції виявляли шляхом їх фарбування Кумасі яскраво-блакитним R-250 (Serva, FRG) згідно Zehr B.D. (1989). Надлишок води з гелевих пластинок видаляли поміщаючи їх у концентрований розчин полівінілпіролідону (Ferah, FRG). Після цього гелі висушували при кімнатній температурі протягом доби і фотографували на плівці Мікрат-300 (Свема, Україна). Молекулярну масу білків визначали за допомогою калібривального набору білків (Pharmacia, Sweden).

Для визначення уявних K_m проводили серію вимірювань початкової швидкості реакції в стандартних умовах, змінюючи концентрацію одного із субстратів при насичуючій концентрації іншого. Експериментальні дані обробляли, використовуючи лінеаризоване рівняння за Лайнуївером і Берком (Lineweaver H., Burk D.J., 1934):

$$1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/S + 1/V_{max}, \text{ де}$$

V - початкова швидкість;

S - концентрація субстрату.

Графік будували в подвійних обернених координатах, як описано В.И.Крупяно (1990). При визначенні дії $T^{\circ}C$, чи рН на активність ФДГ використовували температуру у межах 10 -50 $^{\circ}C$ і фосфатний буфер з межами рН 5 -10.

Всі досліді проводили не менше 5 разів, з 2-3 паралелями у кожному варіант.. Кожна точка графіків, наведених на рисунках, відповідає середньому значенню M, розрахованому за результатами 5 вимірювань в одному з декількох однотипних експериментів. Середню похибку m отриманого результату вираховували за величиною середньої квадратичної похибки σ , і порівняння двох мінливих величин проводили на основі показника вірогідності різниці t (критерій Ст'юдента), як описано (Сорін і.Ф., Виноградова Р.П., 1975). Відмінність між величинами вважали достовірною, коли імовірність різниці P була меншою 0.05.

Результати досліджень та їх обговорення

1. Метаболізм змішаної популяції бактерій рубця і штамів *S. bovis* AG24/85 та *M. elsdenii* LC8 за дії форміату.

Додавання мурашиної кислоти у кількості 2% впливає на рН,

пригнічує розмноження мікроорганізмів в рубці і створює умови для активізації протеаз, гідролаз та інших ферментів у травному тракті. В той же час, встановлено (Гульї М.Ф., Силонова Л.В., 1987; Костииковский В.А., Тараканов В.В., 1989), що форміат є звичайним і дуже активним метаболітом рубцевої флори, а також тканинного метаболізму. Проте, нами не виявлено літературних даних по впливу рівних концентрацій CH_2O_2 на метаболізм рубцевих бактерій.

При дослідженні рН і динаміки росту змішаної популяції бактерій рубця (Рис. 1А і 1В), встановлено, що lag-фаза для даної популяції тягнеться на протязі перших 6 годин, а log-фаза продовжується від 6-ої до 10-ої (Рис.1А). Мурашина кислота, внесена у ростове середовище в концентрації 4,4 мМ не викликала достовірні різниці у рості бактерій. На 11 мМ форміаті lag-фаза дещо затягується. А при культивуванні їх із 22 мМ і 44 мМ CH_2O_2 ріст бактерій достовірно інгібується.

На рисунку 1В показано, що в ході росту бактерій початкове рН у середовищі протягом всього росту знижується з 7,0-7,2 до 5,5-5,0. Зміна рівня рН у середовищах із 4,4 мМ і 11 мМ форміатом мало відрізняється від динаміки рН у контролі. А у середовищах із 22 мМ і 44 мМ форміатом достовірно відрізняється від контрольного варіанту.

Динаміка утворення ЛЖК, аміаку, форміату і лактату при рості змішаної популяції бактерій рубця на середовищі із форміатом показана на Рис.1В-Е. Ці дані свідчать, що максимальний рівень продукції аміаку і лактату припадає на 10-12 години і складає 38-40 мг% аміаку і 29-31 мкмоль/мл молочної кислоти. Рівень утворення аміаку на середовищі із 4,4 мМ і 11 мМ CH_2O_2 достовірно не відрізняється від рівня у контролі. Максимум утворення ЛЖК припадає на 10-12 години і складає 38-40 мкмоль/мл, а максимум утворення мурашиної кислоти у контролі приходить на 8-10 години і складає 6-8 мкмоль/мл (Рис.1Д), після чого рівень форміату у середовищі дещо падає. Встановлений факт вказує на те, що мурашина кислота, як кінцевий продукт займає важливе місце у рубці. Але його висока реакційна здатність та інтенсивне перетворення не завжди дає змогу зафіксувати справжній його рівень у рубці. На середовищі з 4,4 мМ і 11 мМ форміатом ще спостерігається збільшення рівня ЛЖК у середовищі, але менше, ніж у контролі (36 і 37 мкмоль/мл відповідно). А при рості бактерій на середовищі із 22 мМ і 44 мМ CH_2O_2 збільшення рівня ЛЖК не спостерігалось зовсім.

Отже, мурашина кислота у концентрації 4,4 і 11 мМ суттєво не впливає на всі досліджувані метаболічні показники при культиву-

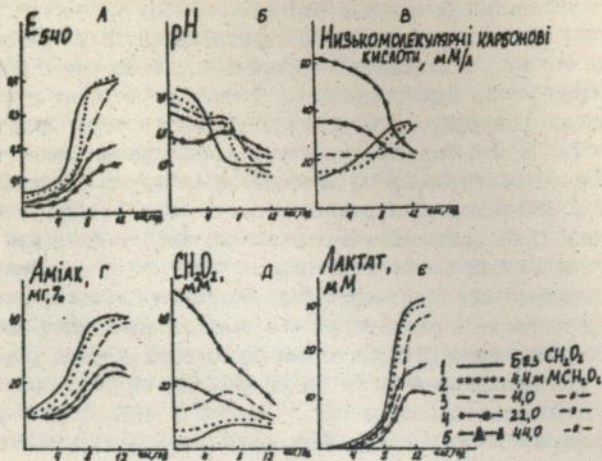


Рис.1. Динаміка росту (А), рН (Б) та утворення кінцевих продуктів метаболізму (В-Е) у бактеріальних комплексах за дії різних концентрацій формиату.

ванні змішаної популяції бактерій рубця. Вищі її концентрації (22 і 44 мМ) достовірно інгібують метаболічні процеси. Разом з тим, нами встановлено, що інгібуюча дія формиату на метаболізм змішаної популяції рубцевих бактерій, а також рівень аміакоутворення знижується в присутності цеоліту.

Ключове значення у рубцевому бродінні відіграють групи лактатпродукуючих і лактатутилізуєчих бактерій (Russell J.B., et al., 1981). Особливо важливу роль вони відіграють при утриманні тварин на специфічній дієті або при певних змінах у рубцевому середовищі (Marounek M., et al., 1989; Russell J.B., 1991). Оскільки яскравими представниками цих груп є *Streptococcus bovis* і *Megasphaera elsdenii*, то метою наступного етапу нашої роботи було дослідити вплив мурашиної кислоти вищевизначених концентрацій на чисті штами цих видів бактерій.

Із даних у сунку 2 і 3 видно, що формиат у нижчих концентраціях (4,4 мМ і 11 мМ) більше впливає на ріст *M.elsdenii* і *S.bovis*, ніж на ріст змішаної популяції бактерій рубця, хоча у вищих концентраціях (22 і 44 мМ) достовірно пригнічує ріст обох штамів, як і бактерій змішаної популяції (Рис.2А,3А). Ці дані не протирічають тому, що вплив мурашиної кислоти на ріст і вихід біомаси досить різниться для окремих видів бактерій (Smogrovicova D., Augustin J., 1987).

Нами показано більший вплив всіх досліджуваних концентрацій

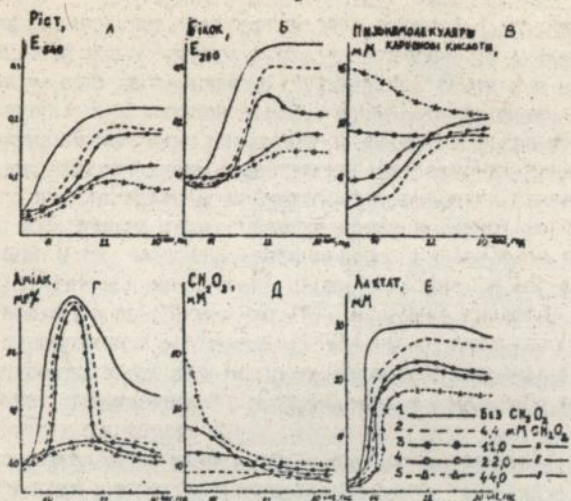


Рис. 2. Динаміка росту (А), біосинтезу білкових компонентів (Б) та утворення кінцевих продуктів метаболізму (В-Е) у *S. bovis* A024/85 за дії різних концентрацій CH_2O_2 .

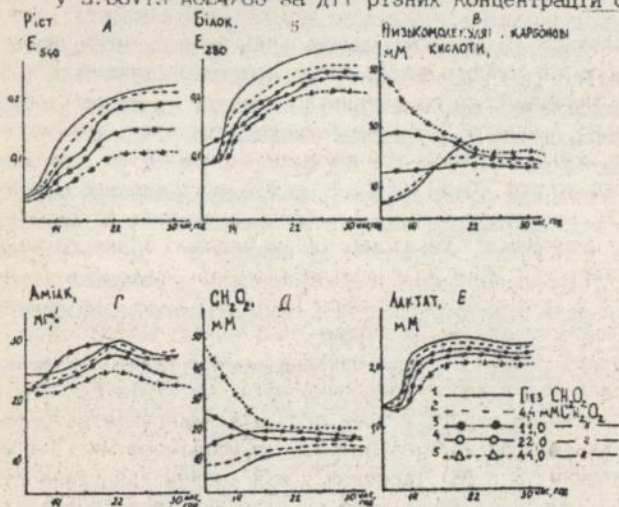


Рис. 3. Динаміка росту (А), біосинтезу білкових компонентів (Б) та утворення кінцевих продуктів метаболізму (В-Е) у *M. elsdenii* LC3 за дії різних концентрацій CH_2O_2 .

форміату на синтез білку у *S.bovis*, ніж у *M.elsdenii* (Рис.2Б,3Б). Хоча показано (Russell J.B., 1991), що інша кислота - ацетат, майже не впливає на швидкість росту і синтез білку *S.bovis*. Відомо (Mágošnek M., et al., 1989), що *M.elsdenii* утилізує лактат швидше, ніж глюкозу. Дійсно, мурашина кислота менш інтенсивно впливає на утворення лактату *M.elsdenii*, ніж на утворення цього ж метаболіту у *S.bovis* (Рис.2Е,3Е). Це, очевидно, пов'язане з тим, що лактат не є характерним продуктом бродіння для *M.elsdenii*, і утворюється його в 10-15 разів менше, ніж при бродінні *S.bovis*. Форміат у високих концентраціях (22 і 44мМ) також значно менше впливав на утворення в середовищі аміаку *M.elsdenii*, ніж на утворення цього кінцевого продукту *S.bovis* (Рис.2Г,3Г). Очевидно, на ферментні процеси, що ведуть до утворення NH_3 у *M.elsdenii* форміат має менший вплив, ніж на ті ж ензими у *S.bovis*. Вплив форміату на решту метаболічних показників обох штамів був однаковим (Рис.2,3).

Слід відмітити, що формальдегід у всіх досліджуваних концентраціях повністю інгібує метаболічні процеси у змішаній популяції бактерій рубця.

2. Висновок [14С]-форміату в клітини бактерій змішаної популяції і рубцевих штамів *S.bovis* А024/85 і *M.elsdenii* LC8.

Раніше було показано (Силонова Н.В., и др., 1979; Boss J.R., 1982), що мітка із [14С]-форміату інтенсивно включається в білкову і ліпідну фракції печінки щурів, в пурина на шляху їх синтезу де ново в нормальних лімфообластах людини.

Нами встановлено (Рис.4 і 5; Табл.1 і 2), що більша частина радіоактивності при рості змішаної популяції бактерій рубця на [14С]-форміаті спостерігається у внутрішньоклітинній фракції (Рис.4), що пов'язано, очевидно, із наявністю у рубці бактерій сімейства *Enterobacteriaceae*, які здійснюють мурашинокисле бродіння. Подібні дані були отримані при інкубації метилотрофних дріжджів (Augustin J., Dercova K., 1987).

Із даних таблиці 1 видно, що найвища радіоактивність знайдена у фракції нуклеїнових кислот при включенні [14С]-форміату (40 505,3 імп/хв·мг). В інші фракції біополімерів [14С]-форміат включається менш інтенсивно, ніж у нуклеїнові кислоти. Так, радіоактивність у пулі низькомолекулярних речовин при включенні [14С]-форміату становить 677,3 імп/хв·мг, у ліпіди і білки 160,9 і 44,25 імп/хв·мг, відповідно.

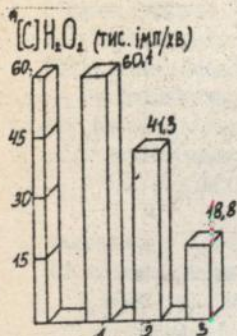


Рис. 4

Рис. 4. Включення $[^{14}\text{C}]$ -форміату у клітини змішаної популяції бактерій рубця: 1- загальна; 2- внутріклітинна і 3- позаклітинна радіоактивність.

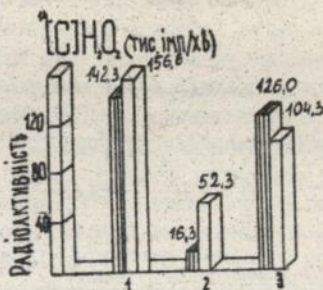


Рис. 5

Рис. 5. Включення $[^{14}\text{C}]$ -форміату у клітину *S. bovis* (■) і *M. elsdenii* (□): 1- загальна; 2- внутріклітинна і 3- позаклітинна радіоактивність.

Таблиця 1. Включення $[^{14}\text{C}]$ -форміату у внутрішньоклітинні біополімери бактеріального комплексу (імп/хв·мг; $M \pm m$; $n = 5$).

Біополімери клітин	Радіоактивність ($[^{14}\text{C}]$ -форміат)
Пул низькомолекулярних речовин	$677,3 \pm 1,02$
Високомолекулярні сполуки:	
Ліпіди	$160,95 \pm 0,25$
Білки	$44,25 \pm 0,1$
Нуклеїнові кислоти	$40505,3 \pm 183,4$

Із даних рисунку 5 видно що радіоактивність є значно вищою у позаклітинних фракціях *S. bovis* і *M. elsdenii*. Це узгоджується з даними J. Augustin, D. Smogricova (1983), де показано, що в дріжджові клітини включається лише 1% вуглецю із $[^{14}\text{C}]$ -форміату. Можна відмітити значно вищу радіоактивність у внутрішньоклітинній фракції *M. elsdenii*, ніж у *S. bovis* (Рис. 5). Це можна пояснити здатністю *M. elsdenii* використовувати деякі органічні кислоти у якості субстратів (Russell J. B., et al., 1981). Цікаво, що найбільшу радіоактивність нами виявлено у фракції нуклеїнових кислот обох

штамів (Табл 2). Іншими авторами (Uchida K., et al., 1982) встановлено, що радіоактивний вуглець включається у 4-те положення піримідину при рості *Saccharomyces cerevisiae* у присутності $[^{14}\text{C}]$ -форміату. Після нуклеїнових кислот, найвища радіоактивність спостерігається у фракції низькомолекулярних речовин (Табл 2). На жаль, нами не було знайдено літературних даних по включенню ^{14}C із одновуглецевих джерел у клітини рубцевих бактерій.

Таблиця 2. Включення $[^{14}\text{C}]$ -форміату у низько- і високомолекулярні сполуки рубцевих штамів *S. bovis* A024/85 і *M. elsdenii* LC8 (M : m; n=5).

Фракції	Р а д і о а к т и в н і с т ь (імп/хв·мг)	
	<i>S. bovis</i> A024/85	<i>M. elsdenii</i> LC8
Пул низькомолекулярних сполук	3 833,0 ± 30,5	6 220,36 ± 60,4
Високомолекулярні сполуки:		
Нуклеїнові кислоти	12 215,95 ± 119,3	45 536,6 ± 432,7
Білки	283,1 ± 2,1	553,4 ± 1,9
Ліпіди	7,86 ± 0,05	46,85 ± 0,3

3. Активність деяких дегідрогеназ і гідратаз рубцевих бактерій за дії форміату.

Для з'ясування впливу мурашиної кислоти (у встановленій раніше концентрації) на процес бродіння у рубці нами було досліджено активність окремих дегідрогеназ цитозольної фракції змішаної популяції бактерій рубця і рубцевих штамів з різними типами бродіння. Результати наших досліджень подані у таблиці 3 і 4. Як видно із представлених даних, мурашина кислота у концентрації (11мМ) достовірно інгібує лактатдегідрогеназну активність (89,0 прот 164,0 нмоль/хв·мг), а отже, інгібує процес розщеплення субстрату до молочної кислоти в змішаній популяції рубцевих бактерій. Разом з тим, така ж концентрація CH_2O_2 суттєво не впливала на активність таких ензимів, як малатдегідрогеназа (92,4 проти 95,6 нмоль/хв·мг) і малік-ензиму (28,0 проти 20,0 нмоль/хв·мг). Активності ізоцитратдегідрогенази і форміатдегідрогенази достовірно підвищувались при рості рубцевих бактерій на середовищі з 11 мМ мурашиної кислоти і відповідно складали 101,9 проти 82,5 нмоль/хв·мг і 89,7 проти 72,3 нмоль/хв·мг. Мурашина кислота биступає, очевидно, у даному випадку індуктором. Цікаво, що актив-

ність фумарази і аконітази, які є високоспецифічними ензимами нам не вдалося виявити, як при рості бактерій без формиату, так і з додаванням його. Взявши до уваги отримані дані можна передбачити, що формиат у досліджуваній концентрації пригнічує ріст у змішаній популяції бактерій рубця лактатпродукуючих видів і не впливає на розвиток бактерій із змішаним типом бродиння, кічцевими про-

Таблиця 3. Активність деяких дегідрогеназ при рості змішаної популяції бактерій рубця на середовищі із формиатом (n=5; M±m).

Е н з и м и (одиниці активності)	Ростове середо- вище без мураши- ної кислоти	Ростове середо- вище + 11мМ му- рашиної кислоти
Лактатдегідрогеназа (нмоль НАДН/хв·мг)	164,0 ± 13,2	89,0 ± 9,4
Малатдегідрогеназа (нмоль НАДН/хв·мг)	95,6 ± 12,2	92,4 ± 14,1
Ізоцитратдегідрогеназа (нмоль НАДФН/хв·мг)	82,5 ± 9,4	101,9 ± 4,7
Форміатдегідрогеназа (нмоль НАДН/хв·мг)	72,3 ± 10,4	89,7 ± 5,4
Малат-фермент (нмоль НАДФН/хв·мг)	20,2 ± 5,4	28,0 ± 5,4
Фумараза	не знайдено	не знайдено
Аконітаза	не знайдено	не знайдено

дуктами якого є сукцинат, ацетат, етанол, CO₂ і H₂.

Активність 5 ключових дегідрогеназ чистих штамів рубцевих бактерій - лактатпродукуючого (*S. bovis* AQ24/85) і лактатутилізу-
ючого (*M. elsdenii* LC8) представлена у таблиці 4. Із даних табли-
ці видно, що активність деяких ензимів цих штамів суттєво різ-
няться. Внесення у ростове середовище 11 мМ формиату достовірно
підвищує активність ЛДГ у *S. bovis* (Табл.4), що потребує додатко-
вого вивчення. Можна передбачати, що проходить обернена реакція
від лактату до пірувату, яку каталізує також ЛДГ. Мурашина кисло-
та у досліджуваній концентрації (11 мМ) виступала у якості інгі-
бітора для ФДГ у *S. bovis* і підвищувала активність цього ензиму у
M. elsdenii (Табл.4). Цей факт може бути причиною того, що формиат
у вищезгаданій концентрації найбільш пригнічував ріст якраз *S.*
bovis. Достовірне зниження активності аконітази, малатдегідроген-
ази і незначне ПДГ вказує на інгібування формиатом окремих ді-
лянок циклу Кребса, що ведуть до утворення оксалоацетату. Натомі-
сть спостерігається активування обхідних реакцій, що каталізу-
ються фумаразою (активність якої достовірно підвищується) та ма-
лік-ензимом і приводять також до оксалоацетату через піруват. А
оксалоацетат у свою чергу має змогу включатися в анаболічні реак-

Таблиця 4. Активність цитоплазматичних ензимів рубцевих штамів *S. bovis*
і *M. elsdenii* за дії формиату ($M \pm m$; $n=5$).

Ензими (одиниці активності)	<i>S. bovis</i> A024/85		<i>M. elsdenii</i> LC8	
	Ростове середо вище (контроль)	Ростове середо вище+11мМСН ₂ О ₂	Ростове середо вище (контроль)	Ростове середо вище+11мМСН ₂ О ₂
Лактатдегідрогеназа (нмоль НАДН /хв·мг білку)	799,3 ± 35,4	2037,4 ± 208,0*	1068,0 ± 141,0	630,9 ± 105,4*
Форміатдегідрогеназа (нмоль НАДН/хв·мг білку)	82,4 ± 7,5	37,5 ± 4,2 *	61,5 ± 12,0	75,9 ± 15,2
Аконітаза (нмоль цис-аконітату/хв·мг)	38,0 ± 5,2	12,1 ± 2,0 *	4,6 ± 0,8	3,6 ± 0,5
Ізодитратдегідрогеназа (нмоль НАДФН/хв·мг білку)	67,3 ± 15,4	66,5 ± 12,1	74,2 ± 10,5	81,4 ± 12,2
Фумараза (нмоль фумарату/хв·мг білку)	647,7 ± 71,2	940,4 ± 102,0 *	469,9 ± 50,1	383,8 ± 39,2
L-малатдегідрогеназа (нмоль НАДН/хв·мг білку)	1433,0 ± 43,9	1031,0 ± 94,1 *	494,7 ± 50,1	434,2 ± 42,4
Малік-ензим (нмоль НАДФН/хв·мг білку)	4,6 ± 0,5	5,7 ± 1,0	17,5 ± 5,8	24,0 ± 4,2

Примітка: * - різниця достовірна.

ції. Форміат у введений концентрації пригнічує активність ЛДГ і утворення у *M. elsdenii* лактату, що може вказувати на інгібування реакції шляху Ембдена-Мейєргофа-Парнаса. Недостовірне зменшення активності решти досліджуваних ферментів (крім ПЦДГ і малік-ензиму) свідчить про незначне інгібування процесів, що ведуть до утворення продуктів, які використовуватимуться у анаболічних шляхах.

D. A. Keys, L. McAlister (1990) показали, що при рості дріжджів у різних умовах вміст та активність ПЦДГ і МДГ дуже добре корелюють. Однак нами не було знайдено такої кореляції між цими ферментами ЦТК. Активність МДГ під впливом додаткового (11мМ) форміату знижувалась в обох штаммах що, можливо, пов'язано із накопиченням у середовищі оксалоацетату і зниженням рН середовища (Teixido F., et al., 1985). Активність же ПЦДГ під впливом форміату майже не змінювалась у *S. bovis* і *M. elsdenii*. Цьому міг би сприяти підвищений рівень ацетату. Адже при наявності у середовищі надмірної кількості ацетату проходять регуляторні механізми фосфорилування і дефосфорилування ПЦДГ мікробного походження (Nilimo H. G., 1984).

Отримані дані дають право стверджувати, що форміат у досліджуваній концентрації неспецифічно впливає на ензими мікроорганізмів з різним типом бродиння. А саме: у *S. bovis* під дією форміату відбувається інгібування окремих ділянок циклу Кребса і незначне активування обхідних реакцій. У *M. elsdenii* ж інгібуються ділянки шляху ЕМП і незначно інгібуються процеси анаболізму.

4. Виділення, очистка і фізико-хімічні характеристики НАД-залежної ФДГ із рубцевого штаму *Megasphaera elsdenii* LC8.

Підвищення активності ФДГ (хоч і недостовірне) у *M. elsdenii* під дією 11 мМ форміату вказує про індукування форміатом у даного організму ензиму з недослідженими властивостями. Тому кінцевим етапом нашої роботи було виділити, очистити і дослідити фізико-хімічні характеристики ФДГ із *M. elsdenii*, як ензиму, що безпосередньо приймає участь у перетворенні форміату. Крім того, ФДГ є зручною моделлю для вивчення механізму дегідрогеназних реакцій і широко досліджується, але не для рубцевих бактерій.

Раніше зверталась увага на біохімію і генетику ФДГ анаеробних та аеробних організмів (Алешин А. Е., і др., 1987). Було показано, що форміат для багатьох анаеробних архебактерій і еубактерій є рідко підтримуючим субстратом, додатковим віднозником.

Результати очистки ФДГ із *M. elsdenii* LC8 подані у таблиці 5 і на рисунку 6.

Таблиця 5. Етапи очистки ФДГ із *M. elsdenii* LC8 (од. - нмоль/хв; $M \pm m$; $n = 3$).

Е т а п и	Об'єм, мл	Білок, мг	Заг. акт ФДГ, од/мл	Спец. акт тив. ФДГ, од/мг	Вихід білку, %	Очист. (раз)
Екстракт	5,0 ± 0,13	12,4 ± 0,5	160,9 ± 5,0	65,0 ± 2,0	100,0 ± 6,2	1,0 ±
Іонообмінна хроматографія на DEAE-целюлозі	13,0 ± 0,4	9,1 ± 0,4	128,6 ± 3,9	183,8 ± 5,4	73,4 ± 3,0	2,8 ± 0,1
Гель-фільтрація (сефад. G-200)	7,8 ± 0,2	2,73 ± 0,1	155,0 ± 4,6	442,5 ± 15,4	22,0 ± 0,8	6,8 ± 0,2
Діаліз	7,0 ± 0,3	1,7 ± 0,05	217,5 ± 6,4	810,5 ± 25,6	13,7 ± 0,5	12,5 ± 0,5

Форміатдегідрогеназа елювалася з колонки 113,75 мм буфером, що використовувався для зрівноважування колонки (Рис.6). Білок було очищено в 12,5 раз з виходом 13,7% (Табл.5). Визначення приблизної молекулярної маси нативної ФДГ показано на рисунку 7. Виходячи із калібрувальної прямої, видно, що приблизна молекулярна маса нативної ФДГ складає 134,0 ± 7,2 кДа. Визначення молекулярної маси субодиниць ФДГ із *M. elsdenii* LC8 показано на рисунках 8 і 9. Як видно із даних рисунку 8, залежність електрофоретичної рухливості ряду маркерних білків від \log молекулярної маси в діапазоні 14.4 - 94.0 кДа представляє собою пряму. Величина молекулярної маси субодиниць ФДГ із *M. elsdenii*, що була визначена на основі цієї залежності, складає 62,0 ± 3,0 кДа. Враховуючи дані гель-фільтрації і електрофорезу в ПААГ з ДСН (Рис.9), можна вважати, що ФДГ із *M. elsdenii* LC8 є гомодимером з молекулярною масою субодиниць 62 кДа. Судячи з літературних даних, молекулярна маса ФДГ із *M. elsdenii* найбільш наближається до молекулярної маси ФДГ із *Pichia pastoris* (Allais J.J., et al., 1983).

Встановивши структуру і молекулярну масу досліджуваного ензиму, ми поставили за мету дослідити деякі його фізико-хімічні властивості. Нами знайдено, що температурний оптимум для досліджуваного ферменту знаходиться в межах 35 - 40°C (Рис.10). Це нижче, ніж для метилотрофних дріжджів *Pichia pastoris* (47°C; Allais J.J., 1983). $pH_{\text{оптимум}}$ (Рис.11) є близький до такого, як у метилотрофних дріжджів (Allais J.J., et al., 1983; Izumi Y., et al.,

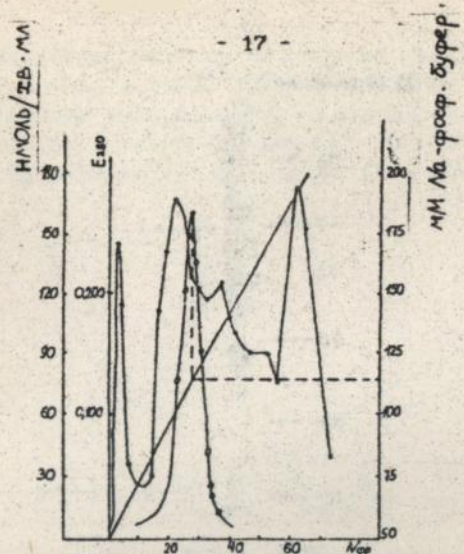


Рис. 6. Профіль елюції ФДГ із колонки з ДЕАЕ-целюлозою: - - - білок (E280); - о - - активність ФДГ (нмоль/хв·мл).

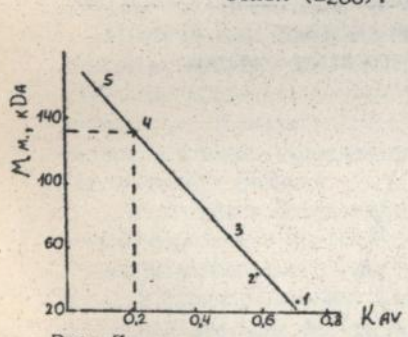


Рис. 7

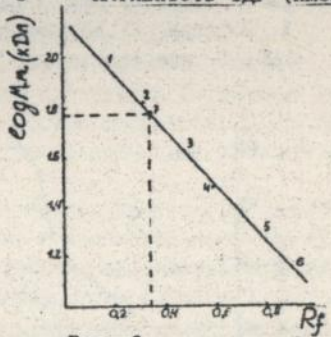


Рис. 8

Рис. 7. Визначення молекулярної маси нативної ФДГ на сефадексі G-200: 1-хімотрипсин (25 кДа); 2-овальбумін (43 кДа); 3-сир. альбумін бичий (67 кДа); 4-досліджуванний білок (134 кДа); 5-альдолаза (154 кДа).

Рис. 8. Визначення молекулярної маси субодиниць ФДГ: 1-фосфорилаза b (94 кДа); 2-альбумін (67 кДа); 3-овальбумін (43 кДа); 4-карбоангідраза (30 кДа); 5-інгібітор трипсину (20,1 кДа); 6- α-лактальбумін (14,4 кДа); 7-молекулярна маса субодиниць ФДГ із M. elsdenii LC8.

ЛІБ ім. В. Стефанива
АН України

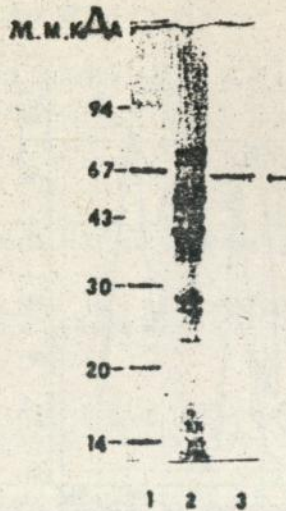


Рис.9. Електрофорез в ПААГ очищеної ФДГ із *M.elsdenii* LC8:
1- маркери; 2- неочищений екстракт із *M.elsdenii* LC8; 3- препарат після 3-го етапу очистки.

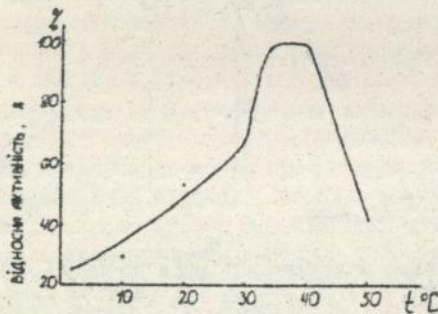


Рис.10. Температурна дія на активність ФДГ із *M.elsdenii*LC8.

1989) та метанолазасвожуючих бактерій (Ламзин В.С., Тишков В.И., 1985) і знаходиться в межах 7,0 - 8,0. Отримані дані про рН і T_{opt} є закономірними, оскільки це є фізіологічно-оптимальні умови для росту організму, з якого виділявся ензим. Однією із ос-

новних характеристик механізму проходження реакції є значення константи Міхаеліса. Методом подвійних обернених координат (за Лайнуївером-Берком) було визначено K_m для ФДГ із *M. elsdenii* (Рис. 12). Вона для формиату складає 23,5 мМ і для НАД^+ - 0,21 мМ. Ці величини K_m наближаються до K_m даних сполук метилотрофних:

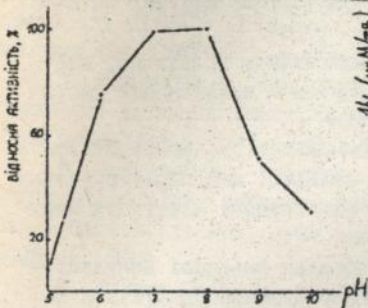


Рис. 11

Рис. 11. Дія pH на активність ФДГ із *M. elsdenii* LC8.

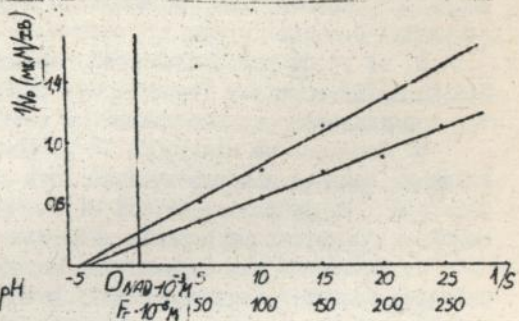


Рис. 12

Рис. 12. Визначення K_m для НАД^+ і формиату в системі обернених координат Лайнуївера-Берка.

дріжджів (Allais J.J., et al., 1983; Устинникова Т.В., и др., 1986). Представлені результати кінетичних досліджень дозволяють вважати, що формиат володіє високою спорідненістю до одержаного ензиму. Отримані величини є характерними для односубстратних дегідрогеназних реакцій.

Таким чином встановлено, що при наявності у ростовому середовищі формиату у фізіологічно-оптимальній концентрації, рубцевим штамом *M. elsdenii* LC8 синтезується НАД^+ -залежна формиатдегідрогеназа із фізико-хімічними властивостями близькими до таких для окремих НАД^+ -залежних ФДГ із метилотрофних дріжджів і метанолокислюючих бактерій.

Висновки

1. Фізіологічний оптимум для формиату у змішаній популяції бактерій і у чистих штамів (*S. bovis* A024/85 і *M. elsdenii* LC8) знаходяться в межах 1-9 мМ.

2. Мурашина кислота, починаючи з концентрації 22 мМ, достовірно інгібує процеси броління у змішаній популяції бактерій рубця та у рубцевих штамів *S. bovis* A024/85 і *M. elsdenii* LC8, тоді як формальдегід у досліджуваних концентраціях повністю блокує метанолізм рубцевих бактерій.

3. 69,0% [^{14}C]-форміату від всієї кількості, що вносились у середовище, включається в клітини бактерій змішаної популяції, але тільки 11% - у клітини *S.bovis* A024/85 і 33% у клітини *M.elsdenii* LC8.

4. Лише 31,4% [^{14}C]-формальдегіду від всієї кількості, що вносились у середовище, включається в бактерійні клітини змішаної популяції бактерій рубця.

5. Із всієї радіоактивності, що включилась в клітини, найбільше [^{14}C]-форміату (74,7-98,0%) знайдено в нуклеїнових кислотах досліджуваних мікробіальних об'єктів.

6. Переважаюча кількість [^{14}C]-формальдегіду, що включився в клітини, попадає в нуклеїнові кислоти змішаної популяції рубцевих бактерій і *M.elsdenii* - 89,0 і 75,0%, відповідно, але у пул низькомолекулярних сполук *S.bovis* - 50,5%.

7. Інгібуєча дія форміату на метаболізм змішаної популяції рубцевих бактерій, а також рівень аміакоутворення знижується в присутності целюліту.

8. Мурашина кислота у концентрації 11 мМ проявляє неспецифічний вплив на активність окремих дегідрогеназ і гідратаз сумарної фракції і чистих штамів рубцевих бактерій з різним типом бродиння: лактатпродукуєчих (*S.bovis* A024/85) і лактатутилізуєчих (*M.elsdenii* LC8).

9. Виділена і очищена ФДГ із *M.elsdenii* LC8 є гомодимером із молекулярною масою субодиниць 62 кДа, K_m цього ензиму для форміату складає 23,5 мМ і для NAD^+ - 0,21 мМ при оптимумі рН 7,0 - 8,0 та температурному оптимумі - 35 - 40°C.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Калачнюк Г.І. та ін. (у співавторстві Войтюк О.А.). Використання целюлітів при вирощуванні і відгодівлі молодняка великої рогатої худоби // Методичні рекомендації з науково-практичним обґрунтуванням. - Львів-1991, 29с.

2. Калачнюк Г.І., Войтюк О.А., Савка О.Г. Метаболізм форміату за дії лактатпродукуєчих і лактатутилізуєчих бактерій рубця // Укр. біохім. журн. - 1994. - 66, №4. - с. 43-51.

3. Калачнюк Г.И., Войтюк А.А., Савка О.Г. и др. Формиат-формальдегидная ингибция метаболизма бактерий рубца и включение [^{14}C]-формиата во внутриклеточные биополимеры // Доклады Россельхозакадемии. - 1993. - №5. - с. 15.

4. Калачнюк Г.И., Войтюк А.А., Савка О.Г. и др. Формальдегидметаболитический оптимум и включение [^{14}C]-формальдегида в рубцовые внутрибактериальные биополимеры // Доклады Россельхозакаде-

ми.-1994.-№2.-с. 31-33.

5. Войтюк О.А., Калачнюк Г.І. Активність форміатдегідрогенази і лактатдегідрогенази рубцевих бактерій за різних умов дезінтеграції//Наук.-тех.бюл. УНДІ ФІБ с-г тварин.-1991.-13(2).-с. 18.

6. Войтюк О.А., Калачнюк Г.І. Динаміка росту бактерій і концентрація білка в рубцевій середовищі під впливом форміату//Наук.-тех.бюл. УНДІ ФІБ с-г тварин.-1992.-14(2).-с. 35.

7. Войтюк О.А., Калачнюк Г.І. Форміатна дія на метаболічну здатність рубцевих бактерій//VI Український біохімічний з'їзд. Тези доповідей.- Київ: УСТА, 1992.-с. 78

8. Войтюк О.А., Калачнюк Г.І. Форміат-формальдегідна модифікація метаболізму рубцевих бактерій//Всеукраїнська конф. з фізіол. і біохім. тварин. Тези доповідей.- Львів (24-25січня), 1995.-с. 30.

9. Войтюк О.А., Калачнюк Г.І. Токсична дія форміату і формальдегіду на метаболізм бактерій рубця//Республіканська наук.-прак.конф. "Проблеми підвищення продуктивності тварин та ефективності їх лікування".- Дніпропетровськ (19-21квітня), 1994.-с.

10. Войтюк О.А., Калачнюк Г.І. Дія різних доз форміату на ріст рубцевих бактерій//Науково-виробнича конф. "Наукове забезпечення агропромислового комплексу західного регіону України в умовах переходу до ринкових відносин".- Львів-Оброшино.-1993, с. 130-131.

11. Войтюк О.А., Калачнюк Г.І. Біохімічна оцінка дезінтеграції рубцевих мікробів//Науково-виробнича конф. "Наукове забезпечення агропромислового комплексу західного регіону України в умовах переходу до ринкових відносин".- Львів-Оброшино.-1993, с.144.

Voityuk O.A.

Formate transformation and his influence on the metabolic processes of rumen bacteria.

Doctoral thesis on specialisation 03.00.04-biochemistry.
Institute of animal physiology and biochemistry of UAAS.
L'viv, 1995.

Summary

It has been shown that formate does not essentially influence on the metabolism mixed population of rumen bacteria and individual strains in the concentrations lower 9mM. Increase of the concentration to 22 and 44mM resulted in reliably activated inhibition of metabolic processes in the bacterial cell. Of the total amount of ¹⁴C-formate included in the cell, the highest

radio-activity was found in the fraction nucleic acids of the all investigated microbial objects. The ammonia formation process and formate inhibition of ruminal bacteria is decreased in presence of zeolite. Formate non specifically influences on the dehydrogenase of the mixed rumen bacteria population, *S.bovis* and *M.elsdenii* strains at the 11 mM formate concentration was. NAD-dependent FDM isolate and purificate from *M.elsdenii* has molecular weight 134 kDa (62x2). K_m of enzyme is 23,5 mM for formate and 0,21 mM for NAD^+ .

Войтик Александр Аркадьевич

Превращение формата и его влияние на метаболические процессы в рубце.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04-биохимия, Институт физиологии и биохимии животных УААН. Львов, 1995.

Резюме

Показано, что формат в концентрации ниже 9мМ существенно не влияет на метаболизм смешанной популяции бактерий рубца и отдельных штаммов. Увеличение его концентрации до 22 и 44 мМ достоверно усиливает ингибирование метаболических процессов в бактериальной клетке. Из всего включившегося в клетку [^{14}C]-формата, наибольшая радиоактивность была найдена во фракции нуклеиновых кислот всех исследуемых микробных объектов. В присутствии цеолита понижается процесс аммиакообразования, а также ингибирование метаболизма бактерий форматом. Обнаружено, что формат в концентрации 11мМ не специфически влияет на дегидрогеназы смешанной популяции рубцовых бактерий, а также штаммов *S.bovis* и *M.elsdenii*. Выделенная из *M.elsdenii* и очищенная НАД-зависимая ФДГ имеет молекулярный вес 134кДа (62x2). Константа Михаэлиса ФДГ для формата составляет 23,5мМ, а для NAD^+ - 0,21мМ.

Ключові слова: Бактерії рубця, метаболізм, формат, [^{14}C]-формат, дегідрогенази, форматдегідрогеназа, *S.bovis*, *M.elsdenii*.

Зам. N 178. Підписано до друку 14.07.1995
Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 1,3. Тираж 120 пр.

Ротапринт Львівської наукової бібліотеки ім. В. Стефаника
НАН України. Львів, вул. Лермонтова, 15

4530111

453944

AB 32.954

AB 32.954