

Maria Wojciechowicz

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN

## Enzymy drobnoustrojów żwaczowych katalizujące rozkład wielkocząsteczkowych składników pokarmowych paszy w żwaczu

### Część VI. Lipidy

#### Rozkład lipidów (tłuszczów) w żwaczu

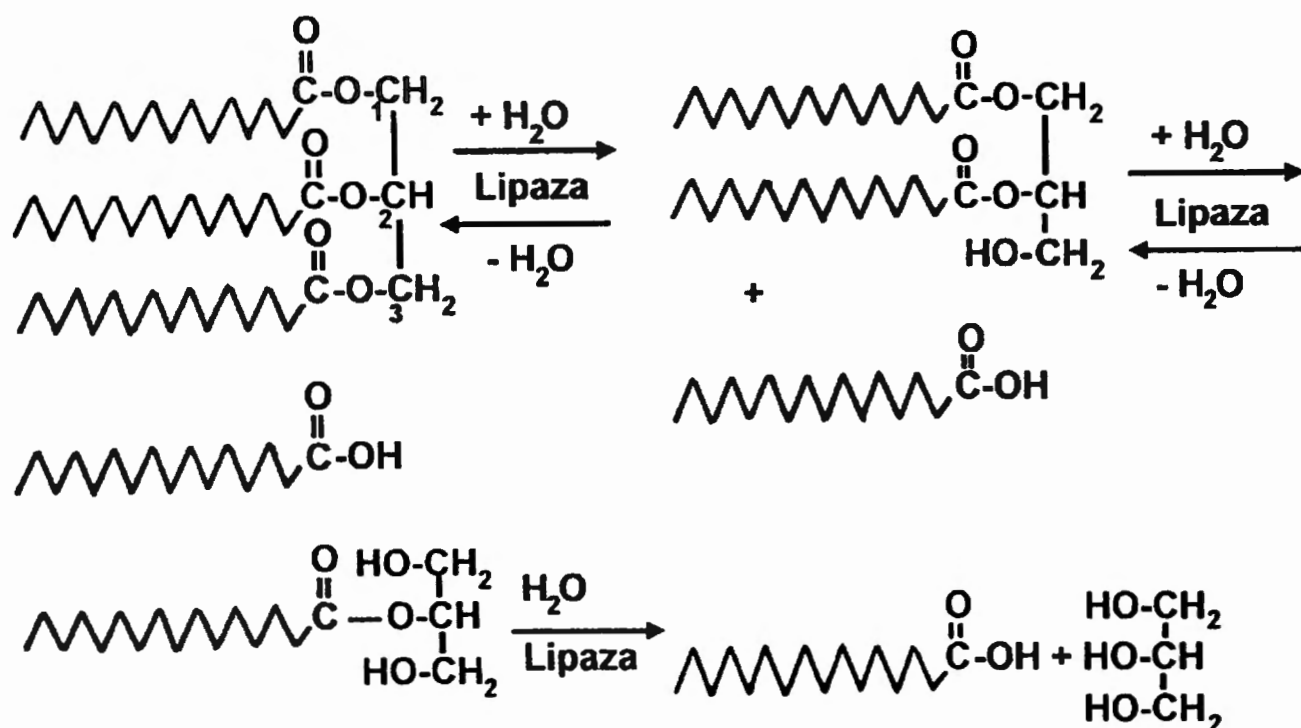
---

Pasze roślinne są ubogie w tłuszcze. Zawartość tłuszczu surowego w sianie łąkowym wynosi 2–3,5% w s.m., w poroście pastwiskowym 2,6–4,5%, w nasionach roślin oleistych 21–45%, a w śrutach poekstrakcyjnych 1–3,5% [44].

Obok lipidów prostych występują w roślinach również lipidy złożone, w formie mono- lub dwugalakto-1,2 dwuglicerydów oraz fosfolipidów. W swym składzie zawierają znaczną ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych  $C_{18}$ , wśród których dominuje kwas linolenowy ( $C_{18} n-3$ ) i linolowy ( $C_{18} n-2$ ) [34]. Zawartość tych kwasów zmniejsza się przy dłuższym przechowywaniu paszy, bowiem po hydrolizie ulegają one dalszemu metabolizmowi — biouwodornianiu — do kwasu stearynowego [9, 10].

Garton i wsp. [19] pierwsi zaobserwowali zjawisko lipolizy w żwaczu. W jednym z doświadczeń wykazali, że zawiesina drobnoustrojów żwaczowych hydrolizuje trójglicerydy. W dalszych badaniach stwierdzono, że przy działaniu płynu żwaczowego następuje wydzielenie się około 90% kwasów tłuszczowych z oleju lnianego i 70% z oliwek [20, 43]. W tym samym czasie Hobson i Mann [31] donieśli o wyizolowaniu lipolitycznego szczepu *Selenomonas ruminantium* var. *lipolytica* ze żwacza krów żywionych paszą wzbogaconą olejem lnianym.

Hydroliza lipidów paszowych jest pierwszym etapem ich metabolizmu w żwaczu. Proces ten w lipidach prostych przebiega stopniowo. Wolne kwasy tłuszczowe ulegają oderwaniu kolejno z pozycji  $C_1$ , następnie  $C_3$  i w końcu  $C_2$  (rys. 1).



Rysunek 1. Hydroliza enzymatyczna lipidów prostych [33]. Lipaza (EC 3.1.1.3)

## Drobnoustroje lipolityczne

Ze żwacza krów żywionych dawkami pasz z dodatkiem oleju lnianego wyizolowano następujące lipolityczne szczepy bakterii: *Anaerovibrio lipolytica*, pałeczki Hobsona i Manna [27, 29, 31, 39], *Butyrivibrio fibrisolvens* [36, 37], *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium vesicum*, *Propionibaacterium reffinosum*, *Propionibacterium jenseni* oraz *Streptococci* [2, 15, 16, 35].

Spośród pierwotniaków poznano aktywność lipolityczną *Epidinium spp. eucaudatum*, *Isotricha prostoma*, *Entodinium simplex* [1, 21].

## Lokalizacja lipazy (EC 3.1.1.3)

W bakteriach wykryto obecność lipazy związanej z komórką i pozakomórkowej, która przechodzi w okresie logarytmicznego wzrostu komórek bakteryjnych do otaczającego środowiska. Oba enzymy wykazują najwyższą aktywność przy optymalnym wzroście bakterii. Lipaza pozakomórkowa, jak stwierdzono ostatnio, łączy się w podłożu z paszą, toteż nie wykrywa się jej w odwirowanym płynie żwaczowym [7, 28, 32, 39]. Henderson [27] zbadał dokładnie lipazę bakterii *Anaerovibrio lipolytica* (szczep 5s).

Enzym ten oczyścił 28-krotnie, stosując wysalanie, adsorpcję na celulozie, ultrafiltrację na Sefadexie G-100 i G-200. Dalsze oczyszczanie przy użyciu DEAE-celulozy i DEAE-sefadexu prowadziło do utraty aktywności. Rozdział za pomocą ultrafirowania i elektroforezy na paskach Oxoidu (octanie celulozy) wykazał obecność dwóch frakcji białkowych. Nie udało się ich wydzielić w skali preparatywnej, toteż nie jest wiadomo, czy obie frakcje mają aktywność lipolityczną. Optymalną aktywność stwierdzono przy pH 7,4 w temp. 20–22°C. Aktywność zwiększał dodatek wapnia i baru, hamował zaś cynk i rtęć oraz sól w dużym stężeniu [27].

## Wpływ różnych czynników na lipolizę w żwaczu

Lipoliza w dużym stopniu zależna jest od rodzaju i składu paszy. Stwierdzono, że zawiesina bakterii i pierwotniaków, wyizolowanych ze żwacza zwierząt żywionych trawą pastwiskową, rozkładała szybko estry niższych kwasów tłuszczowych, natomiast nie rozkładała lipidów o długim łańcuchu. Hill i wsp. [30] wykazali, że płyn żwaczowy zwierząt żywionych zielonką z lucerny cechowała kilkakrotnie większa aktywność lipolityczna w porównaniu z płynem żwaczowym zwierząt żywionych suchą karmą. Istnieją przesłanki wskazujące, że lipoliza w żwaczu jest wypadkową działania enzymów bakteryjnych i roślinnych. Faruque i wsp. [17, 18] badali *in vivo* oraz *in vitro* aktywność lipaz roślinnych trawy pastwiskowej, rajgrasu i koniczyny. Aktywność lipolityczna płynu żwaczowego w czasie od 30 minut do 5 godzin po karmieniu była dwukrotnie większa niż aktywność płynu żwaczowego przed karmieniem. Dowodzi to aktywności lipaz roślinnych, ponieważ w tak krótkim czasie po karmieniu aktywność metaboliczna bakterii jest na ogół słaba, a lipazy roślinne odporne na działanie enzymów proteolitycznych zachowują swoją aktywność w żwaczu do 5 godzin.

Z doniesień innych autorów wynika, że lipazy drobnoustrojowe odgrywają znaczącą rolę w degradacji kompleksu lipidowego paszy, zwłaszcza przy żywieniu przeżuwaczy mieszankami treściwymi, kiedy to wytwarza się populacja bakterii zdolna do rozkładu lipidów bez udziału lipaz roślinnych [14, 27, 28, 31, 32].

Badano rozkład trójglicerydów przez płyn żwaczowy oraz poszczególne jego frakcje. Płyn żwaczowy krów utrzymywanych na dawce pokarmowej z dużą ilością składników objętościowych (H–R) hydrolizował 2,5 razy szybciej trójmaślan glicerolu niż palmitynian, natomiast płyn ze żwacza krów żywionych dawką z małą ilością składników objętościowych (L–R) hydrolizował oba glicerydy 5-krotnie wolniej. Po rozfrakcjonowaniu płynu żwaczowego, frakcja bakteryjna związana z dawką pokarmową (H–R) hydrolizowała trójglicerydy w 87,6%, a (L–H) w 5,8%. Mniejsza aktywność lipolityczna przy dawce drugiej była wynikiem mniejszej liczby szczepów bakterii lipolitycznych [37].

## Optymalne pH działania lipazy

---

Lipaza ze żwacza krów żywionych na pastwisku życią (*Lolium perenne*) i koniczyną białą (*Trifolium repens*) wykazywała maksymalne działanie względem trójmaślanu przy pH 7,0, zaś względem trójoleinianu przy pH 8,0–8,5. Aktywność względem trójmaślanu była 30-krotnie większa niż względem trójoleinianu [17, 18]. Ciebierina i Baškatoва [6] stwierdziły maksymalne działanie lipazy przy pH 7,4.

## Inhibitory i aktywatory lipazy

---

Jony cynku, rtęci, sodu hamują aktywność lipazy, natomiast jony wapnia i baru podwyższają aktywność tego enzymu [6, 27]. Kwas oleinowy wpływa hamująco na wzrost szczepów lipolitycznych. Również mannoza w ilości 0,5% działa hamująco na aktywność lipazy. Obecność antybiotyków, takich jak penicylina G, erytromycyna i tylozyna, obniża aktywność lipazy do 50% [30].

## Galaktolipazy (EC 3.1.1.26)

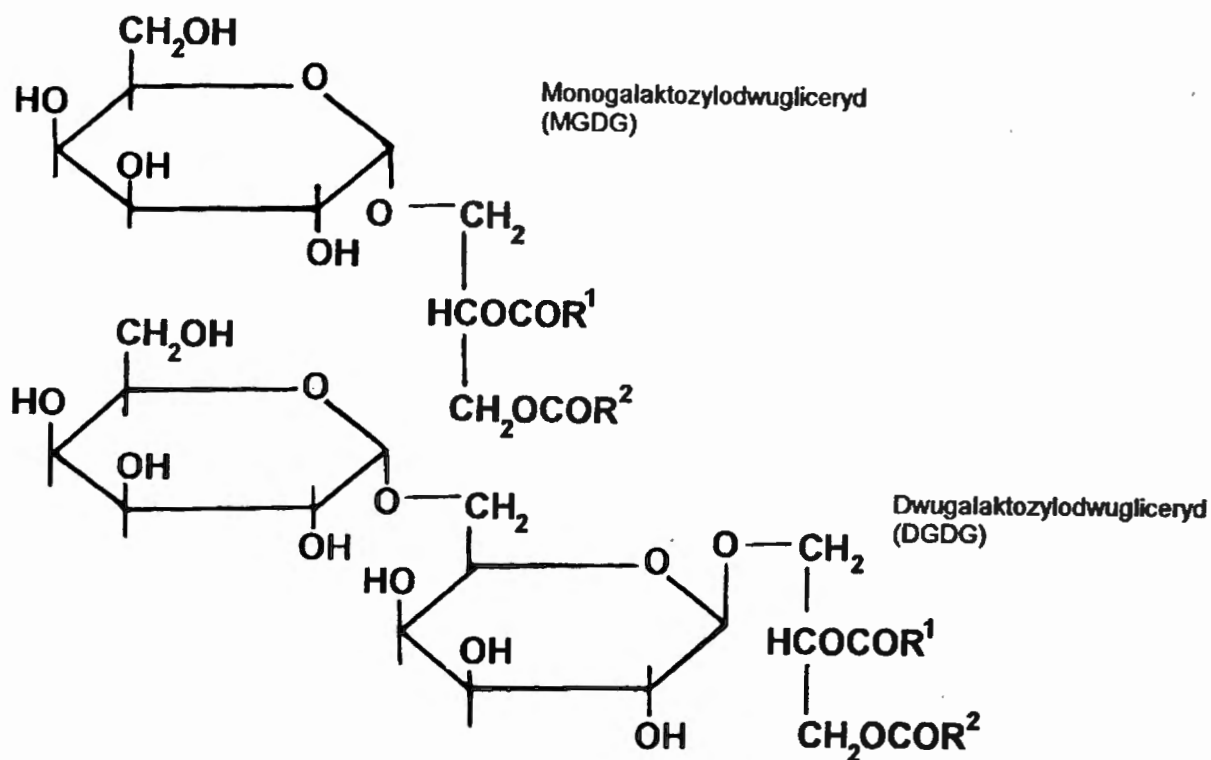
---

Galaktolipazy katalizują uwalnianie kwasów tłuszczowych z galaktolipidów. Wśród galaktolipidów występują monogalaktozydylodwuglicerydy (MGDG) i dwugalaktozydylodwuglicerydy (DGDG) [41] (rys. 3). Według Bailey'a [3] bezkomórkowy ekstrakt bakterii żwaczowych nie uwalnia galaktozy z nienaruszonych galaktolipidów. Proces ten musi poprzedzić lipoliza. Autorzy ci wykazali, że rozpuszczalne ekstrakty z pierwotniaków żwaczowych *Epidinium eucaudatum* zawierają galaktozydazę, uwalniającą galaktozę z roślinnych galaktolipidów bez wstępnej lipolizy [4]. Enzymami uczestniczącymi w rozkładzie mono- i dwugalaktozydylglicerolu są  $\alpha$ - i  $\beta$ -galaktozydazy [3].

Uwalnianie kwasów tłuszczowych z galaktolipidów badano przy użyciu  $C^{14}$ . Homogenat zielonki ryżowej lub koniczyny inkubowano z płynem żwaczowym owiec pozbawionych paszy przez 24 godziny, w celu wyeliminowania enzymów roślinnych [34]. Stwierdzono uwalnianie kwasu tłuszczowego ze znakowanego galaktolipidu. Kiedy ogrzano płyn żwaczowy do oznaczeń, rozkład nie następował, gdyż pod wpływem temperatury ulegała zniszczeniu galaktolipaza drobnoustrojowa [12, 14].

**Galaktolipazy** są enzymami adaptatywnymi tworzącymi się w obecności galaktolipidów (rys.3).

**Fosfolipidy** (fosfatydy) są estrami wyższych kwasów tłuszczowych z fosfoalkoholami i zasadami organicznymi. W czasie hydrolizy rozpadają się na kwasy tłuszczowe

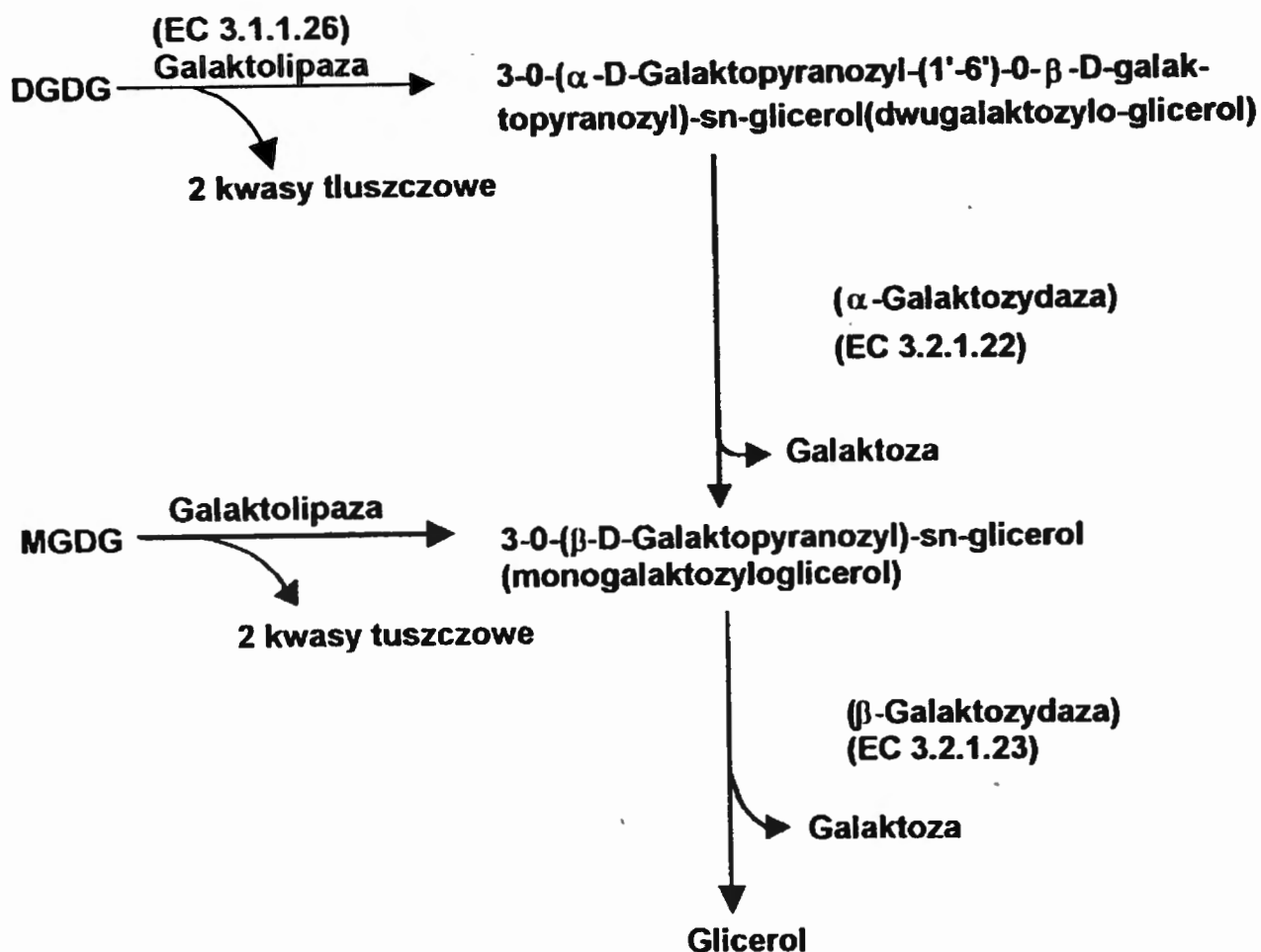


Rysunek 2. Galaktolipidy

we, kwas fosforowy, glicerol lub sfingozyiny i zasady zawierające azot. Są to związki bardzo rozpowszechnione w przyrodzie. Można je znaleźć w każdej tkance roślinnej lub zwierzęcej.

Fosfolipidy ulegają rozkładowi pod działaniem fosfolipaz: A (EC 3.1.1.4), B (EC 3.1.1.5), C (EC 3.1.4.3) i D (EC 3.1.4.4). Fosfolipazy A i B katalizują odszczepianie kwasu tłuszczowego z fosfolipidów, natomiast fosfolipazy C i D katalizują odszczepianie kwasu fosforowego z dwufosfoetanolaminy i fosfoetanolocholiny (rys. 4).

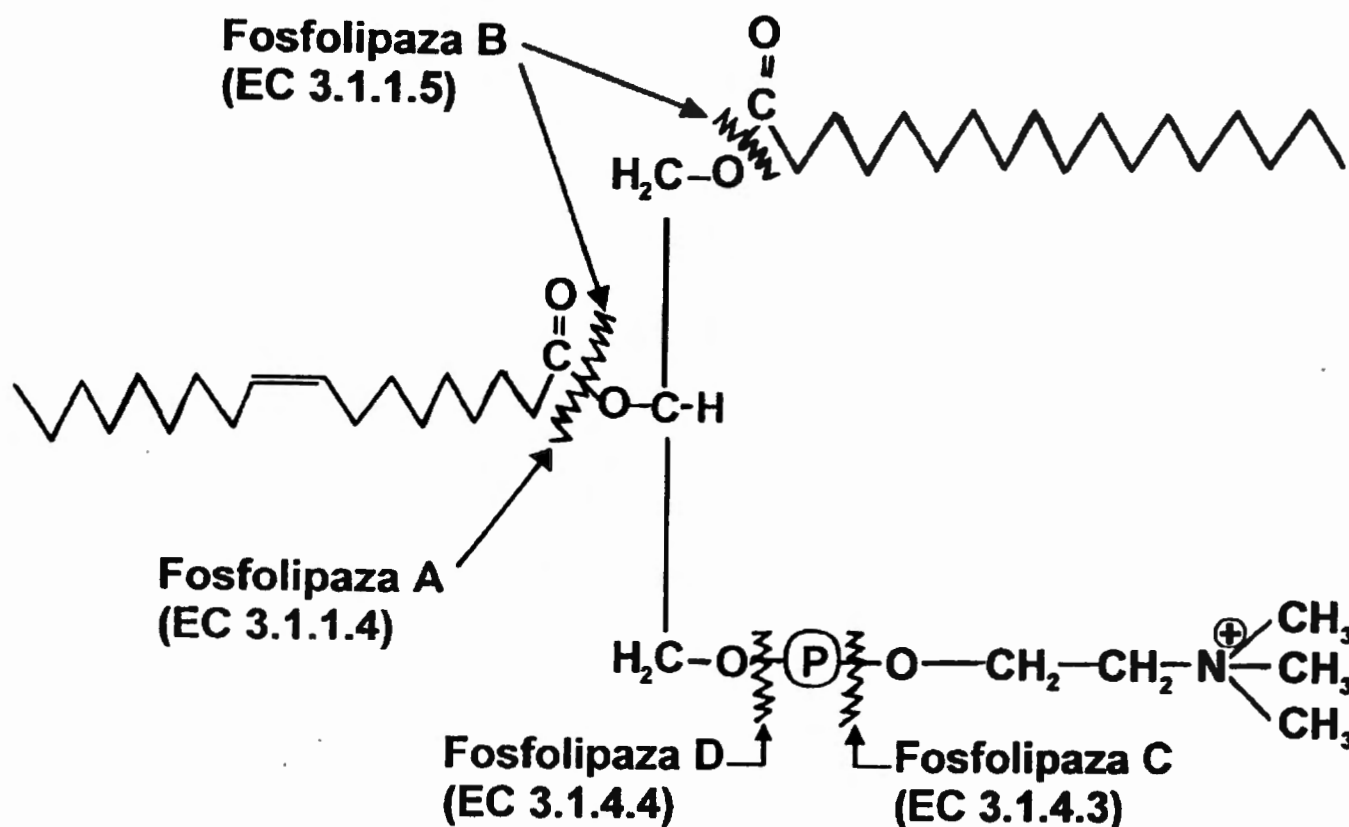
Hazlewood i Dawson [26] przebadali przeszło 200 szczepów bakteryjnych ze zwacza owiec na obecność fosfolipaz. Okazało się, że zaledwie trzy z badanych szczepów wykazywały aktywność względem fosfolipidów. Autorzy określili te szczepy jako *Butyrivibrio fibrisolvens* i *Butyrivibrio S 2*. Fosfolipazy *Butyrivibrio S 2* zawierają mieszaninę fosfolipaz typu A i C. Fosfolipaza *B. fibrisolvens* zawiera



Rysunek 3. Schemat rozkładu galaktolipidów przez galaktolipazy [23]

mieszaninę o aktywności A i B. Optymalne pH działania fosfolipaz *B. fibrisolvens* wynosiło 6,5–7,5. Aktywność stymulowano dodatkiem kwasu oleinowego lub sodowego siarczanu dodecyłu (SDS). Obecność cysteiny w stężeniu  $10^{-2}$  M polepszała aktywność wielokrotnie. Aktywność fosfolipaz A w bakteriach była związana z nienaruszoną komórką, natomiast fosfolipaza C była pozakomórkowa.

Próby izolowania enzymu z komórki przy zastosowaniu różnych metod, jak rozbijanie komórek ultradźwiękami, ekstrakcja butanolem i buforem, pociągały za sobą utratę aktywności. Aktywność fosfolipaz była bardzo zróżnicowana w każdej hodowli, a przechowywanie enzymu w niskiej temperaturze prowadziło do zaniku aktywności [11, 25]. Stwierdzono też niską aktywność supernatantu po odwirowaniu komórek z hodowli. Mogło to być wynikiem rozkładu enzymu przez proteiny [38].



Rysunek 4. Miejsce działania fosfolipaz A,B,C,D [33]

Niewiele jest danych o metabolizmie lipidów przez pierwotniaki żwaczowe. Stwierdzono występowanie fosfolipazy u *Entodinium caudatum* [8]. *Epidinium ecaudatum* może rozłożyć chloroplasty zawierające dużo lipidów w czerwonej koniczynie [21]. Badano również rozkład tłuszczu przy użyciu zawiesiny *Isotricha prostoma*, *I. intestinalis* i *Entodinium simplex* [42].

## Literatura

- [1] Abaza M. A., Abou-Akkada A.R., El-Shazly K. 1975. Effect of rumen protozoa on dietary lipid in sheep. *J. Agric. Sci., Camb.* **85**: 135–143.
- [2] Aliew A.A. 1980. Obmen lipidow w przedżeludkach, lipidnyj obmen i produktywnost' zwačných životnych. Izdat. "Kolos" Moskwa 35–36.
- [3] Bailey R. W. 1962.  $\alpha$ -galactosidase activity of rumen bacteria. *Nature, London* **195**: 79–80.
- [4] Bailey R. W., Howard B. R. 1963. Biochemistry of rumen protozoa. The maltases of *Dasytricha ruminantium*, *Epidinium caudatum* (Crawley) and *Entodinium caudatum*. *Biochem. J.* **86**: 446–452.
- [5] Bailey R. W., Howard B. H. 1963. Carbohydrases in the rumen ciliate *Epidinium ecaudatum* (Crawley)  $\beta$ -galactosidase and isomaltase. *Biochem. J.* **87**: 146–151.
- [6] Ciebierina L. D., Baškatova H. A. 1981. Lipazy gramootricalnych bakterii. *Prik. Biochem. Mikrobiol.* **17**: 191.
- [7] Clarke D. G., Hawke J. C. 1970. Studies on rumen metabolism. VI. In vitro hydrolysis of triglyceride and isolation of a lipolytic fraction. *J. Sci. Food Agric.* **21**: 446–452.

- [8] Coleman G. S., Kemp P., Dawson R. M. C. 1991. The catabolism of phosphatidylethanolamine by the rumen protozoa *Entodinium caudatum* and its conversion into N (carboxylethyl) derivative. *Biochem. J.* **23**: 97–100.
- [9] Czerkawski J. W. 1967. Metabolism of long chain fatty acids in the rumen. EAAP 4-th Symposium on Energy Metabolism. Jabłonna 17-th-24 th September.
- [10] Czerkawski J. W., Blaxter K. L., Wainman F. W. 1966. The metabolic of oleic linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. *Br. J. Nutr.* **20**: 349–362.
- [11] Dawson R. M. C. 1963. On the mechanism of action of phospholipase A. *Biochem. J.* **88**: 414–423.
- [12] Dawson R. M. C., Hemington N. 1974. Digestion of grass lipids and pigments in the sheep rumen. *Br. J. Nutr.* **32**: 327–340.
- [13] Dawson R. M. C., Hemington N. 1974. An inhibitor of phospholipase D in saliva. *Biochem. J.* **143**: 423–430.
- [14] Dawson R. M. C., Hemington N., Hazlewood G. P. 1977. On the role of higher plant and microbial lipases in the ruminal hydrolysis of grass lipids. *Br. J. Nutr.* **38**: 225–232.
- [15] Dolgov I. A. 1979. Vydelenije, kultivirovanije i predielenije aktivnosti lipolitičeskich bakterii rubca žvačnych životnych. *Biul. WNII Fizjol. Biochem. Pitania S-ch. Živ.* **153**: 75–77.
- [16] Dolgov I. A. 1980. Izučeniye lipolitičeskich mikroorganizmov predželudkov u žvačnych životnych, w: Izučeniye lipidnogo obmena u selskochozajstvennych životnych. s. 53. Wyd. UNII Fizjol. Biochem. Pitania S-ch Živ. Borowsk.
- [17] Faruque A. J. M. C., Jarvis B. D. V., Hawke J. C., 1974. Studies on rumen metabolism VIII. Characteristics of lipase in rumen contents, and in the rumen bacteria. *J. Sci. Food Agric.* **25**: 439–449.
- [18] Faruque A. J. M. C., Jarvis B. D. V., Hawke J. C. 1974. Studies on rumen metabolism. IX. Contribution of plant lipases to the release of free fatty acids in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* **25**: 1313–1328.
- [19] Garton G. A., Hobson P. N., Lough A. K. 1958. Lypolysis in the rumen. *Nature*, London **182**: 1511–1512.
- [20] Garton G. A., Lough A. K., Vioque E. 1961. Glycerid hydrolysis and glicerol fermentation by sheep rumen contents. *J. Gen. Microbiol.* **25**: 215–225.
- [21] Gutierrez J., Willams P.P., Davis R. E., Warwick E. J. 1962. Lipid metabolism of rumen ciliates and bacteria. Uptake of fatty acids by *Isotricha prostoma* and *Entodinium simplex*. *Appl. Microbiol.* **10**: 548–551.
- [22] Harfoot C. H., Crouchman M. L., Noble R. C., Moore J. H. 1974. Composition between food particles and rumen bacteria in the uptake of long-chain fatty acids and triglicerydes. *J. Appl. Bacteriol.* **37**: 300–341.
- [23] Hawke J. C. 1973. Lipids. w: Chemistry and Biochemistry of Herbage. 213–363, ed. Butler G. W. Bailey R. W. V. I. Acad. Press, London, New York.
- [24] Hazlewood G. P., Cho K. Y., Dawson R. M. C., Munn E. A. 1983. Subcellular fractionation of the gram negative rumen bacterium *Butyrivibrio S2* by protoplast formation and localisation of lipolytic enzymes in the plasma membrane. *J. Appl. Bacteriol.* **55**: 337–347.
- [25] Hazlewood G. P., Dawson R. M. C. 1975. Isolation and properties of a phospholipids hydrolysing bacterium from ovine rumen fluid. *J. Gen. Microbiol.* **89**: 163–175.
- [26] Hazlewood G. P., Dawson R. M. C. 1979. Characteristic of a lipolytic and fatty acid requiring *Butyrivibrio* sp. isolated from the ovine rumen *J. Gen. Microbiol.* **112**: 15–27.
- [27] Henderson C. 1971. A study of the lipase produced by *Anaerovibrio lipolytica* a rumen bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **65**: 81–89.
- [28] Henderson C., Hobson P. N. 1968. The lipase of a rumen bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **53**, VIII.
- [29] Henderson C., Hodgiss W. 1973. An electromicroscopic study of *Anaerovibrio lipolytica* (strain 5S) and its lipolytic enzyme. *J. Gen. Microbiol.* **76**: 389–393.
- [30] Hill F. D., Saylor J. H., Allen R. S., Jacobson N. L. 1960. In vitro lipolysis by rumen ingesta. *J. Anim. Sci.* **19**: 1266–1270.



- [31] Hobson P. N., Mann S. O. 1961. The isolation of glicerol fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.* **25**: 227–240.
- [32] Hobson P. N., Summers R. 1966. Effect of the growth rate on the lipase activity of a rumen bacterium. *Nature*, London. **209**: 736–737.
- [33] Karlson P. 1971. *Zarys Biochemii*. 269–284, PWN, Warszawa.
- [34] Kates M. 1970. Plant phospholipids and glycolipids. *Adv. Lipid Res.* **8**: 225–255.
- [35] Kolenko E. I., Shishov W. P., Gusin H. H., Dolgov T. A., 1974. Lipidnij obmen u sielsko-choziajstvennyh životnyh. Borovsk, 218.
- [36] Lanz W. W., Williams P. P. 1973. Characterisation of esterases produced by a ruminal bacterium identified as *Butyrivibrio fibrisolvens* (strain 53). *J. Bacteriol.* **113**: 1170–1176.
- [37] Latham M. J., Storry J. E., Sharpe M. E. 1972. Effect of the low roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. *Appl. Microbiol.* **24**: 871–877.
- [38] Mangan J. L. 1972. Quantitative studies on nitrogen metabolism in the bovine rumen. *Br. J. Nutr.* **27**: 261–283.
- [39] Prins R. A., Lankhorst A., van der Meer P., van Nevel C. J. 1975. Some characteristic of *Anaerovibrio lipolytica* a rumen lipolytic organism. *Antonie van Loewenhoek J. Microbiol. Ser.* **41**: 1–11.
- [40] Robertson J. A., Hawke J. C. 1966. Effect of lipids on in vitro and in vivo microbial activity. *J. Sci. Food Agric.* **17**: 241.
- [41] Sastry P. S., Kates M. 1964. Hydrolysis of monogalactosyl and digalactosyl diglycerides by specific enzymes in runner-bean leaves. *Biochemistry*, **3**: 1280–1287.
- [42] Williams P. P., Gutierrez J., Davis R. E. 1963. Lipid metabolism of rumen ciliates and bacteria. II. Uptake of fatty acids and lipid analysis of *Isotricha intestinalis* and rumen bacteria with further information on *Entodinium simplex*. *Appl. Microbiol.* **11**: 260–264.
- [43] Wright D. E. 1961. Bloat in cattle. XX. Lipase activity of rumen microorganisms. *N-Z. J. Agric. Res.* **4**: 215–223.
- [44] Ziotecka A., Kuźdowicz M., Kielanowski J. 1985. Tabele składu chemicznego i wartości pokarmowej pasz krajowych. PWN, Warszawa.