

## PORÓWNANIE METOD OKREŚLANIA KONWERSJI BIAŁKA PASZY NA BIAŁKO MIKROORGANIZMÓW ŻWACZA

*Rajmund Ryś, Jan Kryściak, Anna Antoniewicz*

Zakład Żywienia Zwierząt, Instytut Zootechniki w Krakowie

Kierownik Zakładu: prof. dr R. Ryś

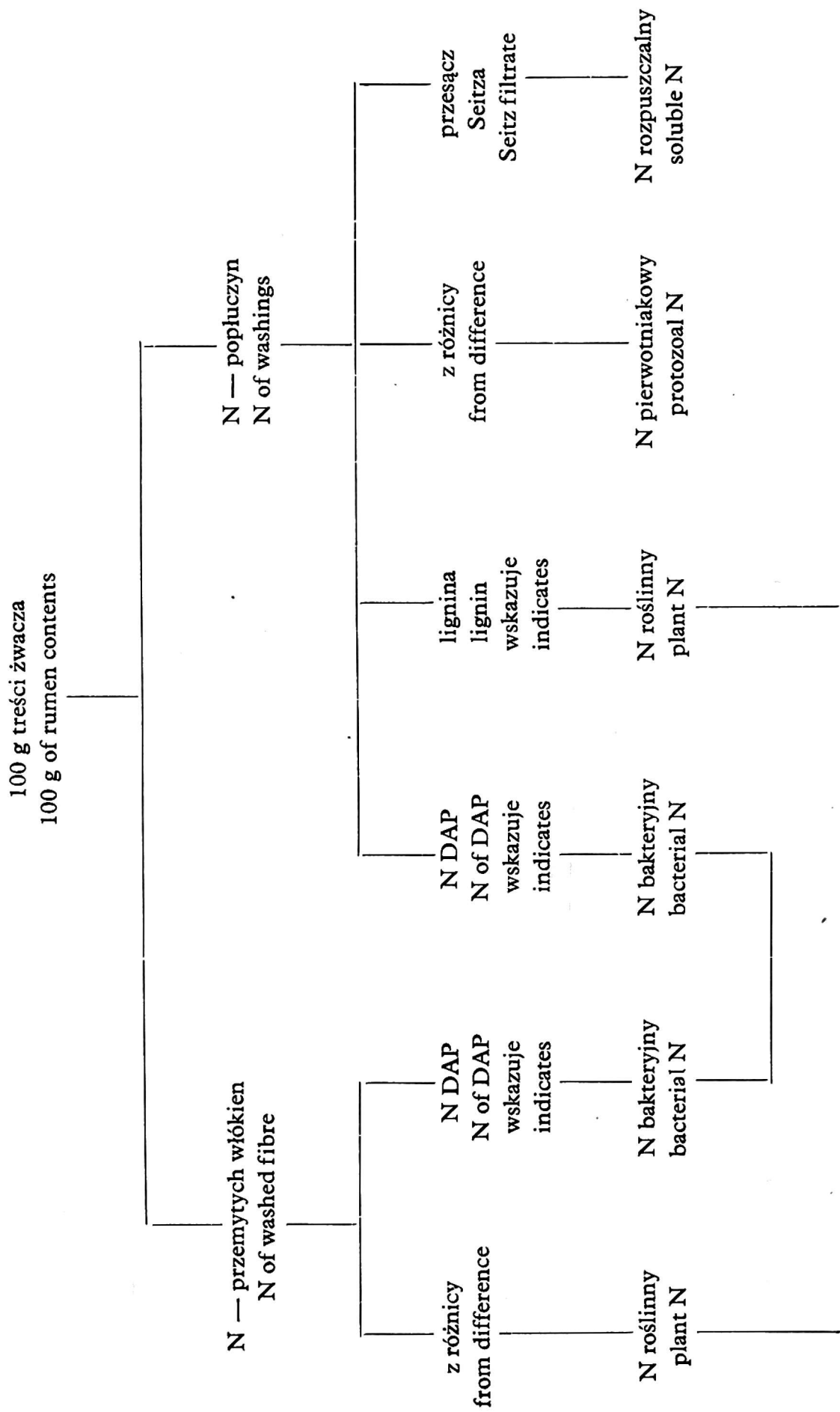
Azot pochodzący z różnych białek może być wykorzystywany bardziej wydajnie, jeżeli białko podaje się owcom wprost do trawieńca z pominięciem żwacza [2, 7, 11]. W żwaczu część białek, po rozłożeniu do prostych połączeń azotowych i amoniaku przenika do krwi i zostaje wydalona z moczem. Część tych połączeń zostaje wykorzystana do budowy mikroorganizmów żwacza, które trawione w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego dostarczają przeżuwaczowi białka. Zwykle substancje azotowe obecne w trawieniu w dużej części pochodzą z drobnoustrojów żwacza. Panuje zgodna opinia, że ok. 50-80% azotu dawki pokarmowej ulega w żwaczu konwersji na białko drobnoustrojów [13]. Zmiany zachodzące w żwaczu są korzystne dla przeżuwacza, jeżeli otrzymuje on w dawce pokarmowej głównie białko gorszej jakości lub niebiałkowe związki azotowe, natomiast są niekorzystne, kiedy zjadane białko jest dobrej jakości. Większość ostatnich badań zmierza w dwóch głównych kierunkach [13]:

- (1) wydajnego i bezpiecznego wykorzystania dawek pokarmowych o dużym udziale połączeń azotowych niebiałkowych,
- (2) zapobieganie w maksymalnych rozmiarach rozkładowi w żwaczu białek dobrej jakości.

Oltjen [10] uważa, że ta część białek pokarmowych, która omija fermentację w żwaczu i przechodzi nienaruszona do trawieńca może mieć duże znaczenie dla polepszenia retencji azotu. Biorąc pod uwagę możliwości jakie istnieją już w chwili obecnej, częściowego wpływania na rozmiary konwersji białka paszy na białko mikroorganizmów żwacza [13], należy baczniejszą uwagę zwrócić na metody określenia tej konwersji.

Istnieje już szereg metod pozwalających określić udział azotu mikroorganizmów czy to w treści żwacza, czy w treści pokarmowej dalszych odcinków przewodu pokarmowego. McDonald [8] oraz Ely i in. [4] wykorzystywali jako wskaźnik rozpuszczalność zeiny w alkoholu.

McDonald i Hall [9] zastosowali zawartość fosforu w kazeinie jako wskaźnik konwersji. McDonald [8] oraz Ely i in. [4] oparli się na różnicy w zawartości lizyny w dawce pokarmowej i w treści dwunastnicy owiec. Templer-Kucharski i Gausséres [15] określali konwersję posługując się



Rys. 1. Schemat rozdziału azotu w poszczególnych frakcjach treści żwacza

Fig. 1. The plane of nitrogen distribution in the respective fractions of rumen content

DNA. Conrad i in. [3] zastosowali jako wskaźnik konwersji szybkość wbudowywania się  $S^{35}$  z połączeń nieorganicznych do białek mikroorganizmów żwacza. Weller, Gray i Pilgrin [19] posłużyli się kwasem dwuaminopimelinowym (DAP), jako wskaźnikiem konwersji.

DAP występuje tylko w bakteriach. Smith i in. [14] zastosowali kwas rybonukleinowy RNA przy określeniu rozmiarów konwersji białka mączki rybnej na białko mikroorganizmów żwacza. Jak wynika z badań Smitha [13] stosunek azotu DNA do azotu ogólnego zmienia się znacznie między różnymi mikroorganizmami. Natomiast RNA reprezentuje bardziej stały stosunek azotu RNA do azotu ogólnego mikroorganizmów żwacza i dlatego może być bardziej odpowiednim wskaźnikiem obecności azotu mikroorganizmów niż azot DNA lub azot ogólnych kwasów nukleinowych. Dokładne jednak porównanie wyników pomiędzy autorami jest niemożliwe, ponieważ posługiwali się oni różnymi metodami badawczymi.

Celem badań było porównanie dwu metod oznaczania rozmiarów konwersji przy stosowaniu różnych dawek pokarmowych.

#### CZEŚĆ METODYCZNA

Doświadczenie przeprowadzono na 2 baranach wagi ok. 60 kg, rasy merynos, z założonymi trwałymi przetokami żwacza. Jeden baran otrzymywał w trzech miesięcznych okresach trzy różne dawki pokarmowe. Drugi w dwóch okresach miesięcznych dwie z trzech dawek pokarmowych (dawkę nisko- i wysokobiałkową z udziałem śruty rzepakowej).

Pierwsza dawka (niskobiałkowa) składała się z 400 g suszu z zielonki, 360 g otrąb pszennych i 1200 g wysłodków buraczanych.

Druga dawka (wyskobiałkowa) składała się z 1200 g suszu z zielonki, 250 g poekstrakcyjnej śruty rzepakowej i 400 g suchych wysłodków buraczanych (o ok. 80% przekraczała zapotrzebowanie na azot).

Trzecia (niskobiałkowa) obejmowała 400 g suszu z zielonek, 150 g śruty rzepakowej i 1200 g suchych wysłodków buraczanych.

Dawki podawano rano jednorazowo w okresie 3 godz. Od czasu odpasu liczono czas pobierania próbek treści żwacza. Z badań Wellera i in. [19] wynika, że w 24 godz. po karmieniu procentowy udział azotu mikroorganizmów i roślinnego w żwaczu układa się podobnie jak w trawieńcu. Dlatego w przedstawionych badaniach ograniczono się jedynie do treści żwacza. Ponadto Weller i in. [18] przeprowadzili swoje badania na owcach, które poddano ubojowi w różnym okresie po karmieniu. W omawianym doświadczeniu, próbki treści żwacza pobierano od żywych owiec w różnym okresie po karmieniu.

Aby wyeliminować wpływ uprzedniego pobrania próbki, w określonym czasie po podaniu takiej samej dawki pokarmowej pobierano w danym dniu próbkę treści żwacza tylko jeden raz, to jest w 3, 7 lub 24 godz.

po odpasie. W celu określenia właściwego stosunku azotu DAP do azotu danej populacji bakterii występującej przy stosowaniu badanej dawki pokarmowej, przygotowywano preparaty bakterii zważa wg wskazań Wellera [17]. Część treści zważa rozdzielono na frakcję tzw. przemytych włókien, frakcję popłuczyn i frakcję rozpuszczalną otrzymaną po przesączeniu przez filter Seitza, według postępowania podanego przez Wellera i in. [18].

#### OZNACZENIA CHEMICZNE

W pełnej treści zważa oznaczano azot ogólny oraz azot RNA metodą Schmidta i Thanhausera w modyfikacji Antoniewicz [1]. Oznaczany fosfor RNA przeliczano na azot kwasów nukleinowych wg zależności Vischera i in. [16]  $P : N = 8 : 15,3$ . W dalszych przeliczeniach przyjęto na podstawie badań Smitha [13], że azot RNA bakterii wraz z pierwotnikami stanowi 11% azotu występującego w tych mikroorganizmach. Pozwalało to na obliczenie azotu pochodzącego z mikroorganizmów zważa, a następnie pozwalało na ustalenie procentowego udziału mikroorganizmów zważa w azocie ogólnym treści zważa.

Azot także oznaczano we frakcji włókien, we frakcji popłuczyn i w przesączu przez filtr Seitza. We frakcji włókien określano azot DAP w celu ustalenia stopnia zanieczyszczenia tej frakcji komórkami bakteryjnymi. DAP oznaczano na automatycznym analizatorze, za pomocą opracowanej przez Kryściaka [6] wybiórczej metody. Podobnie DAP oznaczano we frakcji popłuczyn. Zgodnie ze wskazówkami Wellera i in. [19], w celu określenia stopnia zanieczyszczenia frakcji popłuczyn cząstkami roślinnymi, oznaczano w niej ligninę przy zastosowaniu 72%  $H_2SO_4$ , metodą zastosowaną przez Graya i in. [5]. Ligninę oznaczano także we frakcji przemytych włókien, co pozwoliło na obliczenie stosunku ligniny do azotu w cząstkach roślinnych. Następnie na podstawie ilości ligniny we frakcji popłuczyn można było obliczyć ilość azotu roślinnego. Odejmując od azotu frakcji popłuczyn azot bakteryjny, azot roślinny i azot rozpuszczalny można było obliczyć ilość azotu pierwotniakowego tej frakcji.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Dane w tabeli 1 przedstawiają procentowy udział azotu w poszczególnych frakcjach treści zważa w różnym okresie po karmieniu. Uwzględniają one także różne dawki pokarmowe. Mimo zastosowania w niniejszych badaniach znacznie bardziej urozmaiconych dawek pokarmowych, niż u Wellera i in. [20] oraz mimo, że dla uzyskania materiału do badań zwierząt nie zabijano, lecz badania prowadzono na tych samych zwierzętach pobierając treść zważa przez przetokę, potwierdziła się obser-

Tabela 1

Rozdział azotu (mg/100 g treści żwacza) u barana nr 1 — dawki 1, 2 i 3  
 Distribution of nitrogen (mg/100 g of rumen contents) in sheep No. 1 — diets 1, 2 and 3

Czas (godz.) Time (hours)	Dawka 1 — Diet 1			Dawka 2 — Diet 2			Dawka 3 — Diet 3					
	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
	roślinny plant	bakte- ryjny bacterial	pierwot- niakowy protozoal	rozpusz- czalny soluble	roślinny plant	bakte- ryjny bacterial	pierwot- niakowy protozoal	rozpusz- czalny soluble	roślinny plant	bakte- ryjny bacterial	pierwot- niakowy protozoal	rozpusz- czalny solubl
3	108,6	79,9	20,6	15,0	125,2	66,6	7,9	21,4	186,8	187,7	4,0	11,0
8	112,9	135,2	38,9	9,0	171,8	189,5	29,3	20,7	117,4	192,4	15,4	10,6
20	59,7	91,5	85,8	24,0	69,2	131,9	28,5	28,1	45,9	127,8	21,5	20,4

wowana przez wspomnianych autorów tendencja do obniżania się udziału azotu roślinnego w miarę upływu czasu po karmieniu. Równocześnie obserwuje się wyraźny wzrost azotu pochodzącego z mikroorganizmów zwacza. Przyjmując za Wellerem i in. [20], że procent azotu mikroorganizmów w azocie treści zwacza w 24 godz. po karmieniu kształtuje się podobnie jak w treści trawieńca, przyjmowano, że rozmiary konwersji stanowią procentowy udział azotu mikroorganizmów w treści zwacza pobranej w 24 godz. po karmieniu.

Zgodnie z oczekiwaniem obserwuje się także pewną tendencję do obniżania rozmiarów konwersji w miarę zwiększania udziału białka w dawce pokarmowej — w dawce 2, gdzie udział białka o ok. 80% przewyższał zapotrzebowanie (w dawce 1 i 3 białko pokrywało jedynie

Tabela 2

Procentowy udział azotu w poszczególnych frakcjach treści zwacza w różnych okresach po karmieniu (wg postępowania Wellera, Graya i Pilgrima)

Percentage of nitrogen in respective fractions of rumen content in various time after feeding (procedure of Weller, Gray and Pilgrim)

Czas (godz.) Time (hours)	N roślinny plant	N bakteryjny bacterial	N pierwotniakowy protozoal	N mikroorgan. microbial	N rozpuszczalny soluble
Baran nr 1 — dawka 1 (niskobiałkowa)					
Sheep No. 1 — diet 1 (low protein)					
3	48,4	29,9	14,9	44,8	6,7
8	38,1	46,3	12,6	58,9	3,0
24	23,1	35,9	31,7	67,5	9,3
Baran nr 1 — dawka 2 (wysokobiałkowa — rzepak)					
Sheep 1 — diet 2 (high protein — rape)					
3	56,6	30,1	3,6	33,7	5,0
8	41,7	46,1	7,1	53,2	5,0
24	28,0	49,3	11,4	60,7	11,4
Baran nr 1 — dawka 3 (niskobiałkowa — rzepak)					
Sheep No. 1 — diet 3 (low protein — rape)					
3	47,9	48,2	1,0	49,2	2,8
8	34,9	53,7	4,6	61,9	3,2
24	21,1	59,4	10,0	69,4	9,5
Baran nr 7 — dawka 2 (wysokobiałkowa — rzepak)					
Sheep No. 7 — diet 2 (high protein — rape)					
3	—	—	—	—	—
8	51,2	35,0	8,5	43,5	5,2
24	38,8	48,9	2,2	51,1	9,9
Baran nr 7 — dawka 2 (niskobiałkowa — rzepak)					
Sheep No. — diet 2 (low protein — rape)					
3	—	—	—	—	—
8	34,6	55,4	6,3	61,7	3,7
24	25,1	28,7	34,9	63,6	11,3

zapotrzebowanie). We wszystkich dawkach poziom energii pokrywał zapotrzebowanie.

Porównanie wyników konwersji uzyskanych przy pomocy postępowania wg Wellera i in. [18] z wynikami otrzymanymi w oparciu o zawartość RNA w treści żwacza, przedstawiono w tabeli 3. W przypadku RNA również za podstawę określenia rozmiarów konwersji przyjmowano udział azotu mikroorganizmów w 24 godz. po karmieniu. Odnosząc azot bakteryjny obliczony za pomocą RNA do azotu ogólnego treści żwacza, uznano wyniki konwersji za niskie. Oznaczenie RNA nie dało się przeprowadzić w całości treści żwacza, które zawierało jednak dość dużo części stałych. Oznaczano zatem RNA w przesączu przez gazę, zhomogenizowanej treści żwacza. Części stałe pozostały na gazie i na pewno zatrzymały pewne ilości mikroorganizmów. Jeżeli azot bakteryjny obliczony na podstawie RNA odnoszono do tzw. frakcji popłuczyn, niektóre wyniki były już bardziej zbliżone do wyników uzyskanych metodą Wellera i in. Należy jednak podkreślić, że frakcję popłuczyn otrzymano w inny sposób niż próbki do oznaczania RNA. Dlatego do wyników tych należy podchodzić z dużą ostrożnością. Niestety nie oznaczono przesączu z homogenizatu azotu ogólnego, do którego należałoby odnosić obliczony azot mikroorganizmów. Zostanie to uwzględnione w dalszych badaniach.

Tabela 3

Porównanie rozmiarów konwersji według wskaźników DAP i RNA  
The comparison of conversion extent according to methods of DAP and RNA

Dawka Diet	Baran nr Sheep No.	Metoda DAP	Metoda RNA — Methods of RNA	
		wg Wellera i in. Methods of DAP according to Weller <i>et al.</i>	w stosunku do N-popłuczyn as part of N of washings	w stosunku do N-ogólnego as part of total N
1	1	67,5	60,7	45,0
2	1	60,7	52,5	23,6
3	1	69,4	48,2	35,9
2	7	51,1	77,0	20,6
3	7	63,6	34,0	17,6

Mimo niepowodzenia nie należy rezygnować z prób zastosowania wskaźnika RNA do określenia rozmiarów konwersji, z uwagi na prostsze postępowanie, tym bardziej, że przy określeniu rozmiarów konwersji białka mączki rybnej wskaźnik RNA zdał już egzamin. Na razie jednak wydaje się być najodpowiedniejszą do określania rozmiaru konwersji białka paszy na białko mikroorganizmów metodą zaproponowaną przez Wellera i in. [19].

## LITERATURA

1. Antoniewicz A., (w druku). Oznaczanie kwasów nukleinowych w treści żwacza.
2. Chalmess M. I., Cuthbertson D. P., Syngé R. M., 1954. J. Agric. Sci. 44, 254.
3. Conrad H. R., Miles R. C., Butdorf J., 1967. J. Nutrit. 91, 337.
4. Ely D. G., Little C. O., Woolfolk P. G., Mitchell G. F., 1967. J. Nutrit. 91, 314.
5. Gray F. V., Pilgrim A. F., Weller R. A., 1958. Brit. J. Nutrit. 12, 404.
6. Kryściak J., (w druku). Wybiórcza metoda oznaczania DAP na automatycznym analizatorze aminokwasów.
7. Little C. O., Mitchell G. E., 1967. J. Anim. Sci. 26, 411.
8. McDonald I. W., 1954. Biochem. J. 56, 120.
9. Mc Donald I. W., Hall R. J., 1957. Biochem. J. 67. 400.
10. Oltjen R. R., 1969. J. Anim. Sci. 28, 673.
11. Reis P. J., 1969. Austral. J. Biol. Sci. 22, 745.
12. Schmidt G., Thanhauser S. T., 1945. J. Biol. Chem. 161, 83.
13. Smith R. H., 1969. J. Dairy Res. 36, 313.
14. Smith R. H., McAllan A. B., Hill W. B., 1969. Proc. Nutrit. Soc. 28.
15. Templer-Kucharski A., Gaussères B., 1965. Anns. Anim. Biochim. Biophys. 5, 507.
16. Vischer E., Chargaff E., 1948. J. Biol. Chem. 176, 715.
17. Weller R. N., 1957. Austr. J. Biol. Sci. 10, 384.
18. Weller R. N., Gray F. V., Pilgrim N. F., 1958, Brit. J. Nutrit. 12, 421.
19. Weller R. N., Pilgrim A. F., Gray F. V., 1962. Brit. J. Nutrit. 16, 83.

*P. Рысь, Я. Крысьцак, А. Антоневич*

СРАВНЕНИЕ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНВЕРСИИ КОРМОВЫХ БЕЛКОВ  
В БЕЛКИ МИКРООРГАНИЗМОВ РУБЦА

Резюме

Сравнили два метода определения степени конверсии кормовых белков в белки микроорганизмов рубца. По одному методу показателем конверсии служило количество диаминопимелиновой кислоты (DAP) по другому количество рибонуклеиновой кислоты (RNA) в содержимом рубца. Доказали превосходство метода предложенного Велером, Греем и Пильгримом — с применением (DAP). Этот метод вполне пригоден для прижизненных исследований на фистульных животных.

*R. Ryś, J. Kryściak, A. Antoniewicz*

THE COMPARISON OF THE ESTIMATION METHODS OF DIETARY PROTEIN  
CONVERSION TO THE RUMEN MICROBIAL PROTEIN

Summary

The two methods of estimation of conversion extent of dietary nitrogen to microbial protein in rumen were compared. Diaminopimelic acid (DAP) and ribonucleic acid (RNA) concentrations in rumen content were used as indicators in these two methods. It was shown, that the methods using DAP, proposed by Weller, Gray and Pilgrim, surpasses the RNA method. The DAP method is also appropriate to *in vivo* experiments on rumen-cannulated sheep.