

Maria Wojciechowicz

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN, Jabłonna

Enzymy drobnoustrojów żwaczowych katalizujące rozkład wielkocząsteczkowych składników pokarmowych paszy w żwaczu

Część I. Celuloza

397

Wstęp

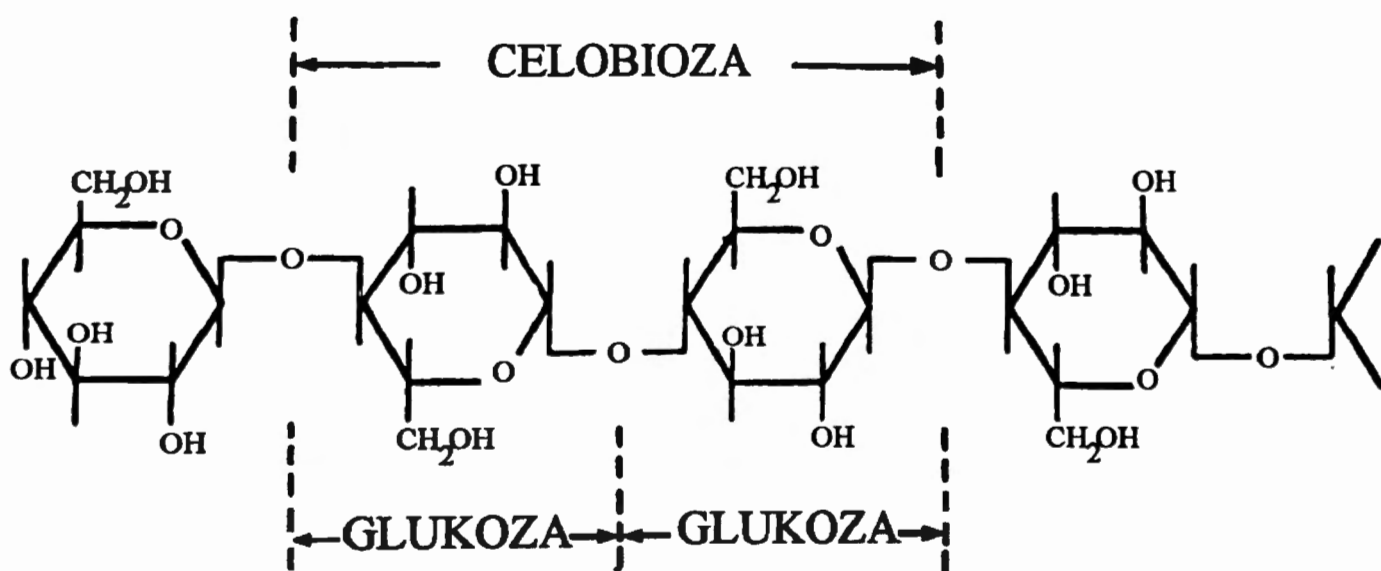
W przewodzie pokarmowym przeżuwaczy znajdują się (obok pasożytów) symbiotyczne drobnoustroje żyjące w żwaczu, które produkują enzymy rozkładające wielkocząsteczkowe związki znajdujące się w paszy, co umożliwia ich wchłanianie. Poza wodą, składnikami mineralnymi i prostymi związkami pasze zawierają wielkocząsteczkowe składniki, jak polisacharydy, białka, lipidy, spełniające rolę materiału energetycznego i budulcowego w organizmie zwierzęcym.

Wcześniejsze badania nad rodzajami drobnoustrojów żwaczowych, prowadzone na żywych komórkach bakteryjnych, ograniczały się głównie do ich izolacji i charakterystyki, określenia ich zapotrzebowania pokarmowego oraz do poznania końcowych produktów ich metabolizmu. Szersza informacja o układach enzymatycznych poszczególnych drobnoustrojów ułatwia interpretację roli bakterii, pierwotniaków i grzybów w rozkładzie składników pokarmowych w przedżołądkach zwierząt żywionych różnymi paszami.

Niniejsze opracowanie stanowi przegląd aktualnej wiedzy o enzymatyce drobnoustrojów żwaczowych i składa się z 6 części (Celuloza, Hemicelulozy, Pektyny, Skrobia, Białko, Lipidy) prezentowanych w tym i kolejnych numerach PNR. Głębsza wiedza z tej dziedziny może przyczynić się do praktycznego jej wykorzystania w żywieniu przeżuwaczy.

Celuloza i jej rozkład

Celuloza jest bardzo znaczną częścią pożywienia zwierząt roślinożernych i jednym z głównych składników tkanki podporowej roślin. W roślinach paszowych celuloza, obok hemicelulozy i częściowo ligniny, wchodzi w skład włókna surowego [132]. Celuloza pod względem chemicznym jest polimerem zbudowanym z jednostek glukozy powiązanych ze sobą β -glukozydowo między węglem C-1 a C-4, tworząc łańcuchy o budowie liniowej, leżące jedno obok drugich. Przeciwnie fragmenty tych łańcuchów połączone są ze sobą wiązaniem wodorowym, tworząc pofałdowane micelle (rys. 1). Wskutek pofałdowania powstają elementarne włókienka (fibryle), spojone ze sobą za pośrednictwem innych składników, jak hemicelulozy, pektyny, ligniny. Badania wykazały wysoki stopień krystaliczności celulozy. Między tymi obszarami występują obszary nieuporządkowane, amorficzne. Im wyższy stosunek obszarów krystalicznych do amorficznych, tym celuloza jest bardziej oporna na działanie enzymów. W najczystszej postaci celuloza występuje w bawełnie (98%).



Rysunek 1. Fragment łańcucha celulozy

Zwierzęta roślinożerne (przeżuwacze) nie trawią celulozy bezpośrednio, a zadanie to spełniają symbiotyczne drobnoustroje bytujące w żwaczu.

Drobnoustroje celulolityczne żwacza

Rozkład celulozy w żwaczu odbywa się przy udziale różnego typu drobnoustrojów, jak bakterie, pierwotniaki i grzyby. Do najlepiej poznanych bakterii celulolitycznych, którym przypisuje się rolę wiodącą w rozkładzie celulozy w żwaczu, należą: *Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes* [49, 64 73,], *Ruminococcus albus* [76, 164],

Ruminococcus flavefaciens [121, 122, 123, 134]. Stwierdzono również właściwości celulolityczne u *Bacteroides cellulosolvens* [106, 148], *Clostridium cellobioparus* i *Butyrivibrio fibrisolvens* [147]. Wyizolowano także z płynu żwaczowego nowy szczep *Micromonospora ruminantium*, który traci swoje właściwości celulolityczne w hodowli bez płynu żwaczowego. Szczep ten hodowany na cukrach prostych odzyskuje właściwości celulolityczne po 6–8 pasażach na pożywce celulozowej [99].

Wśród pierwotniaków najwyższą aktywność wykazywały: *Eudiplodinium maggii*, *Epidinium ecaudatum* vr. *caudatum*, *Ostracodinium obtusum bilobum*, *Enoloplastron trilocatum*, *Diplodinium affine*, *Diplodinium monocanthum* [10, 33, 40, 41, 74].

W ostatnim piętnastoleciu stwierdzono w płynie żwaczowym występowanie beztlenowych grzybów, *Phycomycetes*, stanowiących około 8% masy drobnoustrojów. Wśród grzybów stwierdzono obecność *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas* (SM-1) *communis* i *Sphaermonas* (NM-1) *communis* [30, 116, 117]. Poza wymienionymi grzybami ostatnio zidentyfikowano w żwaczu nowe szczepy: *Neocallimastix joyonii* oraz *Anaeromyces mucronatus* nov. gen. [23].

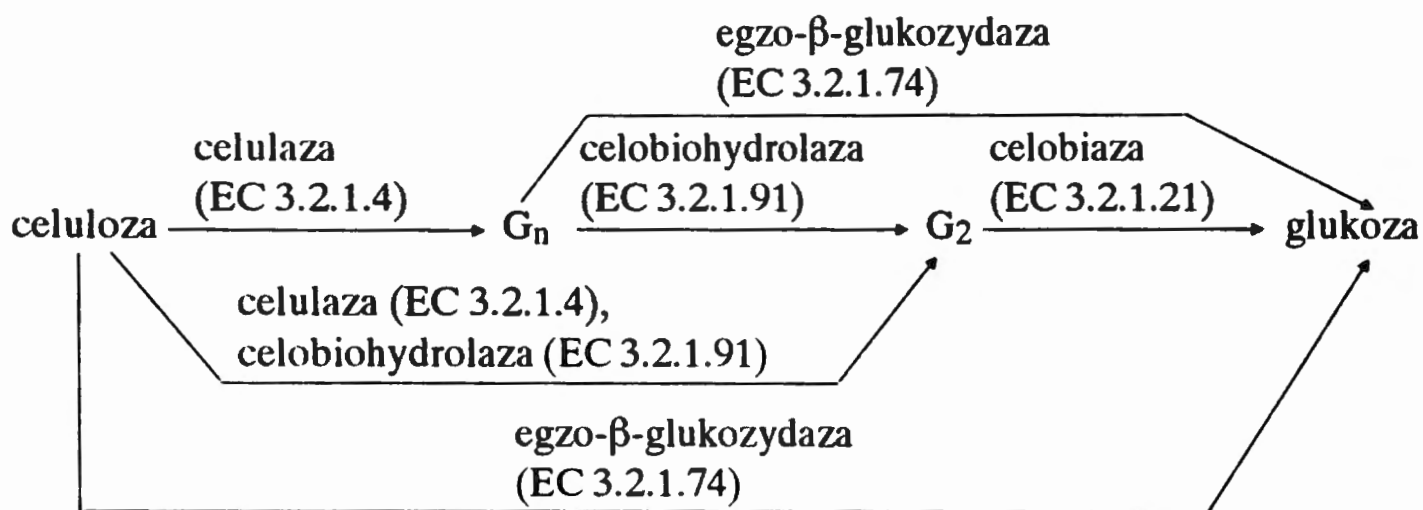
Enzymy celulolityczne

Większość informacji o enzymach celulolitycznych uzyskano z prac nad celulazami grzybowymi [18, 131, 159]. Pierwotnie określano enzymy symbolami C_1 i C_x [127]. Obecnie uważa się, że enzymy celulolityczne obejmują cztery typy hydrolaz tworzących kompleks, w którym ich synergistyczne działanie umożliwia rozkład celulozy do glukozy.

Według obecnej nomenklatury, zatwierdzonej przez Unię Biochemiczną (1992), są to:

1. Celuloza (endo 1,4- β -glukanaza; EC 3.2.1.4)*.
Enzym ten katalizuje rozkład celulozy od ośrodka łańcucha [11, 113].
2. β -glukozydaza (celobiaza; EC 3.2.1.21). Katalizuje rozkład celobiozy do glukozy [18, 128, 150].
3. Glukan — 1-4- β -glukozydaza (egzo 1,4- β -glukozydaza; EC 3.2.1.7) Katalizuje rozkład celulozy i celoligomerów do glukozy [54, 109].
4. Celulaza — 1,4- β -celobiozydaza (egzo-celobiohydrolaza; EC 3.2.1.91). Katalizuje rozkład celulozy i celooligomerów do celobiozy [159].

*Enzyme nomenclature (Recommendations — 1992) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Published for the International Union of UBMB by Acad. Ps Press, Inc.



G_n — oligocelulozy

G_2 — celobioza

Rysunek 2. Działanie enzymów celulolitycznych na celulozę (wg Klosova [54])

Tabela 1. Enzymy celulolityczne występujące u bardziej poznanych drobnoustrojów żwaczowych

Enzym	<i>B. succinogenes</i>	<i>R. albus</i>	<i>R. flavefaciens</i>	Pierwotniaki	Grzyby
Celulaza (EC 3.2.1.4)	+	+	+	+	+
Celobiaza (EC 3.2.1.21)	+	+			+
Egzo-β-glukozydaza (EC 3.2.1.74)	+				
Celobiohydrolaza (EC 3.2.1.91)	+	+			+

Właściwości żwaczowych drobnoustrojów celulolitycznych

W ostatnich latach przystąpiono do bardziej szczegółowego badania drobnoustrojów celulolitycznych pod względem ich przyczepności do cząstek roślin, lokalizacji i rodzaju wytwarzanych enzymów [85]. Drobnoustroje w żwaczu skupiają się wokół cząstek paszy i, jak wykazały badania mikroskopowe (mikroskop skanningowy), przyłączone są do fragmentów roślinnych. Przyleganie ich do powierzchni jest niezbędne, a stopień przyczepności zależy od fizycznych i chemicznych warunków panujących w żwaczu, rodzaju rośliny i drobnoustrojów [1, 2, 26]. Z trzech celulolitycznych szczepów bakteryjnych, hodowanych na lucernie, *B. succinogenes* (S85) wykazywał większą zdolność przylegania do tkanki roślinnej (65,6%) niż *R. albus* (41,9%) i *R. flavefaciens* FDL (33,9%) [103, 104].

Badano szybkość rozkładu w żwaczu przez bakterie celulolityczne z hodowli aksenicznej, wyizolowanych z traw mesofilu i epidermis oraz włókna. Okazało się, że mesofil i epiderma uległy całkowitemu rozkładowi w ciągu 12 godzin, natomiast

zsignifikowane włókno było rozłożone w 40% [29]. Stwierdzono również, że ze wzrostem zawartości zboża w dawce pokarmowej liczba *B. succinogenes* i *R. albus* malała, a *B. fibrisolvans* zwiększała się [149]. Stosowanie w żywieniu zwierząt małowartościowej paszy objętościowej zwiększa różnice w stężeniu i aktywności enzymów [71].

Wykazano, że część enzymów celulolitycznych związana z powierzchnią błony komórkowej bakterii przechodzi do otaczającego podłoża. Nie następuje to w wyniku lizy komórek, jak wcześniej sądzono, lecz raczej wskutek przechodzenia pewnych fragmentów z powierzchni komórek do podłoża bez naruszenia samej komórki [65, 137].

Bakterie

Komórki *B. succinogenes* przyczepiają się do celulozy wzdłuż włókien. Po usunięciu bakterii z powierzchni włókien pozostają na nich widoczne wyraźne wgłębienia na skutek nadtrawienia włókienek [26, 104]. Rolę przyczepną komórki do włókien celulozy spełniają pęcherzyki wytwarzane na komórkach. Na nich zgromadzona jest celulaza (EC 3.2.1.4), która wraz z fragmentami błony pęcherzyków nienaruszonej komórki przechodzi do otaczającego podłoża. Badania wykazały, że aktywność tego enzymu związana jest w 50–61% z sedymentującymi fragmentami błony, w 9–13% z nie sedymentującymi składnikami o m.cz. powyżej 4×10^6 i w 28–38% z niskocząsteczkowymi składnikami [49, 50, 65, 133]. Celulaza rozkłada napęczniałą w kwasie fosforowym celulozę, włókna bawełny, proszek celulozowy i Avicel (zmielona mikrokryształiczna celuloza) [46, 48, 66]. Częściowo oczyszczona celuloza ma optimum działania przy pH 5,6–6,6 i temp. 50°C. *B. succinogenes* wytwarza również β -glukozydazę (EC 3.2.1.21) [64]. *B. succinogenes* jest głównym celulolitycznym szczepem w żwaczu zwierząt otrzymujących paszę z dodatkiem monenzinu [49].

R. albus wytwarza kompleks enzymów celulolitycznych występujących na powierzchni komórki, a nie — jak wcześniej sądzono — wewnątrz komórki bakteryjnej oraz enzymy przechodzące do środowiska [52, 80, 164].

W zależności od warunków hodowli względna wielkość cząsteczki enzymu może być różna. Wysokocząsteczkowy enzym uzyskano podczas hodowli bakterii na pożywce zawierającej płyn żwaczowy (30%) i celobiozę jako źródło energii. Po zastąpieniu celobiozy celulożą uzyskano po siedmiodniowej hodowli enzym niskocząsteczkowy, o m.cz. około 30.000. Również w hodowli bez płynu żwaczowego wytwarzany był enzym niskocząsteczkowy [91, 92, 161]. *R. albus*, jak wykazały badania, wytwarza celulazę (EC 3.2.1.4), β -glukozydazę (EC 3.2.1.21), egzocelobiozydazę (EC 3.2.1.91) i egzo 1,4- β -glukozydazę (EC 3.2.1.74).

Celulaza związana jest z powierzchnią komórki bakteryjnej [160, 161]. Wytrząsanie *R. albus* z wodą lub buforem fosforanowym powoduje uwalnianie się enzymu

ze ścianek komórek. Enzym ten występuje w formie agregatu dysocjującego na fragmenty o m.c. 25 000–30 000. Oczyszczona celulaza ma m.c. 50 000, optimum działania przy pH 6,8 i temp. poniżej 50°C w ciągu 10 min, nie powoduje to utraty aktywności enzymu. Enzym ten ulega nieznacznej aktywacji pod wpływem 2-merkaptoetanolu, 1,4DTT, glutationu i chlorowodoru cysteiny przy stężeniu 1 mM. Jony miedzi, cynku, żelaza i rtęci obniżają aktywność w znaczny sposób. Odczynniki takie, jak p-chlorortęciobenzoesan i N-metylomaleimid wyraźnie hamują aktywność, co wskazywałoby na obecność grupy tiolowej w cząsteczce enzymu. Podobny wpływ tych czynników stwierdzono przy badaniu egzo-1,4- β -cellobiozydazy (EC 3.2.1.91) i egzo-1,4- β -glukozydazy (EC 3.2.1.74) [108]. Celulaza *R. albus* różni się od celulazy *Clostridium* i *Trichoderma* tym, że rozkłada celulozę do fragmentów powyżej pentaazy, nierozpuszczalnych w wodzie. Enzym ten różni się od celulazy badanej przez innych autorów tym, że katalizuje rozkład celulozy napęczniałej w kwasie fosforowym do dużej ilości celotriozy i małej celotetraozy [111, 160].

R. albus wytwarza również β -glukozydazę (EC 3.2.1.21). Enzym ten katalizuje rozkład celobiozy, celotriozy, celotetraozy i celopentazy oraz p-nitrofenylo-glukozydu do glukozy z nieredukującego końca łańcucha. Jest on związany z komórką i łatwo się z niej uwalnia przez zamrażanie i odmrażanie komórki. Metodą filtracji na żelu oznaczono jego masę cząsteczkową, wynoszącą 80 000. Stwierdzono maksymalną aktywność przy pH 6,5 w temp. 30–35°C. Inkubacja enzymu przy pH 6,8 przez 10 min nie wpływa na zmianę początkowej aktywności w temperaturze poniżej 30°C, natomiast podwyższenie temperatury do 37°C powoduje spadek aktywności o 2% w ciągu godziny. Kationy takie, jak wapń, kobalt, magnez wywierają słaby wpływ przy stężeniu 1 mM, podczas gdy jony rtęci, miedzi i cynku wyraźnie obniżają aktywność podobnie jak odczynniki sulfhydrolowe (p-chlorortęciobenzoesan i jodoacetamid) [111].

Enzym — 1-4- β -glukozydaza (EC 3.2.1.74) katalizuje rozkład p-nitro-fenylo- β -glukozydu, a także celooligomerów, celobiozy, celotriozy, celotetraozy i celopentazy do glukozy z nieredukującego końca cząsteczki. Masa cząsteczkowa wynosi 82 000. Enzym zachowuje aktywność przy pH 6,8 przez 10 min przy 30°C, a traci 20% aktywności przy 37°C. Optymalną aktywność stwierdzono przy pH 6,5 w temp. 30–35°C [110].

Egzo-1-4- β -celobiohydrolaza (EC 3.2.1.91) *R. albus* przechodzi do podłoża po zakończeniu wzrostu komórek. Enzym ten wyizolowano z płynu pohodowlanego i oczyszczono. Masa cząsteczki oznaczona metodą elektroforezy na żelu wynosiła 100 000, a w nieobecności siarczanu dodecylo-sodowego (SDS) 200 000, co wskazywało, że enzym ten jest dimerem składającym się z dwóch polipeptydów o maksymalnej aktywności przy pH 6,8 i temp. 37°C. Zakres aktywności enzymu mieści się w granicach pH 5,5–8,0, a jej spadek następuje przy temperaturze powyżej 37°C. Wapń, kobalt i magnez wywierają nieznaczny wpływ, podczas gdy cynk i miedź wyraźnie obniżają aktywność enzymu. Odczynniki redukujące takie, jak merkaptoe-

tanol, ditiotriitol i glutation aktywują nieznacznie enzym, natomiast odczynniki sulfhydrylowe (chlorortęciobenzoesan i jodoacetamid) silnie ją hamują, co wskazywało by na obecność w enzymie grupy tiolowej [109, 112].

R. flavefaciens wiąże się z powierzchnią włókna roślinnego w miejscach występowania polisacharydów, toteż przyleganie do powierzchni nie jest regularne i nie pozostawia śladów w miejscach przyczepu [87]. Komórki *R. flavefaciens* atakują nabłonek i tylko przypuszczalnie dlatego, że szczep ten wytwarza ksylanazę i pektynoliazę, które to enzymy ułatwiają swoim działaniem dostęp do celulozy [86, 122, 123]. Badania nad rodzajem enzymów celulolitycznych z *R. flavefaciens* wykazały obecność celulazy (EC 3.2.1.4), związanej z komórką, oraz pozakomórkowej egzo-1,4- β -celobiohydrolazy (EC 3.2.1.91) [57, 121]. Egzo-celobiozydaza ma m.cz. 200 000, składającą się z dwóch podjednostek 100 000 i wykazuje optimum działania przy pH 5,0. Powyżej pH 6,5 następuje spadek aktywności do 20%. Maksymalną aktywność enzym wykazuje w temperaturze 39–45°C, w temperaturze zaś powyżej 55°C ulega inaktywacji [57]. O-fenantrolina inaktywuje ten enzym w 85%, a jony żelaza i cynku o stężeniu 1mM działają silnie hamująco. Celobioza, jako końcowy produkt rozkładu, hamuje enzym w 50% przy stężeniu 1 mM, w 85% przy stężeniu 10 mM. Jony wapnia działają stymulująco na aktywność enzymu. Spośród innych bakterii celulolitycznych mniej zbadanych pod względem enzymatycznym jest *B. cellulosolvens*, który rośnie na celulozie w formie bezpostaciowej warstewki na powierzchni, w ścisłym kontakcie z podłożem [106].

Pierwotniaki

Wyizolowano ze żwacza 6 rodzajów pierwotniaków, których ekstrakt rozkładał znakowaną C^{14} -celulozę. W początkowych badaniach autorzy nie mieli pewności, czy aktywność ekstraktu należało przypisać pierwotniakom, czy bakteriom obecnym w endoplazmie komórek pierwotniaków. Stwierdzono, że pierwotniaki *Eudiplodinium maggii* rozkładają 70% celulozy znajdującej się wewnątrz komórki. Rozkład ten nie był wynikiem obecności bakterii, gdyż nie hamował go dodatek antybiotyków, co świadczyć może o aktywności pochodzenia niebakteryjnego [31, 32, 40, 41]. Według Colemana [33] u owiec żywionych sianem i owsem, tuż przed karmieniem 62% celulazy znajduje się we frakcji pierwotniaków, 27% związane jest z włóknem roślinnym, 10,65% z bakteriami, a mniej niż 1% z bezkomórkowym płynem żwaczowym.

Badania wykazały, że u zwierząt pozbawionych pierwotniaków aktywność celulazy w żwaczu była mniejsza, zwiększała się natomiast po wprowadzeniu *Entodinium*, choć pierwotniaki te nie wykazują znacznej aktywności (6–7%) w rozkładzie celulozy. *Entodinium caudatum* ma zdolność selektywnego pochłaniania niecelulolitycznych bakterii, co umożliwia lepszy wzrost bakterii o dużej aktywności celulolitycznej [22]. Pierwotniaki żwacza składają się w 95% z *Entodinium*, 2,5% *Polyplastron* i po

1,3% *Dasytricha* i *Isotricha* [114]. U zwierząt żywionych paszą o dużej zawartości celulozy (30%) polepszenie rozkładu celulozy było wynikiem współdziałania pierwotniaków z bakteriami [77]. Obecność *Polyplastron multivesiculatum* w żwaczu zwiększa aktywność celulolityczną, jeśli zwierzę jest żywione paszą bogatą w celulozę i hemicelulozy, obniża ją zaś, jeśli pasza zawiera dużo skrobi [78].

W żwaczu owiec pozbawionym pierwotniaków aktywność związana z cząstkami stałymi wzrasta 4–8-krotnie po ponownym wprowadzeniu pierwotniaków do żwacza [157]. Specyficzna aktywność celulolityczna była większa u pierwotniaków niż we frakcji bakteryjnej uzyskanej ze żwacza krów żywionych sianem [156].

W ostatnich latach bezpośredni udział pierwotniaków w rozkładzie celulozy potwierdziły prace nad pierwotniakami wyizolowanymi ze żwacza kóz [114]. Zdaniem niektórych badaczy pierwotniaki żwaczowe mają zdolność syntezy enzymów celulolitycznych, głównie celulazy (EC 3.2.1.4), natomiast egzo-cellobiohydrolaza (EC 3.2.1.91) — stwierdzona w znikomych ilościach — może pochodzić z endosymbiotycznych bakterii [42, 114].

Wpływ pH na aktywność enzymatyczną mieszanych pierwotniaków ze żwacza kóz był różny, w zależności od stosowanego substratu. Dla enzymu działającego na karboksymetylocelulozę (CMC-ozę) optimum pH wynosiło 6,0, Avicelu 5,0, a optymalna temp. 40°C [51, 114].

Grzyby

Silny wzrost grzybów notowano żywiąc zwierzęta paszą włóknistą, słaby przy diecie liściastej oraz bogatej w skrobię i cukier (jęczmień, pszenica, buraki) [2, 5, 13, 14, 16, 62, 67, 68, 95]. Obecność w żwaczu grzybów na fragmentach włóknistych roślin paszowych świadczy o ich udziale w hydrolizie ścianek komórek roślinnych paszy [8, 153]. Działalność grzybów polega na wytwarzaniu kanałów wzdłuż włókna roślinnego i umożliwienia w ten sposób enzymom celulolitycznym dostępu do właściwego dla nich substratu [5].

Grzyby żwaczowe katalizują rozkład tkanki zliżnifikowanej łatwiej niż bakterie, jednakże ich rola w procesie rozkładu nie jest jasna [4, 5, 37, 155]. Stwierdzono, że grzyby wspólnie z bakteriami powodują rozkład mikrokrystalicznej celulozy, czego nie są w stanie dokonać same bakterie [7, 83]. W żwaczu owiec wykryto obecność grzyba *Neocallimastix frontalis* (obecna nazwa *N. patriciarum*). Aktywność celulolityczna tego grzyba przewyższa aktywność znanego grzyba *Trichoderma reesei* [102, 162]. *N. frontalis* wykazuje największą aktywność we frakcji pozakomórkowej, jakkolwiek frakcja membranowa odznacza się też pewną aktywnością [105, 120]. *N. frontalis* rozkłada włókna bawełny i Avicel [118, 162].

Grzyby żwaczowe wytwarzają celulazę (EC 3.2.1.4), celobiazę (EC 3.2.1.21) i egzo-celobiozydazę (EC 3.2.1.91). Ostatnio potwierdzono aktywność celulazy i celo-

biazy u *N. frontalis* NC71 i *Piromyces* sp. PC12 względem karboksymetylocelulozy (CMC) i Avicelu [82].

Ogólne właściwości enzymów poznanych w grzybach były prawie takie same. Optimum działania dla celobiazy grzyba *N. frontalis* EB288 stwierdzono przy pH 4,5–7,5, z maksimum przy pH około 6,0, i w temperaturze 50–55°C [96]. Są one wrażliwe na metale ciężkie [12, 67]. Wrażliwość grzybów na antybiotyki jest różna u różnych gatunków grzybów. Odporność na monenzin i lasalocid wzrasta w obecności bakterii metanogennych [79, 145, 162].

Stwierdzono, że wpływ bakterii celulolitycznych na aktywność enzymatyczną grzybów jest różny w zależności od szczepu bakteryjnego. I tak ostatnio zbadano wpływ *Ruminococcus flavefaciens* i *Fibrynobacter succinogenes* na rozkład słomy pszennej i łodyg kukurydzianych przez grzyby *N. frontalis* MCH3 oraz *Orpinomyces* (*Neocallimastix*) *joyonii* TP 90-9. Okazało się, że *R. flavefaciens* wywiera hamujący wpływ na aktywność grzybów, natomiast *F. succinogenes* nie wywiera takiego wpływu [130].

Obok *N. frontalis* i *O. joyoni* aktywność celulolityczną wykazują grzyby *Pirromonas communis* i *Sphaeromonas communis*, które rozkładają celulozę efektywniej (do 52%) w obecności metanogennych bakterii niż w czystych monokulturach [4, 47]. Grzyby te wydzielają do podłoża 80% enzymów [16, 19].

Stwierdzono, że połączenie *P. communis* i *S. ruminantium* redukuje aktywność celulolityczną grzybów, natomiast *S. communis* i *S. ruminantium* rozkładają substrat bardziej efektywnie niż monokultura *S. communis* [61, 129]. Aktywność *N. frontalis* i *P. communis* we wspólnej hodowli z *R. flavefaciens* i *R. albus* jest częściowo zahamowana, natomiast z *B. succinogenes* wzrasta. *S. ruminantium* (szczep niecelulolityczny) całkowicie hamuje rozkład celulozy przez grzyby [105, 162].

Wpływ różnych czynników na aktywność celulaz drobnoustrojów żwaczowych

Badania in vitro wykazały, że stopień rozkładu celulozy jest największy przy pH 6,8, natomiast obniża się przy pH 5,5 — właściwym dla treści żwacza zwierząt żywnych łatwo przyswajalnymi węglowodanami [29]. W warunkach fizjologicznych to niskie pH w żwaczu jest na ogół objawem przejściowym i wzrasta po wyczerpaniu się cukrów prostych [70, 142, 146].

Ługowanie słomy (2,4 kg ługu/100 kg słomy) zwiększa rozkład włókna. Ług sodowy nie rozpuszcza ścianek komórek roślin paszowych, ale powoduje pęcznienie mikrowłókienek celulozy, wskutek czego enzymy dyfundują do komórek przez duże kapilary, działając na wolne łańcuchy i celulozę amorficzną. Tego rodzaju zabieg zwiększał o około 20% aktywność celulolityczną płynu żwaczowego krów żywnych preparowaną słomą i paszą treściwą (50 : 50) [27, 102, 151].

Działanie ozonu na bawełnę powoduje rozkład około 45% warstwy powierzchniowej bez większego wpływu na celulozę krystaliczną [103].

Działanie alkalicznego roztworu nadtlenu wodoru na celulozę, przy dużej ilości ligniny i hemicelulozy, nie zwiększa jej rozkładu przez drobnoustroje mieszane oraz *B. succinogenes*. Przy mniejszej ilości ligniny i hemicelulozy obserwowano znaczny wzrost aktywności w porównaniu z aktywnością płynu żwaczowego krów żywionych słomą nie traktowaną [39, 53, 94].

Azotyny gromadzące się w czasie przemian azotanów zmniejszają wzrost bakterii, co pociąga za sobą obniżenie aktywności enzymów celulolitycznych [98].

Działanie gazowego amoniaku (3 cz./100 cz. suchej trawy) w ciągu 16 godzin w temp. 90°C polepsza strawność celulozy w żwaczu, a traktowany materiał roślinny dostarcza tym samym więcej energii i azotu do syntezy białka bakterii, np. *B. succinogenes*, *R. albus* i *R. flavefaciens* [25, 81].

Badano wpływ dodatku glukozy lub celobiozy na szybkość rozkładu celulozy przez trzy wiodące szczepy bakteryjne: *B. succinogenes*, *R. albus* i *R. flavefaciens*. Stwierdzono spadek szybkości rozkładu celulozy, przypuszczalnie wywołany obniżeniem pH środowiska poniżej 6,3, wskutek zachodzącej fermentacji rozpuszczalnych węglowodanów [70].

Metyloceluloza dodana do czystej hodowli bakterii celulolitycznych, zaabsorbowanych na celulozie, powoduje ich odszczepienie od podłoża i zahamowanie rozkładu celulozy [65]. Hamujący wpływ metylocelulozy i innych metylowanych węglowodanów tłumaczy się dwoma mechanizmami — poprzez działanie jako kompetytywnego inhibitora aktywności enzymu lub przez zmianę struktury białka, wchodząc w reakcję z substratem [86, 152]. Metyloceluloza nie hamuje wzrostu bakterii *R. flavefaciens* FD1 hodowanych na celobiozie i celooligosacharydach. Mieszanina metylowanych celooligosacharydów o stopniu polimeryzacji 6,7–9,5 hamuje rozkład celulozy, natomiast o stopniu polimeryzacji 1,0–4,5 nie działa hamująco [126].

Kwasy fenolowe, występujące często jako kwasy hydroksycynamonowe, są estrowo związane z polisacharydami. Mniej niż 5% kwasów fenolowych obecnych w słomie jest rozpuszczalne. Kwasy te pobierane są przez zwierzę, gdy w żywieniu stosuje się słomę traktowaną ługiem w formie rozpuszczalnej [28, 115].

Oprócz wyżej wymienionych czynników również tlen atmosferyczny i inhibitory pochodzenia roślinnego mogą w pewnym stopniu hamować aktywność celulolityczną bakterii [137].

Wiele roślin paszowych zawiera taniny, które — tworząc wiązanie ze związkami wielkocząsteczkowymi — powodują zahamowanie różnych układów enzymatycznych, między innymi celulaz w żwaczu [63, 100, 163].

Dodatek tłuszczów do paszy ma również wpływ na procesy enzymatyczne w żwaczu. Henderson i Hodgkiss [69] wykazali, że wzrost pewnych szczepów *Butyrivibrio*, *Ruminococcus* i bakterii metanogennych ulega silnemu zahamowaniu w obecności kwasów tłuszczowych. Robertson i Hawke [129a] badali *in vitro* i *in vivo*

wpływ dodatku oleju lnianego i tranu u krów na pastwisku, stwierdzając zmniejszenie rozkładu celulozy [24]. Inni badacze stwierdzili u cieląt zahamowanie rozkładu suchej masy trawy przy dodatku dużej ilości stałego tłuszczu (łój) do pasz [84].

Wprowadzenie do kiszonek dla bydła zeolitów (0,5%–1,0%) wpływa korzystnie na stabilność pH w czasie zachodzących w żwaczu procesów rozkładu. Obecne w zeolitach jony potasu i magnezu aktywują działanie enzymów w żwaczu [56]. Spośród jonoforów avoparcyna zmienia obraz mikroflory żwacza owiec, zmniejszając liczbę paciorkowców na rzecz *B. succinogenes* [143]. Dodatek lasalocidu wywiera różny wpływ na aktywność *Neocallimastix frontalis*, w zależności od jego hodowli [144].

Związkami stymulującymi aktywność celulaz są ATP, heksokinaza, kwas askorbinowy, glutation, kwas fenylooctowy, odczynniki tiolowe i fosforany. Wzrost aktywności celulaz pod wpływem fosforanów zwiększa się w obecności płynu żwaczowego. Jest możliwe, że fosforany dezaktywują w płynie żwaczowym inhibitory, tym samym podwyższając aktywność celulaz [51, 140, 141]. Dodatek kwasu fenylopropionowego do pożywki wpływa wyraźnie na wytwarzanie się pozakomórkowej celulazy u *R. albus*. Kwas ten jest składnikiem otoczki bakteryjnej celulolitycznej. Bez tego kwasu wytwarza się enzym niskocząsteczkowy [75, 138, 139]. Kwas fenylooctowy wpływa na rozkład celulozy tylko w obecności kwasu 3-fenylopropionowego. Bez kwasu fenylooctowego czas rozkładu przedłuża się do 2 dni, podczas gdy brak kwasu 3-fenylopropionowego całkowicie hamuje wzrost *R. albus* [140].

Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że rozkład celulozy w żwaczu zależy w dużym stopniu od rodzaju bakterii, a ściślej od kompleksu enzymatycznego, wytwarzanego przez daną komórkę drobnoustroju. Obecny zasób wiedzy o enzymach celulolitycznych bakterii jest skromny. Powodem tego są trudności izolacji drobnoustrojów w warunkach beztlenowych, a takie warunki są niezbędne dla mikroflory żwaczowej. Określenie aktywności enzymu jest trudne, bowiem uzależnione jest od rodzaju substratu. Stosowanie w badaniach różnych substratów prowadzi często do sprzecznych wyników.