

Adam Cieślak, Andrzej Potkański, Małgorzata Szumacher-Strabel, Mateusz Janicki,
Agnieszka Nowakowska, Monika Nowacka, Ewelina Szymankiewicz
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu
Katedra Żywnienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej

Biouwodorowanie nienasyconych kwasów tłuszczowych pochodzących z pasz z dodatkiem olejów roślinnych w warunkach in vitro

Biohydrogenation of unsaturated fatty acids in in vitro study during digestion of diet supplemented with plant oils

Słowa kluczowe: biouwodorowanie, nienasycone kwasy tłuszczowe, żwacz, oleje roślinne

Oleje roślinne, które zawierają nienasycone kwasy tłuszczowe, dodane do pasz dla zwierząt przeżuwających mogą modyfikować procesy zachodzące w żwaczu, np. proces biouwodorowania. Intensywność procesu biouwodorowania zależy od paszy oraz rodzaju oleju. Celem badań było określenie wpływu dodatku oleju lnianego i rzepakowego w ilości 0, 4 i 6% do dawki składającej się głównie z paszy objętościowej, na przebieg procesu biouwodorowania. Doświadczenie zostało przeprowadzone w warunkach in vitro metodą *batch culture*. Określono poziom biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny C₁₈. Rozmiar biouwodorowania zależał od ilości i rodzaju zastosowanego oleju, jednak zarówno dodatek oleju rzepakowego, jak i lnianego zwiększył istotnie ilość kwasu stearynowego w płynie żwacza po inkubacji.

Key words: biohydrogenation, unsaturated fatty acids, rumen, plant oils

Plant oils rich in unsaturated fatty acids, supplemented to ruminants' diet can modify processes occurring in the rumen e. g. biohydrogenation. Level of biohydrogenation depends on diets and type of applied oils. The aim of the study was to assay the biohydrogenation *in vitro* of diets composed mostly of roughage and supplemented with 0, 4 or 6% of linseed and rapeseed oil. The experiment was carried out in in vitro study using *batch culture* system. Level of biohydrogenation of unsaturated fatty acids from C₁₈ family was estimated. Extent of biohydrogenation depended on type and quality of fat used. Both rapeseed oil and linseed oil significantly affected the increase of the level of stearic acid in rumen fluid after incubation. Increased level of oleic and linolenic acid in the diets supplemented with rapeseed and linseed oils respectively, caused the increase of their biohydrogenation in the rumen. The level of dietary oils determines direction of processes occurring in the rumen.

Wstęp

Biouwodorowanie jest procesem zachodzącym w żwaczu przy udziale znajdujących się tam mikroorganizmów. W procesie tym biorą udział głównie

bakterie, natomiast pierwotniaki tylko w niewielkim stopniu. Udział cząstek paszy w procesie biouwodorowania nie jest jasny, ale większość autorów skłania się ku twierdzeniu, że zachodzi intensywniej w ich obecności (Bauchart i in. 1990). Końcowym produktem procesu biouwodorowania, czyli przyłączenia atomów wodoru do nienasyconych wiązań kwasów tłuszczowych, jest kwas stearynowy. W korzystnych warunkach mogą powstawać również pośrednie produkty biouwodorowania, np. sprzężone izomery kwasów oleinowego i linolowego wykazujące działanie prozdrowotne. Szczególnie sprzężony kwas linolowy (ang. conjugated linoleic acid, CLA) może być brany pod uwagę jako leczniczy środek odżywczy w odniesieniu do takich zaburzeń jak: dyslipidemia, zespół insulinooporności, czy miażdżyca (Hu i in. 2001), a także charakteryzować się działaniem antynowotworowym (Parodi 1996). Każda z aktywnych form izomerycznych charakteryzuje się innym działaniem korzystnym dla zdrowia. Ilość powstających w żwaczu izomerów determinuje ich koncentrację w tkankach i mleku (Chilliard i in. 2000). Rozmiar i intensywność procesu biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych jest wypadkową wielu czynników, między innymi udziału paszy objętościowej i treściwej w dawce oraz składu zawartych w niej kwasów tłuszczowych. Doreau i Ferlay (1994) stwierdzili, że wysoki udział paszy treściwej w dawce hamuje biouwodorowanie nienasyconych kwasów tłuszczowych obniżając pH treści żwacza i ograniczając wzrost bakterii biorących udział w tym procesie. Podobnie oleje roślinne, które zawierają nienasycone kwasy tłuszczowe, mogą modyfikować procesy zachodzące w żwaczu, np. proces biouwodorowania (Garnsworthy i Wiseman 1997).

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu dodatku oleju rzepakowego i lnianego do dawki składającej się głównie z paszy objętościowej, na przebieg procesu biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych o osiemnastu atomach węgla.

Material i metody

W celu określenia wpływu zastosowanej dawki pokarmowej oraz olejów roślinnych będących źródłem kwasu oleinowego (olej rzepakowy) i linolenowego (olej lniany) przeprowadzono dwa doświadczenia w warunkach *in vitro* z zastosowaniem metody *batch culture*. Jest to metoda pozwalająca na wstępną ocenę wpływu paszy na przebieg podstawowych procesów żwaczowych w warunkach *in vitro* (Martin i in. 2000; Martin i Jenkins 2002). Czas inkubacji dawki pokarmowej wynosił 48 godzin, co umożliwiło mikroorganizmom obecnym w płynie żwacza dostęp do pokrytych tłuszczem cząstek paszy. Inkubacja badanej próbki odbywała się w buforze, składającym się z roztworów mieszaniny dwóch soli (Hungate 1966), których skład odpowiada składowi śliny przeżuwacza oraz z płynu żwacza.

Stosunek ilościowy płynu żwacza do roztworu wynosił 3 : 2. W wykorzystywanych do tego celu fiolkach stworzono warunki symulujące środowisko żwacza. Substrat ulegający fermentacji stanowiła dawka pokarmowa składająca się z siana łąkowego oraz mieszanki treściwej (60 : 40%). Zastosowane dawki zostały wzbogacone 4 oraz 6% dodatkiem oleju rzepakowego lub lnianego w przeliczeniu na suchą masę dawki. Każdy z wariantów inkubowano w 6 fiolkach (powtórzeniach). Średnia wartość pokarmowa dawki bez dodatku oleju wynosiła 0,83 JPM, 89 g BTJN i 83 g BTJE. Skład dawki pokarmowej przedstawia tabela 1.

Tabela 1

Skład dawek [% SM] — *Composition of diets [% DM]*

Składniki <i>Components</i>	Dawki [% SM] — <i>Diets [%DM]</i>		
	kontrola <i>control</i>	4% oleju** <i>4% of oil**</i>	6% oleju** <i>6% of oil**</i>
Siano łąkowe — <i>Meadow hay</i>	62,00	60,53	58,45
Śruta pszenna — <i>Wheat meal</i>	31,00	28,37	28,74
Poekstrakcyjna śruta rzepakowa — <i>Rapeseed meal</i>	5,00	4,90	4,68
Polfamiks OK* — <i>Polfamix OK*</i>	2,00	2,20	2,13
Olej** — <i>Oil</i>	0,00	4,00	6,00

* 1 kg Polfamix OK zawiera: — *Composition of Polfamix OK at 1 kg:*witamina A — 300.000 j.m.; witamina D₃ — 30.000 j.m.; witamina E — 1,5 g;

Fe — 0,5 g; Zn — 2,5 g; Mg — 65,0 g; Co — 0,015 g; Mn — 3,0 g; J — 0,01 g; Se — 0,003 g;

Na — 60 g; Ca — 240 g; P — 120 g

** Doświadczenie 1 — olej rzepakowy; doświadczenie 2 — olej lniany

Experiment 1 — rapeseed oil, experiment 2 — linseed oil

Ilość kwasów tłuszczowych w dawce oraz w płynie żwacza po inkubacji została oznaczona metodami chromatografii gazowej (Collomb i Büchler 2000, Cieślak 2004). Poziom biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny C₁₈ został oszacowany według wzoru Wu i in. (1991):

$$\text{Poziom biouwodorowania} = 100 - 100 \times [(A/B) / (C/D)] [\%]$$

gdzie:

A – wszystkie nienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny C₁₈ dochodzące do dwunastnicy (w warunkach in vitro poziom kwasów tłuszczowych w płynie żwacza po inkubacji),B – wszystkie kwasy tłuszczowe z rodziny C₁₈ dochodzące do dwunastnicy,C – wszystkie nienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny C₁₈ w dawce,D – wszystkie kwasy tłuszczowe z rodziny C₁₈ w dawce.

Uzyskane wyniki zostały poddane weryfikacji statystycznej według general linear model (GLM). Istotność różnic pomiędzy średnimi zweryfikowano używając testu Tukeya (SAS 1996).

Wyniki

Dawki pokarmowe różniły się rodzajem i ilością dodanych olejów. Jako źródło kwasu oleinowego wykorzystano powszechnie dostępny w Polsce olej rzepakowy, natomiast jako źródło kwasu linolenowego olej lniany. Rodzaj zastosowanego tłuszczu determinował skład kwasów tłuszczowych dawki pokarmowej, a w efekcie ilość kwasów tłuszczowych znajdujących się w płynie żwacza po inkubacji w warunkach *in vitro*, czyli dopływających do dwunastnicy. Uzyskane wyniki przedstawiają tabele 2 i 3. W doświadczeniu pierwszym, w którym źródło nienasyconych kwasów tłuszczowych stanowił bogaty w kwas oleinowy olej rzepakowy, wzrost udziału tego kwasu w paszy w efekcie dodatku oleju nie był proporcjonalny do jego zawartości w płynie żwacza po inkubacji (tab. 2). Uzyskane wyniki wskazują na intensywne biouwodorowanie kwasu C_{18:1} do kwasu stearynowego, które wzrosło statystycznie istotnie ($P \leq 0,05$) z 48,37% w grupie bez dodatku tłuszczu do 83,02 oraz 82,57% w grupach z dodatkiem 4 i 6% oleju rzepakowego (rys. 1). W rezultacie biouwodorowania kwasu oleinowego, pochodzącego z dodanego oleju rzepakowego, poziom kwasu stearynowego w płynie żwacza po inkubacji wzrósł z 7,83% FAME (fatty acid metyl ester) do 20,64 oraz 26,08%, odpowiednio w grupach z dodatkiem 4 lub 6% oleju rzepakowego. Dodatek oleju rzepakowego zwiększył również ilość kwasu linolowego i linolenowego w płynie żwacza po inkubacji, jednak stwierdzony wzrost nie był znaczący (tab. 2). Dodatek oleju rzepakowego zmniejszył statystycznie istotnie ($P \leq 0,05$) rozmiar biouwodorowania kwasu linolenowego z 91,96% w grupie kontrolnej do 77,53 i 76,80%, odpowiednio z dodatkiem 4 i 6% zastosowanego tłuszczu (wykres 1).

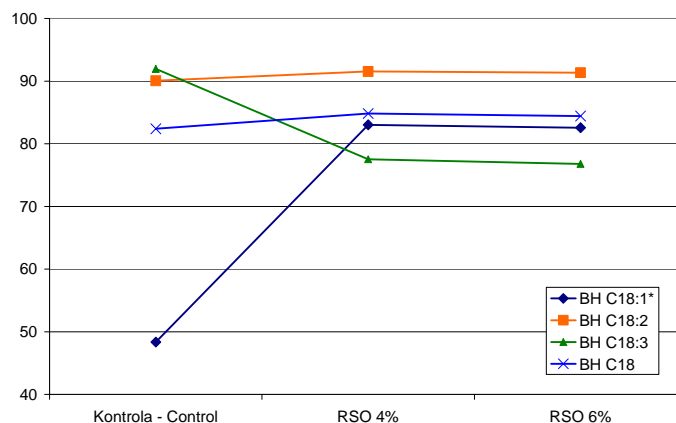
Tabela 2

Nienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny C₁₈ znajdujące się w badanej paszy oraz w płynie żwacza po inkubacji [% FAME; fatty acid metyl ester] — *Unsaturated fatty acids in feed and rumen fluid after incubation [% FAME; fatty acid metyl ester]*

Kwasy tłuszczowe <i>Fatty acids</i>	Pasza — <i>Feed</i>			Dwunastnica — <i>Duodenum</i> **		
	dawka pokarmowa — <i>diet</i>			dawka pokarmowa — <i>diet</i>		
	kontrolna <i>control</i>	RSO* 4%	RSO* 6%	kontrolna <i>control</i>	RSO* 4%	RSO* 6%
C _{18:0}	0,52	0,64	0,86	7,83	20,64	27,08
C _{18:1}	1,63	15,07	20,34	0,92	2,66	3,60
C _{18:2}	3,13	5,91	7,98	0,34	0,52	0,70
C _{18:3}	3,30	1,67	2,25	0,29	0,39	0,53

* RSO — olej rzepakowy — *rapeseed oil*

** płyn żwacza po inkubacji *in vitro* — *rumen fluid after incubation in vitro*



Rys. 1. Zmiany poziomu biouwodorowania kwasów tłuszczowych jako efekt dodatku oleju rzepakowego do dawki pokarmowej — *Changes in level of biohydrogenation as an effect of rapeseed oil supplementation to the diet*

Dodatek oleju lnianego do dawek składających się w 60% z paszy objętościowej zwiększył udział kwasu linolenowego w paszy (tab. 3) i, podobnie jak w doświadczeniu pierwszym, ilość kwasu stearynowego w płynie żwacza po inkubacji. W doświadczeniu drugim ilość kwasu stearynowego wzrosła w efekcie dodania kwasu linolowego do paszy. Stwierdzono statystycznie istotny wzrost poziomu biouwodorowania kwasu linolenowego, z 92,12% w grupie bez dodatku oleju do 96,38 oraz 96,40%, odpowiednio w grupach 4 i 6% z dodatkiem oleju lnianego (rys. 2). Biouwodorowanie pozostałych nienasyconych kwasów tłuszczowych o osiemnastu atomach węgla nie uległo zmianie w efekcie dodania tłuszczu.

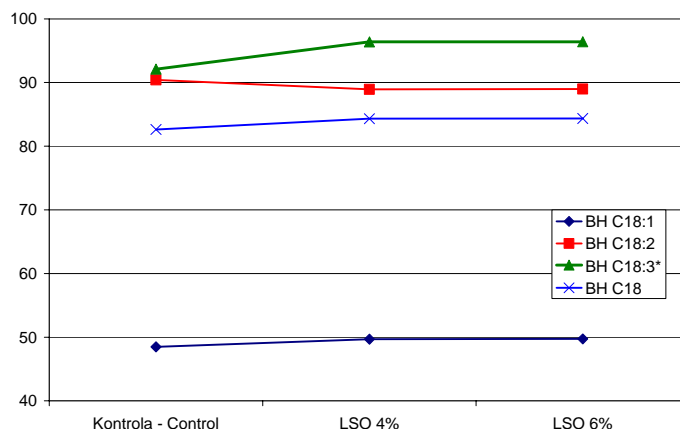
Tabela 3

Nienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny C₁₈ znajdujące się w badanej paszy oraz w płynie żwacza po inkubacji [% FAME] — *Unsaturated fatty acids in feed and rumen fluid after incubation [% FAME]*

Kwasy tłuszczowe <i>Fatty acids</i>	Pasza — <i>Feed</i>			Dwunastnica — <i>Duodenum</i> **		
	dawka pokarmowa — <i>diet</i>			dawka pokarmowa — <i>diet</i>		
	kontrolna <i>control</i>	LSO* 4%	LSO* 6%	kontrolna <i>control</i>	LSO* 4%	LSO* 6%
C _{18:0}	0,52	0,98	1,33	7,18	20,09	27,28
C _{18:1}	1,63	5,00	6,79	0,84	2,55	3,46
C _{18:2}	3,13	4,81	6,53	0,30	0,54	0,73
C _{18:3}	3,30	2,53	17,01	0,26	0,46	0,62

* LSO — olej lniany — *linseed oil*

** płyn żwacza po inkubacji in vitro — *rumen fluid after incubation in vitro*



Rys. 2. Zmiany poziomu biouwodorowania kwasów tłuszczowych jako efekt dodatku oleju lnianego do dawki pokarmowej — *Changes in level of biohydrogenation as an effect of linseed oil supplementation to the diet*

Dyskusja

Ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych o osiemnastu atomach węgla w paszy zależy od jej składu. W przeprowadzonych badaniach dodatki oleju rzepakowego i lnianego spowodowały wzrost intensywności biouwodorowania, odpowiednio kwasu oleinowego i linolenowego.

W badaniach metodą *batch culture* stwierdzono tendencje do zmian w poziomie nienasyconych kwasów tłuszczowych w płynie żwacza po inkubacji. Wyniki te były jednak niższe od uzyskiwanych w warunkach *in vivo*. W naszych badaniach niski poziom biouwodorowania kwasu oleinowego wykazano w grupie kontrolnej w doświadczeniu pierwszym oraz we wszystkich grupach doświadczenia drugiego. Obserwowany w doświadczeniu pierwszym poziom biouwodorowania w grupach z dodatkiem oleju rzepakowego był niski w porównaniu do efektów uzyskiwanych w badaniach na zwierzętach. Zdaniem Loora i in. (2005) niższe tempo biouwodorowania w systemie *batch culture* wynika ze statycznego charakteru metody i efektów związanych z kumulacją kwasów tłuszczowych w płynie żwacza po inkubacji.

W badaniach Cieślaka i Potkańskiego (2000) oraz Cieślaka (2004) przeprowadzonych w warunkach *in vivo* i *in vitro*, wykazano że od 52 do 85% nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny C_{18} podlega biouwodorowaniu, co jest zgodne z wartościami uzyskanymi w przedstawianych badaniach. Według Jenkins i Adamsa (2002) dodatek tłuszczu do dawki pokarmowej zwiększa udział kwasów tłuszczowych docierających do dwunastnicy w porównaniu z ich ilością w paszy. Wyniki przeprowadzonych badań nie potwierdzają tej hipotezy, gdyż poziom

kwasów tłuszczowych dochodzących do dwunastnicy był niższy niż w paszy. Podobne rezultaty uzyskali Bauchart i in. (1987) oraz Jenkins i Palmquist (1986). Przyczynami niższego poziomu nienasyconych kwasów tłuszczowych w dwunastnicy mogą być: absorpcja długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, a także ich rozkład do form o mniejszej ilości węgla oraz niedoszacowanie ich ilości w treści dwunastniczej (Wu i in. 1991). Ferlay i in. (1993) niższą zawartość kwasów tłuszczowych z grupy C₁₈ w dwunastnicy tłumaczą rozkładem tych kwasów przez mikroorganizmy w żwaczu.

Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę, że intensywność procesu biouwodorowania zależy od fermentowanego substratu, czyli zawartości poszczególnych nienasyconych kwasów tłuszczowych w paszy. Odpowiedni zaś dobór dawki pokarmowej stwarza korzystne warunki do rozwoju bakterii przeprowadzających ten proces.

Wnioski

Zwiększony udział kwasu oleinowego oraz linolenowego w dawkach pokarmowych wzbogacanych odpowiednio w olej rzepakowy i lniany zintensyfikował ich biouwodorowanie w żwaczu. Ilość oleju w paszy determinuje kierunek procesów zachodzących w żwaczu.

Literatura

- Bauchart D., Doreau M., Kindler A. 1987. Effect of fat and lactose supplementation on digestion in dairy cows. 2. Long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci.*, 70: 71-76.
- Bauchart D., Legay-Carmier F., Doreau M., Gaillard B. 1990. Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid-supplemented diets. *Br. J. Nutr.*, 63: 563-578.
- Collomb M., Bühler T. 2000. Analyse de la composition en acides gras de la graisse de lait. 1. Optimisation et validation d'une méthode générale à haute résolution. *Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène*, 91: 306-332.
- Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M., Doreau M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.*, 49: 181-205.
- Cieślak A. 2004. Poziom produkcji metanu oraz stopień biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych u owiec otrzymujących dodatki różnych rodzajów olejów roślinnych. Rozprawa doktorska, AR w Poznaniu.
- Cieślak A., Potkański A. 2000. Przemiany tłuszczu w żwaczu i ich wpływ na skład tłuszczu mleka. *Rocz. Nauk. Zoot., Supl.*, 9: 25-30.
- Doreau M., Ferlay A. 1994. Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 45: 379-396.

- Ferlay A., Chabrot J., Elmeddah Y., Doreau M. 1993. Rumen lipid balance and intestinal digestion by dairy cows fed calcium salts of rapeseed oil fatty acids or rapeseed oil. *J. Anim. Sci.*, 71: 2237-2245.
- Garnsworthy P.C., Wiseman J. 1997. Fats in dairy cow diets. In: *Recent advances in animal nutrition*. Nottingham University Press., 87-104.
- Hu F.B., van Dam R.M., Liu S. 2001. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*, 44: 805-817.
- Hungate R.E. 1966. *The rumen and its microbes*. Academic Press, New York and London, 8-90.
- Jenkins T.C., Adams C.S. 2002. The biohydrogenation of linoleamide in vitro and its effects on linoleic acid concentration in duodenal contents of sheep. *J. Anim. Sci.*, 80: 533-540.
- Jenkins T.C., Palmquist D.L. 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.*, 67: 978-986.
- Loor J.J., Ueda K., Ferlay A., Chilliard Y., Doreau M. 2005. Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 119: 203-225.
- Martin S.A., Sullivan H.M., Evans J.D. 2000. Effect of sugars and malate on ruminal microorganisms. *J. Dairy Sci.*, 83: 2574-2579.
- Martin S.A., Jenkins T.C. 2002. Factors affecting conjugated linoleic acid and trans-C_{18:1} fatty acids production by mixed ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.*, 80: 3347-3352.
- Parodi P.W. 1996. Milk fat components: possible chemopreventive agents for cancer and other diseases. *Austr. J. Dairy Technol.*, 51: 24-31.
- SAS®. 1996. *SAS/STAT Users Guide (Release 6,12)*. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Wu Z., Ohajuruka O.A., Palmquist D.L. 1991. Ruminal synthesis, biohydrogenation and digestibility of fatty acids by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 74: 3025-3034.