

Maria Wojciechowicz

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN

Enzymy drobnoustrojów żwaczowych katalizujące rozkład wielkocząsteczkowych składników pokarmowych paszy w żwaczu

Część V. Białko

Rozkład proteolityczny białka paszowego w żwaczu

W żwaczu zwierząt odbywa się rozkład białka paszowego występującego głównie w warstwie aleuronowej grubościennych komórek roślin. Dzięki proteolizie zachodzącej w żwaczu produkty rozkładu białka paszowego są włączane do syntezy białka drobnoustrojów, wykorzystywanego przez organizm zwierzęcy [3].

Ogólnie metabolizm związków azotowych w żwaczu można sprowadzić do prostego schematu [30]:

Białko paszy $\xrightarrow{\text{rozkład}}$ azot niebiałkowy $\xrightarrow{\text{synteza}}$ białko drobnoustrojowe

Pierwszym etapem rozkładu białka w żwaczu jest jego hydroliza przez proteiny do peptydów i aminokwasów, które są albo bezpośrednio wykorzystywane przez mikroflorę żwacza, albo rozkładane dalej przez peptydazy i enzymy dezaminujące do krótkich łańcuchów tłuszczowych i amoniaku [20]. W zależności od tempa rozkładu i warunków panujących w żwaczu większość białka ulega takiej przemianie, obok białka paszowego nie zmienionego, przechodzącego wprost do dalszych odcinków przewodu pokarmowego.

Pierwsze wzmianki o rozpadzie białka w żwaczu pochodzą z lat trzydziestych, kiedy to polski biochemik Sym [58] w doświadczeniach nad rozkładem kazeiny w żwaczu stwierdził właściwości proteolityczne jego treści. Następnie Schlottke [53] doniósł o właściwościach proteolitycznych pierwotniaków w żwaczu bydła. Od tego czasu nieprzerwanie w wielu ośrodkach naukowych kontynuowano badania nie tylko

pływu żwaczowego i zawiesiny bakterii, ale również badania w kierunku izolacji i identyfikacji beztlenowych drobnoustrojów o właściwościach proteolitycznych [6, 18, 22, 26, 59, 67].

Drobnoustroje proteolityczne żwacza

Aktywność proteolityczną stwierdzono u bakterii, pierwotniaków i grzybów.

Wśród bakterii właściwości proteolityczne wykazują: *Bacteroides amylophilus* [13, 14, 16, 17, 41, 44], *Bacteroides ruminicola* [12, 33, 34], *Butyrivibrio fibrisolvens* [2, 24], *Streptococcus bovis* [25, 28] i *Butyrivibrio alactacidigens* [62].

Słabe właściwości proteolityczne mają: *Selenomonas ruminantium* v. *ruminantium* i v. *lactolytica*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* i *Lachnospira multiparus* [22, 26, 37, 62].

Z pierwotniaków aktywnością proteolityczną odznaczają się: *Eucaudatum* [23]; *Eudiplodinium ophryoscolex*, *Dasytricha ruminantium*, *Isotricha prostoma* i *intestinalis* [55], *Epidinium eucaudatum caudatum*, *Polyplastron multivesiculatum* i *Entodinium simplex* [42].

W ostatnich latach doniesiono o aktywności proteolitycznej beztlenowych grzybów wyizolowanych ze żwacza owiec. Wśród grzybów wysoką aktywnością odznacza się *Neocallimastix frontalis* [64, 66].

Enzymy proteolityczne

Enzymy proteolityczne dzielą się na endo- i egzopeptydazy, a te dzielą się na aminopeptydazy i karboksylazy.

Częściej stosowany jest podział enzymów proteolitycznych oparty na mechanizmie ich katalitycznego działania i budowie centrum aktywnego. Centra aktywne enzymów proteolitycznych stanowią: grupy hydroksylowe ($-\text{CH}-\text{OH}$) seryny w proteinazach serynowych, grupy sulfhydrylowe ($-\text{CH}_2-\text{SH}$) cysteiny w proteinazach cysteinowych, grupy karboksylowe (CH_2-COOH) kwasu asparaginowego w proteinazach aspartyłowych, grupy metali (kationy) w metaloproteinach.

Proteinazy serynowe (EC 3.4.21.1–18) działają w zakresie pH 7,5–11 i hamowane są przez inhibitory syntetyczne, jak PMSF, TLCK, TPCK i DFP, tworzące połączenia estrowe z grupami hydroksylowymi seryny. Enzymy te są również hamowane przez inhibitory pochodzenia mikrobiologicznego, jak leupeptyna i antypaina.

Proteinazy cysteinowe (EC 3.4.22.1–10) działają w zakresie pH 4,6–6,0. Hamowane są przez jodoacetamid, jodoocetan, PCMB, TLCK, TPCK, antypainę, leupeptynę oraz metale ciężkie.

Proteinazy aspartyłowe (EC 3.4.23.1–10) o optymalnym pH 2,0–5,0, hamowane są przez DANM, etylenodwuaminę, pepstatynę i inne.

Proteinazy metalozależne (EC 3.4.24.1–4) o optymalnym pH 6,5–8,5, hamowane są przez czynniki chelatujące metale: EDTA, PCMB, DFP i 1,10-fenantrolinę.

Wykaz stosowanych skrótów:

PMSF	— fluorek fenylo-metylo-sulfonylu
TLCK	— keton-N- α - β -tosylo-L-lizynochlorometylowy
TPCK	— keton L-1-tosyloamido-2-fenyloetylochlorometylowy
DFP	— dwuizopropylodifluorofosforan
DTT	— dwutiotreitol
EDTA	— kwas etylenodwuaminoczwerooctowy
DANM	— ester metylo-dwuazoacetylo-DL-norleucyny
PCMB	— p-chlorortęciobenzoesan
DPPF	— dwuizopropylodifluorofosforan
DMF	— dwumetyloformamid
NEM	— imid N-etylomaleinowy

Właściwości białka i jego rozkład w żwaczu

Henderickx i Martin [30] przebadali w warunkach *in vitro* rozkład 39 różnych białek w roztworze odpowiadającym swym składem płynowi żwaczowemu. Okazało się, że spośród badanych białek, 14 nie ulegało rozkładowi, 12 rozłożyło się w 25%, 5 białek w 50%, a 8 powyżej 50%. Było to związane z ich różną rozpuszczalnością. Inni badacze stwierdzili, że rozpuszczalność białka nie jest głównym czynnikiem decydującym o szybkości jego rozkładu przez drobnoustroje, natomiast ważna jest drugo- i trzeciorzędowa struktura [44, 47, 49, 60].

Do białek łatwo rozpuszczalnych należą między innymi kazeina, żelatyna i białko orzeszków ziemnych. Słabo rozpuszczalne jest białko śruty sojowej, gluten pszenicy i innych zbóż, a najtrudniej rozpuszczalna jest albumina zwierzęca i zeina (białko kukurydzy) [5, 7, 60].

Niektóre białka, jak albumina, fetuina i globulina, zawierają w swej budowie mostki dwusiarczkowe, a te są bardziej odporne na rozkład. Dodatek DTT w celu zniszczenia mostków dwusiarczkowych zwiększa rozkład [46, 48]. Białka o bardziej uporządkowanej strukturze są odporniejsze na działanie drobnoustrojów [60]. Kazeina nie zawiera mostków dwusiarczkowych, ma słabo uporządkowaną strukturę i ulega szybko rozkładowi [61]. Albumina surowicy, zawierająca 16 mostków dwusiarczkowych, i rybonukleaza A4, zawierająca 4 mostki, rozkładają się słabiej od białka śruty

sojowej i nasion rzepy, czterokrotnie słabiej od kazeiny, a mączka rybna dwukrotnie słabiej od śrutu sojowej [43]. Albumina surowicy wołu jest odporna na działanie proteiny *B. amylophilus* in vivo i in vitro oraz proteiny *S. bovis* [5, 35]. Albumina jaja, zaliczana do białek rozpuszczalnych, nie jest łatwo rozkładana przez drobnoustroje żwacza. Struktura cykliczna oraz brak końcowych grup aminowych i karboksylowych uniemożliwia jej rozkład przez karboksylazy i aminopeptydazy [45].

Charakterystyka proteinaz u poszczególnych drobnoustrojów żwaczowych

Badano aktywność proteolityczną pełnej treści żwacza oraz poszczególnych jej frakcji [5, 9, 10, 11, 44]. Najwyższą aktywność wykazywały frakcje bakterii dużych oraz pierwotniaków. Specyficzna aktywność proteiny bakteryjnej była od 6 do 10 razy większa niż aktywność proteiny pierwotniaków, stanowiącej mniej niż 10% aktywności pełnego płynu żwaczowego. Enzymy proteolityczne są silnie związane z komórką [19, 21, 39, 46]. Procentowy udział bakterii proteolitycznych w ogólnej liczbie bakterii żwacza wzrasta w miarę upływu czasu i w 3–10 godzin po odpasie wynosi około 40–42% [69]. Enzymy proteolityczne bakterii żwaczowych związanych z powierzchnią komórek mają charakter proteinaz cysteinowych [39]. *B. amylophilus* (H18) wytwarza enzym w 80% związany z błoną komórkową, a zaledwie 20% enzymu przechodzi do środowiska w okresie logarytmicznego wzrostu bakterii [17].

Zastosowanie wielu technik izolacji, jak działanie toluenem czy rozbijanie komórek za pomocą ultradźwięków nie zwiększyło aktywności pozakomórkowej proteiny, co świadczy o jej silnym związaniu z komórką [15, 40]. Zastosowanie butanolu powodowało uwolnienie proteiny [15]. Komórki rozbite mechanicznie w buforze i zliofilizowane zawierały dużo kwasów nukleinowych (24%) nie dających się usunąć dostępnymi metodami [16]. Proteinazę wyizolowano z kultur znajdujących się w końcowej fazie okresu stacjonarnego bakterii (12 godzin po maksymalnym wzroście komórek). Enzym ten zagęszczono przez adsorpcję na DEAE-Sefadeksie, oczyszczono przez filtrację na Sefadeksie G-200 i drogą elektroogniskowania, uzyskując 532-krotne oczyszczenie. Sączenie na żelu wykazało obecność dwóch aktywnych frakcji o m.cz. 60 000 i 30 000. Aktywność obu frakcji była najwyższa przy tym samym pH, co może wskazywać na jeden i ten sam enzym, który uległ rozbiciu na podjednostki. Frakcja enzymu o m.cz. 60 000 nie ulegała rozbiciu pod wpływem EDTA lub mocznika [34, 41].

Proteinaza *B. amylophilus* jest enzymem konstytutywnym, a jej aktywność podobna jest do aktywności trypsyny [13, 14, 17]. Inhibitor DFP hamuje aktywność enzymu [15]. *B. ruminicola* (R8/4) wykazuje aktywność proteolityczną związaną z komórką, w tym 25% aktywności serynowej, 20% trypsynopodobnej, 10% cysteinowej, około 30% aspartylowej oraz pewną aktywność metalozależną. DFP

hamuje 26% aktywności [19, 33]. *B. ruminicola* jest najważniejsza z bakterii przy proteolizie in vivo [62].

B. fibrisolvens wytwarza pozakomórkową proteinazę typu seryny. Stwierdzono 95% aktywności w bezkomórkowym supernatancie, pozostałe 5% było związane z komórką [24, 62].

S. bovis występuje obficie w żwaczu przy żywieniu dietą bogatą w skrobię i zboża [36, 52]. Wykazuje aktywność związaną z komórką [62] i ma bardzo wysoką aktywność leucyloamidopeptydazową.

B. ruminicola i *S. bovis* są ważnymi bakteriami proteolitycznymi we frakcji płynnej żwacza, a białko rozpuszczalne adsorbuje się na powierzchni komórek bakteryjnych, ulegając następnie rozkładowi [48, 62, 63].

Selenomonas i *Clostridium* charakteryzują się niską aktywnością proteolityczną. Ich rola jest istotna wówczas, gdy występują w dużej ilości w mieszanej populacji bakteryjnej.

Bakterie o niskiej aktywności i słabym wzroście na kazeinie, jako jedynym źródle azotu, zwiększają swoją aktywność, rosnąc w symbiozie. Stwierdza się wtedy wzrost proteolizy. Przykładem tego może być układ *S. ruminantium* o aktywności pozakomórkowej i *S. bovis* o aktywności związanej z komórką [62, 63].

Proteinazy zewnątrzkomórkowe mają przeważnie małą masę cząsteczkową. Brak w ich strukturze mostków dwusiarczkowych wpływa na plastyczność budowy, ułatwiającej przechodzenie tych enzymów przez błony komórkowe. Miejscem biosyntezy tych enzymów jest prawdopodobnie układ rybosomalny w obrębie błony cytoplazmatycznej [68].

Rola pierwotniaków w rozkładzie białka jest mniej istotna niż bakterii, jakkolwiek stwierdzono ich udział w proteolizie. Wykazano, że proteinazy cysteinowe i w mniejszym stopniu aspartylowe, zawarte w autolizatach pierwotniaków żwaczowych, są głównie odpowiedzialne za proteolizę [27, 57, 71]. Proteinaza *Entodinium caudatum* jest trypsypodobna. Ze względu na specyficzność budowy enzym ten nie rozkłada wszystkich wiązań. Żywe komórki pierwotniaków hydrolizują 36% wiązań, a ekstrakt bezkomórkowy 42% [1].

Zbadano enzym wyizolowany z pierwotniaków żwacza kóz. Masę cząsteczkową określono na 38 000. Przy rozdziale tego enzymu na Sefadexsie G-100 otrzymano trzy frakcje proteolityczne o charakterze cysteinowym [56]. Wykazano zróżnicowanie wielkości cząsteczki i aktywności proteinazy badanych czterech szczepów *Entodinia* i dwóch *Holotricha* [42]. Nie wyjaśniono dokładnie, czy pierwotniaki wytwarzają proteinazy przechodzące do otaczającego podłoża płynnego. Stwierdzono w podłożu obecność proteinazy o dużej masie cząsteczkowej, charakterystycznej bardziej dla bakterii niż pierwotniaków. Badacze podają, że urzęsione pierwotniaki wydzielają enzymy proteolityczne do płynu żwaczowego, a aktywność proteolityczna bezkomórkowego płynu żwaczowego wzrasta wyraźnie w krótkim czasie po karmieniu [57]. Proteinazę *En. caudatum* hamuje całkowicie leupeptyna, częściowo N-etylomaleimid

oraz pepstatyna [23, 27]. U wszystkich orzęsków stężenie leucyloaminopeptydazy jest wysokie. Pozakomórkowy enzym orzęsków żwacza ma optymalną temperaturę działania przy 60°C [27, 50].

Pierwotniaki *Ophryoscolecidae* zwiększają rozkład nierozpuszczalnych białek ziarna łubinu, mączki rybnej, orzechów, śruty sojowej [70]. *Entodiniomorphid* rozkłada kazeinę, nie rozkłada natomiast albuminy surowicy [50].

Aktywność proteolityczna grzyba *N. frontalis* wiąże się z obecnością metaloproteiny o specyfice podobnej do specyfiki trypsyny. Aktywność proteolityczną szczepu *N. frontalis* opisali Wallace i Joblin [64]. Maksymalną proteolizę uzyskano po 3 dniach od inokulacji. We wczesnej fazie wzrostu grzyba aktywność proteolityczna była związana z cząstkami paszy, podczas gdy po 7 dniach 84% aktywności było pochodzenia pozakomórkowego. Aktywność miała charakter metaloproteiny. Pozakomórkowa proteaza jest niezbędna do rozkładu białka ścian komórek roślinnych, co sugeruje, że proteoliza może ułatwiać dostęp strzępeków grzyba do tkanki roślinnej [64]. Aktywność proteolityczna grzyba wiąże się z obecnością enzymu o specyfice podobnej do specyfiki trypsyny. Działalność proteolityczna *N. frontalis* nie jest jeszcze całkowicie poznana. Sugeruje się, że grzyb ten dostarcza aminokwasów, może ułatwiać działanie celulaz, ksylanaz i pektynaz przez rozkład ścian komórek roślinnych oraz bierze udział w rozkładzie białka [64, 66].

Optymalne pH aktywności proteinaz żwaczowych

Wyizolowana i oczyszczona proteinaza *B. amylophillus* wykazywała aktywność w szerokim zakresie pH między 4,5 a 12,0 z dwoma szczytami przy pH 6,0 i 11,5 [16, 17, 41].

Pozakomórkowy enzym pierwotniaków urzęsionych wykazywał aktywność proteolityczną przy pH 5,5; 6,0 i 7,5, co wskazywałoby na obecność trzech rodzajów proteinaz [55, 56]. Inni badacze, używając mieszaniny pierwotniaków żwaczowych, stwierdzili niską aktywność względem kazeiny w zakresie pH 5,0–9,0, bez wyraźnego optimum [27, 42]. Proteinaza *En. caudatum* wykazywała optymalną aktywność przy pH 6,5–7,0, natomiast peptydaza *En. caudatum* działała optymalnie przy pH 5,8–6,0 [1].

Badano *in vitro* wpływ pH na rozkład białka śruty sojowej, nasion bawełny, mączki mięsnej i kostnej oraz krwi przez pierwotniaki. Optymalne pH rozkładu białka śruty sojowej wynosiło 6,0–6,5, natomiast na rozkład białka śruty z nasion bawełny, mączki mięsnej, kostnej i krwi wpływ pH był mniej istotny. Tłumaczy się to różnicami w rozpuszczalności białka w zależności od pH środowiska [8].

Enzym proteolityczny *N. frontalis* wykazał optymalne działanie pH 7,5, natomiast przy pH 5,6 aktywność spadała do 77%, a przy pH 8,4 do 6,7% [64].

Inhibitory i aktywatory enzymów proteolitycznych w żwaczu

W badaniach nad charakterem proteinaz drobnoustrojowych żwacza zastosowano inhibitory syntetyczne, roślinne, drobnoustrojowe i zwierzęce. Działanie inhibitorów syntetycznych, takich jak PMSF, TLCK i TPCK, na aktywność proteolitycznych drobnoustrojów żwaczowych wykazało obecność proteinaz o charakterze serynowym i cysteinowym. Inhibitor DPPF hamuje aktywność proteinazy serynowej *B. amylophilus* w 87%, *B. ruminicola* w 26%, a mieszanych bakterii w 27,3% [13, 63]. Inhibitor PMSF hamuje *B. fibrisolvens* w 37% [24, 50]. Tiopeptyna hamuje aktywność proteiny *S. bovis* w 50%, a monoenzym w 13%. Leupeptyna hamuje proteinazę *E. caudatum* całkowicie, a pepstatyna oraz N-etylenomaleimid częściowo [23, 27].

Inhibitory trypsyny z nasion fasoli i soi hamowały aktywność proteinazy w 29,7–43,2%, przy czym skrajne stężenie użytych inhibitorów nie wpływało na zróżnicowanie stopnia inhibicji enzymu [19].

Inhibitorem aktywności proteolitycznej *N. frontalis* jest EDTA, TLCK i 1,10-fenantrolina [64].

Inhibitory pochodzenia mikrobiologicznego wywierają znaczny wpływ na aktywność proteinaz. Antypaina hamuje aktywność w 33, chymostatyna w 34, a leupeptyna w 43% [19]. Kazeina w stężeniu powyżej 3% (w/v) powoduje zahamowanie substratowe [15].

Wpływ paszy na aktywność proteolityczną drobnoustrojów w żwaczu

Szybkość rozkładu białka paszy zależy w dużym stopniu od stosowanej paszy. I tak, u owiec żywionych sianem i paszą treściwą szybkość rozkładu kazeiny, białka frakcji I z liści lucerny oraz albuminy wołu wynosiła odpowiednio: 16,3; 3,4 i 0,9 mg N białka/min, natomiast u owiec żywionych świeżą lucerną uzyskane wartości były większe [49, 69]. Króliczek [40] stwierdził współzależność między aktywnością proteolityczną treści żwacza a rodzajem paszy. Największy wzrost proteolizy wystąpił podczas skarmiania zielonki z lucerny w dwóch pierwszych stadiach jej wzrostu oraz trawy pastwiskowej u krów i siana z lucerny u jałówek. Otrzymane wartości były o 40% większe od wartości wyjściowej. Przypuszczalnie było to skutkiem dodatkowego działania enzymów proteolitycznych obecnych w roślinach zielonych. Z pracy Guščin i Kolenko [29] wynika, że liczba bakterii proteolitycznych uzależniona jest od dawki pokarmowej. Przy żywieniu paszą treściwą i sianem stwierdzono 12% bakterii proteolitycznych w stosunku do ogólnej liczby bakterii. Zastąpienie siana kazeiną spowodowało zmniejszenie się ich liczby do 8%, przy dodatku sacharozy (3 g/kg m.c. zwierzęcą) do 5,2%, a w przypadku zastąpienia białka siarczanem amonu uzyskano zaledwie 1,4% bakterii proteolitycznych.

W porównaniu z ogólną liczbą beztlenowców, liczba bakterii proteolitycznych u krów żywionych słomą i paszą treściwą oraz sianem była mniejsza niż u krów żywionych trawą i paszą treściwą [47].

Inni badacze stwierdzili, że aktywność pełnego płynu żwaczowego jest względnie stała i dość wysoka, nawet przed karmieniem, i nie istnieje ścisła zależność między aktywnością proteolityczną a dietą [9, 10].

Ostatnio prowadzone są badania nad wyizolowaniem z zielonych liści lucerny (*Medicago sativa* L.) białka określanego jako frakcja I chloroplastów. Jest nią karboksylaza rybulozo-1,5-dwufosforanowa (EC 4.1.1.39), stanowiąca 30–40% białka rozpuszczalnego. Białko to jest szybko rozkładane w treści *in vivo* i *in vitro*. Pomyślnie otrzymanie frakcji I w skali preparatywnej stwarza możliwości wykorzystania jej do badań nad enzymami proteolitycznymi żwacza [32, 34, 35, 48].

Charakter enzymów proteolitycznych bakterii żwaczowych różni się w zależności od rodzaju skarmianej paszy. U krów żywionych sianem stwierdzono enzymy typu cysteinowego, natomiast żywionych trawą i paszą treściwą — typu serynowego [51].

Literatura

- [1] Abou-Akkada A.R., Howard B. H. 1962. The nitrogen metabolism of *Entodinium*. The biochemistry of rumen protozoa. *Biochem. J.* **82**: 312–320.
- [2] Abou-Akkada A.R., Blackburn T.H. 1963. Some observation on the nitrogen metabolism of rumen proteolytic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **31**: 461–469.
- [3] Allison M. J. 1969. Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* **29**: 797–807.
- [4] Amos H. E., Burdick D., Huber T.L. 1974. Effect of formaldehyde treatment of sunflower and soybean meal on nitrogen balance in lambs. *J. Anim. Sci.* **38**: 702–707.
- [5] Annison E. F. 1956. Nitrogen metabolism in the sheep. Protein digestion in the rumen. *Biochem. J.* **64**: 705–714.
- [6] Appleby J. Ch. 1955. The isolation and classification of proteolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.* **12**: 526–533.
- [7] Barej W., Kulasek G. 1972. Udział amoniaku i mocznika w produktach azotowych u zwierząt przeżuwających. *Zesz. Nauk. SGGW, Wet.* **2**, Warszawa.
- [8] Bartle S. J., Preston R. L. 1986. *In vitro* evaluation of the pH effect on protein degradation and synthesis by rumen microorganisms. *Nutr. Rep. Int.* **34**: 1001–1009.
- [9] Blackburn T.H., Hobson P.N. 1960 a. Proteolysis in the sheep rumen by whole and fractionated rumen contents. *J. Gen. Microbiol.* **22**: 272–281.
- [10] Blackburn T. H., Hobson P. N. 1960 b. Isolation of proteolytic bacteria from the sheep rumen. *J. Gen. Microbiol.* **22**: 282–289.
- [11] Blackburn T. H., Hobson P. N. 1960 c. Breakdown of protein and proteolytic activity in the sheep rumen at different times after feeding. *J. Gen. Microbiol.* **22**: 290–294.
- [12] Blackburn T. H., Hobson P. N. 1962. Further studies on the isolation of proteolytic bacteria from the sheep. *J. Gen. Microbiol.* **29**, 69–81.
- [13] Blackburn T. H. 1968 a. Protease production by *Bacteroides amylophilus* strain H18. *J. Gen. Microbiol.* **53**: 27–36.

- [14] Blackburn T. H. 1968 b. The protease liberated from *Bacteroides amylophilus* strain H18 by mechanical desintegration. *J. Gen. Microbiol.* **53**: 37–51.
- [15] Blackburn T. H., Hobson P.N., 1960. The degradation of protein in the rumen of the sheep and redistribution of the protein nitrogen after feeding. *Br. J. Nutr.* **14**: 445–456.
- [16] Blackburn T.H. 1969. Cell-bound protease of *Bacteroides amylophilus*. *Bacteriol. Proc.*, 58 abstr. Amer. Soc. Microbiol.
- [17] Blackburn T. H., Hullah W. A. 1974. The cell-bound protease of *Bacteroides amylophilus* H18. *Can. J. Microbiol.* **20**: 435–441.
- [18] Borchers R. 1965. Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. *J. Anim. Sci.* **24**: 1033–1038.
- [19] Brock F. M., Forsberg C. W., Buchanan-Smith J. G. 1982. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 561–569.
- [20] Chalupa W. 1975. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. *J. Dairy Sci.* **58**: 1198–1218.
- [21] Cizuk P., Murphy M. 1982. Digestion of crude protein and organic matter of leaves by rumen microbes in vitro. *Swed. J. Agric. Res.* **12**: 35–39.
- [22] Clarke R. T. J. 1961. Proteolytic rumen anaerobic (note). *N. Z. J. Agric. Res.* **4**: 298–299.
- [23] Coleman G. S. 1983. Hydrolysis of fraction I leaf protein and casein by rumen Entodipiomorphid protozoa. *J. Appl. Bacteriol.* **55**: 111–118.
- [24] Cotta M. A., Hespell R. B. 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 51–58.
- [25] Dolgov I. A. 1973. Proteolytic activity of the rumen microflora and *S. bovis*. *Biul. All-union Reser. Inst. Physiol., Biochem. Nutr. Farm Anim.* **2**: 37–40.
- [26] Fulghum R. S., Moore W. E. C. 1963. Isolation, enumeration and characteristics of proteolytic ruminal bacteria. *J. Bacteriol.* **85**: 808–815.
- [27] Forsberg C. W., Lovelock L. K. A., Krumholz L., Buchanan-Smith J. B. 1984. Protease activities of rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 101–110.
- [28] Giesecke D. 1962. Proteolytische Bakterienstämme aus dem Rinderpansen. *Zbl. Bakteriol. Parasit. Infektkr. Hig.* **186**: 170–178.
- [29] Guščin C., Kolenko J. 1968. Količestvo proteolitičnih mikroorganizmov rubca i slepoj kiški pri raznom urovnie biefka i legko pierevarinnych uglevodov v racionie oviec. *Trudy BHII Fizjol. Bioch. Sel-choz. Živ.* **1**: 47–51.
- [30] Henderickx H., Martin J. 1963. In vivo study of the nitrogen metabolism in the rumen. *C. R. Rech. I. R. S. I. A. (Ins. Rech. Sci. Ind. Agr.) Bruxelles* **31**: 32–56.
- [31] Hartnell G. F., Satter L. D. 1978. Effect of Masonex/Hemicellulose extract/on protein degradation by rumen microorganisms in vitro and in vivo. *J. Anim. Sci.* **47**: 935–943.
- [32] Hazlewood G. P., Nugent J. H. A. 1978. Leaf fraction I protein as a nitrogen source for the growth of a proteolytic rumen bacterium *J. Gen. Microbiol.* **106**: 369–371.
- [33] Hazlewood G. P., Edwards R. 1981. Proteolytic activities of a rumen bacterium *Bacteroides ruminicola* R8/4. *J. Gen. Microbiol.* **125**: 11–15.
- [34] Hazlewood G. P., Jones G. A., Mangan J. L. 1981. Hydrolysis of leaf fraction I protein by the proteolytic rumen bacterium *Bacteroides ruminicola* R8/4. *J. Gen. Microbiol.* **123**: 223–232.
- [35] Hazlewood G. P., Orpin C. G., Greenwood Y., Black M. E. 1983. Isolation of proteolytic rumen bacteria by use of selective medium containing leaf fraction I protein (ribulosebiphosphate carboxylase). *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1780–1784.
- [36] Hungate R. E. 1966. The rumen bacteria conversion of nitrogen materials. In: *The rumen and its microbes*, pp. 281–328, Acad. Press. New York.
- [37] Hunt W. G., Moore R. C. 1958. The proteolytic system of a gram negative rod isolated from the bovine rumen. *Appl. Microbiol.* **6**: 36–38.
- [38] Jones W. T., Mangan J. L. 1976. Large-scale isolation of fraction I leaf protein(18S) from lucerne (*Medicago sativa* L.). *J. Agric. Sci., Camb.* **86**: 495–501.

- [39] Kopečný J., Wallace J. 1982. Cellular location and source properties of proteolytic enzymes of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1026–1033.
- [40] Króliczek A. 1972. Aktywność enzymatyczna płynu żwacza krów i jałówek jako funkcja żywienia. *Zesz. Nauk. WSR Wrocław*, **97**, *Zoot.* **28**: 47–80.
- [41] Lesk F. M., Blackburn T. H. 1971. Purification of *Bacteroides amylophilus* protease. *J. Bacteriol.* **106**: 354–402.
- [42] Lockwood B. C., Coombs G. H., Williams A. G., 1988. Proteinase activity in rumen ciliate protozoa. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2605–2614.
- [43] Mahadevan S., Erfle J. D., Sauer F. D. 1979. A colorimetric method for the determination of proteolytic degradation of feed proteins by rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* **48**: 947–953.
- [44] Mahadevan S., Erfle J. D., Sauer F. D. 1980. Degradation of soluble and insoluble proteins by *Bacteroides amylophilus* protease and by rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* **50**: 723–728.
- [45] Mangan I. L. 1972. Quantitative studies on nitrogen metabolism in the bovine rumen. The rate of proteolysis of casein and ovalbumin and the release and metabolism of free amino acids. *Br. J. Nutr.* **27**: 261–283.
- [46] Mehra U. R., Chetal U., Singh B. P., Saxena Y. R. 1978. Proteolytic activity of rumen microorganisms of cattle and buffalo. *J. Dairy Sci.* **61**: 1573–1578.
- [47] Nugent J. H. A., Mangan J. L. 1978. Rumen proteolysis of fraction I leaf protein casein and bovine serum albumin. *Proc. Nutr. Soc.* **37**: 48A.
- [48] Nugent J. H. A., Mangan J. L. 1981. Characteristics of the rumen proteolysis of fraction I(18S) leaf protein from lucerne (*Medicago sativa* L.) *Br. J. Nutr.* **46**: 39–58.
- [49] Nugent J. H. A., Jones N. T., Jordan D. J., Mangan J. L. 1983. Rates of proteolysis in the rumen of the soluble proteins, casein, fraction I (18S) leaf protein, bovine serum albumin and bovine submaxillary mucoprotein. *Br. J. Nutr.* **50**: 357–368.
- [50] Pisulewski R., Ryś R. 1974. Ochrona białek paszowych i aminokwasów syntetycznych przed mikrobiologicznym rozkładem w żwaczu. *Post. Nauk Roln.* **1**: 124–136.
- [51] Prins R. A., van Rheenen D. L., van't Klooster A. T. 1983. Characterization of microbial proteolytic enzymes in the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**: 585–595.
- [52] Russel J. B., Bottje W. G., Cotta M. A. 1981. Degradation of protein by mixed cultures of rumen bacteria. Identification of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic rumen bacterium. *J. Anim. Sci.* **53**: 242–252.
- [53] Schlottke E. 1956. Untersuchungen über die Verdauungsfermente von Infusionen aus dem freien Wasser und aus dem Rinderpansen. *S. B. Natur. Ges. Rostock* **3**: 59.
- [54] Shinci S., Kandatsu M. 1980. The extracellular proteolytic activity of cell-free rumen liquid incubation medium of rumen ciliate protozoa and their extracts. *Bull. Azabu Univ. Vet. Med.* **1**: 47–53.
- [55] Shinci S., Kandatsu M. 1981. On some properties of extracellular and intracellular proteolytic activity of ciliate protozoa. *Nippon Chikusan Gakkai Ho* **52**: 861–880.
- [56] Shinci S., Kandatsu M. 1983. On some properties of extracellular proteolytic activity of rumen ciliate protozoa. *Nippon Chikusan Gakkai Ho* **54**: 290–296.
- [57] Shuji S., Itoh T., Abe M., Kandatsu M. 1986. Effect of rumen ciliate protozoa on the proteolytic activity of cell free rumen liquid. *Japan J. Zoot. Sci.* **57**: 89–96.
- [58] Sym E. 1938. Hydrolasenwirkung des Blindsackinhaltes des Pferdes und des Panseninhaltes des Rindes. I Teil. Einleitung. Allgemeinen Methoden und proteolytische Wirkungen. *Acta Biol. exp. (Varsovie)* **12**: 192–210.
- [59] Tamminga S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.* **49**: 1615–1630.
- [60] Wallace R. J., Kopečný J. 1983. Breakdown of diazotized and synthetic substrates by rumen bacterial proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 212–217.

- [61] Wallace R. J. 1983. Hydrolysis of C¹⁴-labeled proteins by rumen microorganisms and by proteolytic enzymes prepared from rumen bacteria. *Br. J. Nutr.* **50**: 345–355.
- [62] Wallace R. J., Brammal M. L. 1985. The role of different species of bacteria in the hydrolysis of protein in the rumen. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 821–832.
- [63] Wallace R. J. 1985. Synergism between different species of proteolytic rumen bacteria. *Curr. Microbiol.* **12**: 59–64.
- [64] Wallace R. J., Joblin K. N. 1985. Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Mikrobiol. Lett.* **29**: 19–25.
- [65] Wallace R. J. 1985. Adsorption of soluble protein to rumen bacteria and the role of adsorption in proteolysis. *Br. J. Nutr.* **53**: 399–408.
- [66] Wallace R. J., Munro C. A. 1986. Influence of the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* in the proteolytic activity of a defined mixture of the rumen bacteria growing on a solid substrates. *Lett. Appl. Microbiol.* **3**: 23–26.
- [67] Warner A. C. I. 1956. Proteolysis by rumen microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 749–762.
- [68] Worowski K. 1978. Mechanizm działania enzymów proteolitycznych. *Post. Hig. Med. Dośw.* **32**: 467–493.
- [69] Zawadzki Z., Zawadzki M. 1986. Proteolityczne właściwości mikroflory żwacza. *Med. Wet.* **42**: 43–45.
- [70] Zelter S. Z., Leroy F., Tissier J. P. 1970. Protection des proteines alimentaires contre la desamination bacterienne dans la rumen. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* **10**: 111–112.
- [71] Ushida K., Jouanny J. P. 1985. Effect of protozoa in rumen protein degradation in sheep. *Rep. Nutr. Develop.* **25**: 1075–1081.

Errata do publikacji
w *Postęпах Nauk Rolniczych*
nr 2/94, cz. I

1) s. 67, wiersz 8 od dołu: jest Celuloza, powinno być Celulaza;

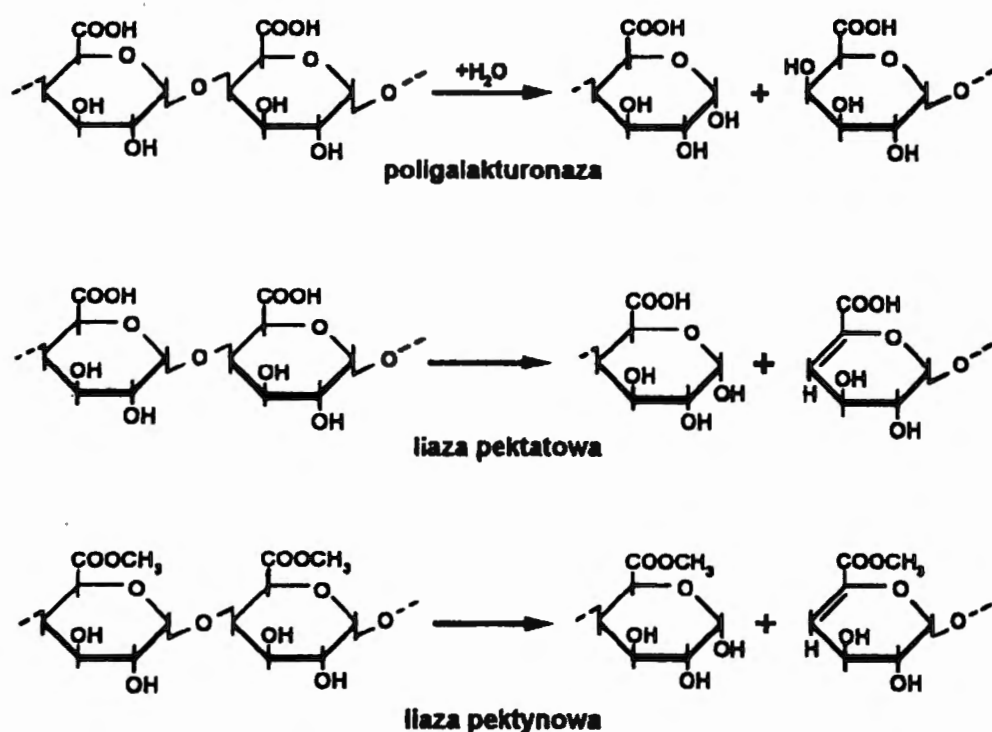
2) s. 68, tabela 1 — dotyczy zmiany w występowaniu enzymów:

	<i>B. succinogenes</i>	<i>R. albus</i>	<i>R. flavefaciens</i>	Pierwotniaki	Grzyby
1. Celulaza (EC 3.2.1.4)	+	+	+	+	+
2. Celobiasa (EC 3.2.1.21)	+	+			+
3. Egzo-β-glukozydaza (EC 3.2.1.74)		+			
4. Celobiohydrolaza (EC 3.2.1.91)		+	+		+

3) s. 69, wiersz 17 od dołu: jest celuloza, powinno być celulaza.

nr 3/94, cz. III i IV

1) s. 63 rysunek 1 powinien wyglądać następująco:



Rysunek 1. Hydrolityczny i transeliminacyjny rozkład substancji pektynowych wg Pilnika i Rombouts

2) s. 63 rysunek 1 powinien znaleźć się w części IV na s. 69 jako rysunek 1;

3) s. 70 rysunek 1 powinien znaleźć się na str. 71 jako rysunek 2.