

## 1. Wstęp

W konwencjonalnym ujęciu, pojęcie biotechnologii obejmuje szeroki zakres technologii wykorzystujących żywe organizmy (mikroorganizmy), względnie systemy lub procesy biologiczne w skali produkcyjnej (1). W tym ujęciu biotechnologia nie jest nową dziedziną wiedzy ponieważ przebieg wielu procesów biologicznych, na przykład fermentacji etanolowej, znany jest człowiekowi od stuleci. Warto zatem podkreślić, że o ogromnym zainteresowaniu biotechnologią w okresie ostatnich 10–15 lat, a ściślej o powstaniu nowej biotechnologii, zdecydował rozwój genetyki molekularnej i wykorzystanie metod inżynierii genetycznej (rekombinacji i transferu materiału genetycznego) w tworzeniu nowych struktur genetycznych żywych organizmów (2,3). Uzyskany postęp stworzył jednocześnie nieoczekiwane, potencjalne możliwości wzrostu produkcji roślinnej i zwierzęcej.

W świetle współczesnych opinii (3), o istotnym postępie w produkcji zwierzęcej zadecyduje szerokie wykorzystanie metod biotechnologicznych w takich dziedzinach jak: hodowla i rozród, ochrona zdrowia oraz żywienie zwierząt. W niniejszym opracowaniu przeglądowym zwrócono uwagę na niektóre aktualne oraz przyszłe możliwości wykorzystania biotechnologii w żywieniu zwierząt gospodarskich. Z zachowaniem logicznej kolejności przedstawiono metody służące poprawie wartości pokarmowej pasz, wykorzystaniu składników pokarmowych pasz w procesach trawienia i wchłaniania oraz ich wykorzystania w procesach przemiany pośredniej. Szczególną uwagę zwrócono na ich postęp uzyskany dzięki wykorzystaniu metod inżynierii genetycznej.

## 2. Metody biotechnologiczne a wartość pokarmowa pasz

### 2.1. Tworzenie nowych odmian roślin pastewnych

Niski poziom białka i niebilansowany skład aminokwasowy są zasadniczymi czynnikami ograniczającymi wartość pokarmową ziarna zbóż pastewnych: jęczmienia i kukurydzy. Aminokwasami limitującymi wartość pokarmową białka jęczmienia są kolejno: lizyna, treonina i histydyna (4,5). W przypadku ziarna kukurydzy aminokwasami limitującymi są lizyna, tryptofan i treonina (6). Jest więc rzeczą oczywistą, że poprawa wartości pokarmowej ziarna tych zbóż (poziomu białka i składu aminokwasowego) pozwoliłaby na istotne ograniczenie zużycia białka w żywieniu trzody chlewnej.

Dotychczasowe wysiłki badawcze zmierzające do poprawy wartości pokarmowej ziarna jęczmienia przedstawili ostatnio Shewry i Kreis (7) z ośrodka w Rothamstead. W ośrodku tym przyjęto cztery strategiczne kierunki poszukiwań, które winny przynieść postęp na drodze:

- a) obniżenia zawartości niskolizynowych białek zapasowych w bielmie ziarna,
- b) zmiany składu aminokwasowego białek zapasowych – zwiększenia zawartości lizyny w wybranych prolaminach,

- c) zwiększenia zawartości wysokolizynowych białek zapasowych w białmie ziarna,
- d) zwiększenia zawartości wolnych aminokwasów (lizyny i treoniny) w ziarnie.

W dotychczasowych badaniach stwierdzono jednak, że w większości przypadków, wszystkie te pożądane cechy, zidentyfikowane u naturalnych i sztucznych mutantów jęczmienia, są ujemnie skorelowane z wydajnością syntezy skrobi i tym samym wysokością plonów. Jednocześnie klasyczne metody hodowlane nie pozwalają na złamanie tej wysoce niepożądaną korelacji. Shewry i Kreis (7), wyrażają zatem nadzieję, że zastosowanie technik inżynierii genetycznej przyniesie postęp w przedmiotowych pracach. Jest to o tyle uzasadnione, że aktualnie dostępne metody inżynierii genetycznej pozwalają na identyfikację roślinnych genów regulacyjnych i strukturalnych oraz ich rekombinację, zgodnie z przyjętymi wymaganiami (8). Jednakże w przypadku jęczmienia, nie zidentyfikowano genów regulacyjnych co poważnie ogranicza postęp badawczy. Nie zdołano także przeprowadzić skutecznego transferu genetycznego – wprowadzenia zrekombinowanego materiału genetycznego do protoplastów jęczmienia i wyhodowania przekształconych genetycznie roślin. Można jednak optymistycznie sądzić, że wyhodowanie nowych, genetycznie przekształconych odmian jęczmienia, jest kwestią bliskiej przyszłości. Wskazują na to wyniki prac nad innymi zbożami (9,10).

Obok zbóż, przedmiotem zainteresowania biotechnologii i hodowli roślin są także rośliny strączkowe. Obecność substancji antyżywniowych w nasionach tych roślin (inhibitorów trypsyny, hemoaglutynin, związków cyjanogennych) poważnie ogranicza ich wartość pokarmową. Można więc sądzić (1), że odpowiednie wykorzystanie metod inżynierii genetycznej przyniesie wkrótce istotny postęp w dziedzinie hodowli tych roślin.

## 2.2. Biokonserwacja pasz zielonych

Straty składników pokarmowych zawartych w zielonej masie traw i roślin strączkowych, zachodzące podczas zbioru na siano, są istotną przyczyną nieefektywnego wykorzystania użytków zielonych w produkcji zwierzęcej. Alternatywnym rozwiązaniem jest tu niewątpliwie zakiszenie względnie chemiczna konserwacja traw i roślin motylkowych. Technikom tym towarzyszą z reguły niewielkie straty składników pokarmowych w zakiszonym, względnie konserwowanym materiale (11).

Rozwój biotechnologii może przynieść istotny postęp w dziedzinie technologii kiszonkarstwa. Można tu oczekiwać coraz szerszego wykorzystania kultur bakteryjnych oraz preparatów enzymatycznych jako dodatków kiszonkarskich. Na przykładzie sytuacji w Wielkiej Brytanii (12), można podać, że stosowane kultury bakteryjne to głównie szczepy takich bakterii, jak: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, a także *Pediococcus acidilactic* i *Streptomyces thermophilus*.

W warunkach doświadczalnych, kiszonki z traw przygotowane z dodatkiem kultur bakteryjnych, charakteryzują się podwyższoną strawnością substancji organicznej i białka ogólnego, a ich pobranie jest z reguły wyższe w porównaniu z kiszonkami kontrolnymi (13).

Większość stosowanych kultur bakteryjnych zawiera dodatkowo preparaty enzymów amylolytycznych, celulolitycznych, hemicelulolitycznych i proteolitycznych (12). Zdaniem Woodforda (14), dodatki enzymatyczne wpływają korzystnie na wartość pokarmową kiszonek, a jedynym jej mankamentem jest wysoki koszt produkcji. Wykorzystanie metod inżynierii genetycznej mogłoby wydatnie wpłynąć na wielkość produkcji tych preparatów, obniżyć ich koszt i zwiększyć zakres praktycznego zastosowania w produkcji.

Warto tu dodać, że o wzroście zainteresowania metodami biokonserwacji pasz zielonych w niedalekiej przyszłości mogą zdecydować względy natury ekologicznej, wykluczające stosowanie aktywnych związków chemicznych (kwas mrówkowy i jego sole), jako preparatów kiszonkarskich.

### 2.3. Biokonwersja pasz lignocelulozowych

Wykorzystanie potencjalnej wartości energetycznej pasz lignocelulozowych w żywieniu przeżuwaczy jest w pełni aktualnym zagadnieniem badawczym. Wynika to niewątpliwie z wielkości produkcji tych pasz, na drodze nieustającego procesu fotosyntezy. Zgodnie z bieżącymi szacunkami (15), roczna światowa produkcja pasz lignocelulozowych sięga 2.1 mld t, a udział słomy w masie tych pasz przekracza 50%.

O wykorzystaniu wartości energetycznej pasz lignocelulozowych w procesach fermentacyjnych zachodzących w żwaczu, decyduje zasadniczo struktura ścian komórkowych materiału roślinnego, zbudowanych z podstawowego węglowodanu strukturalnego, celulozy (40–45% suchej masy słomy). Włókna celulozowe tworzą tu swoistego rodzaju osnowę dla kompleksu hemicelulozy i ligniny. Ta ostatnia może dodatkowo tworzyć kompleksy ligninomineralne. W świetle współczesnych poglądów (16), przyjmuje się, że stopień krystalizacji włókien celulozowych oraz obecność ligniny w ściankach komórkowych, ograniczają w znacznej mierze podatność węglowodanów strukturalnych pasz lignocelulozowych (celulozy i hemicelulozy) na procesy mikrobiologicznego rozkładu w żwaczu. W efekcie, strawność pasz lignocelulozowych, a co za tym idzie, wielkość ich dobowego pobrania są w żywieniu przeżuwaczy zdecydowanie obniżone.

Aktualnie stosowane metody uszlachetniania pasz lignocelulozowych, a mianowicie metody fizyczne, chemiczne i biologiczne (17), poprawiają znacząco stopień wykorzystania wartości energetycznej tych pasz w żywieniu przeżuwaczy (15). Warto tu jednak podkreślić, że o ile istota metod fizycznych i chemicznych sprowadza się do rozbitcia kompleksu hemicelulozowo-ligninowego ścian komórkowych i udostępnienia węglowodanów strukturalnych, o tyle istotą metod biologicznych jest selektywna delignifikacja ścian komórkowych materiału roślinnego. Te ostatnie metody nie wymagają większych nakładów energetycznych, nieodłącznie związanych z metodami fizycznymi, ani też, nie stanowią zagrożenia dla środowiska naturalnego, co zwykle wiąże się z metodami chemicznymi.

W chwili obecnej znane są dwie grupy mikroorganizmów posiadających zdolność rozkładu pasz lignocelulozowych. Pierwsza, to liczne promieniowce hydrolizujące celulozę i hemicelulozę (18,19). Spośród tych bakterii jednak, jedynie niektóre gatunki należące do rodzaju *Streptomyces* i gatunek *Termonospora mesophila*, posiadają właściwości lignolityczne. Wysuwane są tu także wątpliwości co do rzeczywistej możliwości rozkładu ligniny przez bakterie (20).

Największe zainteresowanie jako organizmy lignolityczne budzą obecnie grzyby białej pleśni, rozkładające wszystkie podstawowe składniki ścian komórkowych: celulozę, hemicelulozę i ligninę. Warto tu zatem przytoczyć wyniki badań Agosina i in. (21,22), charakteryzujące potencjał i ograniczenia biokonwersji pasz lignocelulozowych przy użyciu grzybów białej pleśni. Wymienieni autorzy poddali wstępnej selekcji 75 dzikich szczepów grzybów białej pleśni zwracając uwagę na ich aktywność lignolityczną, celulolityczną i hemicelulolityczną oraz strawność *in vitro* słomy pszennej poddane procesowi biokonwersji (22). Spośród trzech wyselekcjonowanych gatunków, *Cyathus stercoreus* i *Dichomitus squalens*, charakteryzowały się przewagą aktywności hemicelulolitycznej nad aktywnością celulolityczną, natomiast *Phanerochaete chrysosporium* (gatunek o najwyższej aktywności lignolitycznej), hydrolizował nieselektywnie celulozę i hemicelulozę. W efekcie, zawartość ligniny w substracie (słomie pszennej), ulegała obniżeniu o 10 i 20% w przypadku dwóch pierwszych grzybów, a pozostawała na wyjściowym poziomie w przypadku biokonwersji przeprowadzonej przy użyciu *Phanerochaete chrysosporium*. Straty suchej masy substratu towarzyszące procesowi biokonwersji sięgały 15–20%.

Z żywieniowego punktu widzenia bardziej interesujące mogą być wyniki doświadczeń nad wielkością i tempem rozkładu przetworzonego materiału lignocelulozowego w żwaczu, przedstawione przez Agosina i in. (23). Odpowiednie wyniki uzyskane metodą woreczków nylonowych zawieszanych w żwaczu (24), przedstawiono w tabeli 1.

Zwraca tu uwagę wyraźna poprawa wielkości rozkładu substratu lignocelulozowego, przetworzonego w procesie biokonwersji. Delignifikacja istotnie zwiększyła stopień rozkładu celulozy na co wskazuje wzrost wykorzystania glukozy. W przypadku hemicelulozy, ksylanów i arabanów, zwraca uwagę niewielki rozkład ksylozy i znaczna poprawa wykorzystania arabinozy.

Tabela 1

**Wpływ grzybowej delignifikacji na tempo i wielkość rozkładu węglowodanów strukturalnych słomy pszennej w żwaczu (23)**

Gatunek białej pleśni	Parametr	Ściana komórkowa	Glukoza	Ksyloza	Arabinoza
kontrola	tempo rozkładu (%/h)	3	4	4	4
	wielkość rozkładu (%)	48	58	56	61
<i>Cyathus stercorius</i>	tempo rozkładu (%/h)	4	6	4	3
	wielkość rozkładu (%)	60	71	62	91
<i>Dichomitus squalens</i>	tempo rozkładu (%/h)	4	4	7	4
	wielkość rozkładu (%)	63	71	59	73
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	tempo rozkładu (%/h)	2	3	2	6
	wielkość rozkładu (%)	55	64	61	74

Wspomniano już, że naturalnie występujące organizmy lignolityczne (promieniowce i grzyby) nie są dostatecznie selektywne i rozkładają celulozę i hemicelulozę w procesie biokonwersji materiałów lignocelulozowych. Stąd prace zmierzające do wytworzenia selektywnie lignolitycznych szczepów białej pleśni, koncentrujące się głównie na wysoce lignolitycznym gatunku, *Phanerochaete chrysosporium*. W wyniku prac genetycznych uzyskano do chwili obecnej nowe szczepy tego gatunku (25,26), zachowujące oryginalną aktywność lignolityczną przy niemal całkowitym braku aktywności celulolitycznej.

Wraz z postępami biotechnologii należy oczekiwać wykorzystania metod inżynierii genetycznej w pracach nad doskonaleniem delignifikujących bakterii i grzybów. Aktualnie prowadzone są prace nad strukturą genetyczną zarówno promieniowców jak i grzybów białej pleśni, przede wszystkim *Phanerochaete chrysosporium* (1).

Biokonwersja pasz lignocelulozowych jest niewątpliwie metodą przyszłości. Należy jednak krytycznie spojrzeć na jej ograniczenia. Do istotnych należy brak specyficznie selektywnych organizmów lignolitycznych, znajdujących praktyczne zastosowanie w skali produkcyjnej. Istotnym ograniczeniem technologicznym może być potrzeba sterylizacji substratu, warunkująca pożądany rozwój lignolitycznego organizmu (20). Ujemną stroną biokonwersji jest także stosunkowo długi czas trwania tego procesu (15–20 dni), niezbędny dla uzyskania pożądanego efektu delignifikacji materiału lignocelulozowego.

#### 2.4. Tworzenie przemysłowych szczepów bakteryjnych produkujących aminokwasy niezbędne

Mikrobiologiczna synteza L-lizyny na skalę przemysłową, której wielkość w skali rocznej sięga 34 000 t (27), pozwala na bezpośrednie uzupełnianie niedoboru tego aminokwasu w żywieniu trzody chlewnej i drobiu. W dziedzinie tej odnotowano również istotny postęp dzięki wykorzystaniu technik inżynierii genetycznej, rekombinacji i transferu materiału genetycznego. Przykładem mogą być tu prace Reverenda i in. (28), którzy powieliли gen syntezy 2,3-dwuhydro-pikolinianu, kluczowego enzymu w procesie syntezy lizyny, a następnie, wykorzystując plazmid

pBR322, wprowadzili zrekombinowany materiał genetyczny do lizynowego szczepu TOCR 21 *E. coli*. W efekcie uzyskano istotny wzrost wydajności syntezy lizyny przez nowo wytworzony szczep *E. coli*.

### 3. Metody biotechnologiczne a wykorzystanie składników pokarmowych w procesach trawienia i wchłaniania

#### 3.1. Zastosowanie preparatów enzymów trawiennych

Obecność niestrawnych węglowodanów,  $\beta$ -glukanów w ziarnie jęczmienia oraz pentozanów i pektyn w ziarnie żyta i nasionach rzepaku, wpływa ujemnie na wykorzystanie tych pasz przez drób i trzodę chlewną. Skłania to do poszukiwania preparatów enzymatycznych, charakteryzujących się odpowiednią aktywnością, uzupełniających spektrum enzymatyczne przewodu pokarmowego wymienionych gatunków.

W doświadczeniach na rosnących kurczętach (brojlerach), żywionych mieszankami o wysokim udziale jęczmienia (29), uzyskano istotną poprawę przyrostów ptaków i wykorzystania paszy, przy zastosowaniu preparatu  $\beta$ -glukanazy jako dodatku paszowego. W podobnych doświadczeniach, podanie preparatu enzymów pektynolitycznych, przynosiło poprawę wskaźników produkcyjnych u kurcząt żywionych mieszankami zawierającymi żyto (30) lub nasiona rzepaku (31).

W żywieniu świri przeprowadzono doświadczenia nad efektywnością nie oczyszczonego preparatu bakteryjnej amylazy, zawierającego prawdopodobnie  $\beta$ -glukanazę (32). Preparat ten wprowadzony do mieszanek o wysokiej zawartości jęczmienia, istotnie poprawił wskaźniki produkcyjne (przyrosty masy ciała i wykorzystanie paszy), a także zwiększał strawność energii i azotu podawanych mieszanek.

Wykorzystanie enzymatycznych dodatków paszowych w skali produkcyjnej jest w znacznym stopniu ograniczone wysokim kosztem produkcji tych preparatów. Wspomiano o tym ograniczeniu przy omawianiu perspektyw biokonserwacji pasz zielonych. Warto też podkreślić, że metody inżynierii genetycznej mogą znakomicie przyczynić się do wzrostu produkcji preparatów enzymatycznych i obniżenia ich ceny, przy czym, będą to prawdopodobnie preparaty o ściśle zdefiniowanym spektrum enzymatycznym i wysokiej aktywności.

#### 3.2. Pośrednie sterowanie przemianami żwaczowymi

Przebieg procesów fermentacyjnych zachodzących w żwaczu przy udziale symbiotycznych bakterii, pierwotniaków i grzybów, decyduje o ilości i składzie jakościowym produktów fermentacyjnych wchłanianych z przewodu pokarmowego. Z kolei, ilość i jakość wchłanianych produktów są ściśle powiązane z wielkością efektu produkcyjnego.

W poszukiwaniu możliwości sterowania przebiegiem procesów zachodzących w żwaczu zwrócono, między innymi, uwagę na aktywność jonoforowych antybiotyków paszowych (33,34). Stosunkowo dużą popularność zyskały tu monensin i lasalocid, będące produktami fermentacji *Streptomyces* (*S. cinnamonensis* i *S. lasaliensis*). Antybiotyki te oddziałują wybiórczo na przebieg transportu biologicznego jonów metali (Na, K, Ca, Mg), przez błony komórkowe Gram<sup>+</sup> i Gram<sup>-</sup> bakterii żwaczowych (33), wpływając wielokierunkowo na ostateczny wynik przemian żwaczowych.

Najczęściej obserwowanym efektem podawania antybiotyków paszowych jest obniżony stosunek kwasu octowego do kwasu propionowego (C<sub>2</sub>:C<sub>3</sub>), w sumie lotnych kwasów tłuszczowych w żwaczu. Jest to wynikiem selektywnej eliminacji Gram<sup>+</sup> gatunków bakterii żwacza odpowiedzialnych za produkcję kwasu octowego (35). Korzystnym efektem jest także negatywny wpływ jonoforów na wzrost bakterii kwasu mlekowego, co zapobiega występowaniu

kwasicy (36). Antybiotyki te nie hamują jednocześnie wzrostu bakterii kwasu propionowego, wykorzystujących kwas mlekowy jako substrat (37,38). Omawiane związki to także inhibitory procesu metagenezы w żwaczu. W warunkach doświadczalnych wykazano, że monensin może ograniczać produkcję metanu i tym samym straty energii dawki pokarmowej o 30% (39).

Do istotnych efektów jonoforów, które zasługują na nieco więcej uwagi, należy zaliczyć ujemny wpływ tych związków na procesy rozkładu białek paszowych i syntezy białka mikroorganizmów. Wykazano, że monensin zmniejsza stopień rozkładu białka paszowego w zakresie od 15% (40) do 55% (41). Niepożądanym efektem jest natomiast hamujące oddziaływanie jonoforów na wydajność energetyczną i wielkość dobowej syntezy białka mikroorganizmów w żwaczu. Wartość tego ostatniego parametru ulegała obniżeniu w zakresie od 15% (40) do 33% (41). Obserwowane efekty antybiotyków paszowych są jednak w znacznej mierze zależne od stopnia adaptacji mikroorganizmów żwacza (42). Dlatego też, po odpowiednim okresie podawania antybiotyku, nie należy oczekiwać istotnych zmian w dobowym przepływie białka przez dwunastnicę (42).

W stosunku do aktualnie stosowanych antybiotyków paszowych z grupy jonoforów, wysuwane są liczne zastrzeżenia dotyczące głównie ich niskiej selektywności, toksyczności, a także występowania ich pozostałości w produktach zwierzęcych (43). Wydaje się zatem, że wykorzystanie nowoczesnych metod biotechnologicznych w pracach nad szczepami bakteryjnymi wytwarzającymi antybiotyki, mogłoby pozwolić na uzyskanie nowych, bardziej selektywnych preparatów. Można też oczekiwać, że nowa, uzyskana metodami inżynierii genetycznej, generacja antybiotyków paszowych, będzie spełniała wymagania prawne dotyczące toksyczności i dopuszczalnego poziomu pozostałości w tkankach zwierzęcych.

### 3.3. Bezpośrednie sterowanie przemianami żwaczowymi

Bezpośrednie sterowanie przebiegiem procesów żwaczowych, przy użyciu szczepów bakterii i grzybów uzyskanych metodami inżynierii genetycznej, budzi obecnie ogromne zainteresowanie. Wyrazem tego są niewątpliwie liczne opracowania przeglądowe przedstawiające stan aktualny oraz perspektywy badań w przedmiotowym zakresie (44,45,46).

Współcześnie, stosunkowo dużo uwagi poświęca się szczepom bakteryjnym odpowiedzialnym za rozkład pasz lignocelulozowych w żwaczu. Naturalnie występujące bakterie nie posiadają bowiem aktywności lignolitycznej, a jedynie nieliczne gatunki wykazują zdolność jednoczesnego rozkładu celulozy i hemicelulozy (*Ruminococcus albus*). Inne dominujące gatunki żwaczowe wykazują wąską aktywność celulolityczną (*Bacteroides succinogenes*) lub hemicelulolityczną (*Bacteroides ruminicola*).

Wykorzystanie metod inżynierii genetycznej w pracach nad nowymi szczepami bakterii żwacza mogłoby wydatnie przyczynić się do uzyskania organizmów o poszerzonym spektrum aktywności enzymatycznej. Wstępne prace w tym zakresie zostały już podjęte. Warto zatem zwrócić uwagę na odkrycie plazmidów w komórkach celulolitycznych bakterii żwacza (47,48), które mogą potencjalnie służyć jako nośniki (wektory) materiału genetycznego, pomiędzy tymi komórkami oraz komórkami *E. coli* i *B. subtilis* (49). Do ważnych osiągnięć należy też zaliczyć udane przeniesienie genów celulaz z *Bacteroides succinogenes* (50) i *Butyrivibrio A-46* (51), do komórek *E. coli*, przy użyciu specyficznych wektorów plazmidowych tego ostatniego mikroorganizmu. Prace te pozwoliły na podjęcie systematycznych badań biochemicznych nad właściwościami celulaz dominujących gatunków bakterii żwacza.

Przedmiotem badań biotechnologicznych jest także genetyczne sterowanie składem aminokwasowym białek bakteryjnych syntetyzowanych w żwaczu. Niedobór metioniny, lizyny, argininy i histydyny w białku bakteryjnym obserwowali Storm i Ørskov (52). W dotychczasowych pracach zdołano uzyskać chimerę bakteryjnego plazmidu (*E. coli*) z syntetyczną sekwencją

nukleotydową (DNA), kodującą syntezę oligopeptydu zbudowanego z lizyny, leucyny, metioniny i treoniny (53). Komórki *E. coli* nie były jednak zdolne do syntezy tego oligopeptydu. Większym sukcesem zakończyły się podobne prace Jaynesa i in. (54), którzy w komórkach *E. coli* uzyskali ekspresję chimerycznego plazmidu, kodującego syntezę białka o podwyższonej zawartości lizyny, tryptofanu, metioniny, izoleucyny i treoniny.

Przedstawione osiągnięcia wskazywałyby na znaczny potencjał metod inżynierii genetycznej i bliską możliwość uzyskania odpowiednio zmodyfikowanych szczepów bakterii żwaczowych. Następnym etapem prowadzonych prac byłoby bowiem przeprowadzenie transferu genów o ściśle określonej ekspresji, z komórek *E. coli* lub *B. subtilis*, do wybranych gatunków bakterii żwacza. W przypadku genów celulaz przedmiotem transferu mogłyby być gatunki hemocelulolityczne (*Bacteroides ruminicola*). Natomiast geny syntezy białek o pożądanym składzie aminokwasowym mogłyby zostać wbudowane do genomów dominujących gatunków żwaczowych z rodzaju *Ruminococcus* i *Bacteroides*.

Niezależnie od uzyskanego postępu, perspektywa otrzymania nowych szczepów bakteryjnych i wykorzystania ich do sterowania procesami żwaczowymi jest odległa. Zasadniczą przeszkodą jest tu niewątpliwie ograniczona znajomość takich dziedzin jak: genetyka, biochemia i fizjologia bakterii żwaczowych (45,46). Warto też zaznaczyć, że o ile dwie pierwsze dziedziny mogą być odnoszone i porównywane do biologii bardziej znanych gatunków (*E. coli*, *E. subtilis*) o tyle właściwości fizjologiczne omawianych mikroorganizmów nie są znane.

W ocenie właściwości fizjologicznych bakterii żwaczowych na szczególną uwagę zasługują te cechy, które decydują o przystosowaniu do specyficznych warunków żwacza (45). Zachowanie zdolności przeżycia i ekspresji metabolicznej w złożonym ekosystemie żwacza przez nowe szczepy bakteryjne, uzyskane metodami inżynierii genetycznej, będzie zatem decydowało o powodzeniu lub też niepowodzeniu prowadzonych prac.

## **4. Metody biotechnologiczne a wykorzystanie składników pokarmowych w procesach przemiany pośredniej (implikacje żywieniowe)**

### **4.1. Sterowanie procesami laktacji u bydła**

Przebieg procesów fizjologicznych związanych z produkcją mleka (mammogeneza, laktogeneza, laktopoeza), podlega kompleksowej regulacji hormonalnej (55). W procesach tych, szczególnie w okresie laktacji, istotną rolę odgrywa przysadkowy hormon wzrostu (GH), wykazujący wyraźne właściwości laktogenne. Sekrecja tego hormonu kontrolowana jest przez neuropeptydy podwzgórza, somatoliberynę (GH-RH) i somatostatynę (GH-IF), a jego oddziaływanie na metabolizm organizmu zwierzęcego ma charakter bezpośredni lub pośredni, przy współdziałaniu somatomedyn (IGF-I i IGF-II).

O możliwości wykorzystania laktogennej właściwości GH w skali produkcyjnej zdecydowały dopiero dokonania w dziedzinie inżynierii genetycznej, a mianowicie uzyskanie zrekombinowanych szczepów *E. coli*, wytwarzających w skali technicznej, właściwe różnym gatunkom typy reGH (56).

W najnowszych pracach poświęconych laktogennej właściwości GH (55,56,57,58), przyjmuje się, że hormon ten w sposób wielokierunkowy, oddziałuje na dystrybucję substratów metabolicznych w organizmie zwierzęcym, a mianowicie, zwiększa stopień wykorzystania tych substratów przez gruczoł mlekowy, kosztem pozostałych tkanek. Zwiększony przepływ krwi przez ten gruczoł, obserwowany jako efekt podawania GH (59), może mieć także istotne znaczenie dla procesu laktacji.

W ocenie implikacji żywieniowych związanych z podawaniem GH lub reGH i zwiększoną wydajnością mleczną krów, na uwagę zasługują różnice pomiędzy doświadczeniami krótkimi

(1–2 tygodni) i doświadczeniami ciągłymi, obejmującymi z reguły przeważającą część okresu laktacji. W przypadku tych pierwszych, przy wzroście wydajności mlecznej wahającym się zależnie od warunków doświadczalnych w zakresie od 10–30%, pobranie paszy przez zwierzęta pozostawało na niezmiennym poziomie; częściej jednak ulegało znacznemu obniżeniu, sięgającemu 5–20% (57,58). Wzrost wydajności mlecznej uzyskany w tych doświadczeniach mógł odbywać się jedynie kosztem rezerw organizmu zwierzęcego. W doświadczeniach ciągłych natomiast, przy wzroście wydajności mlecznej sięgającym również 10–30%, krowy zwiększały wyraźnie pobranie paszy (5–15%), pokrywając tym samym zwiększone potrzeby produkcyjne. Odpowiedni wzrost pobrania paszy wymagał jednak 5–6 tygodni okresu adaptacyjnego. Warto tu podkreślić, że wspomniane doświadczenia krótkoterminowe nie mogą być miarodajne z żywieniowego punktu widzenia.

W świetle przedstawionych doświadczeń, uzasadniony jest postulat (55), podjęcia szeroko zakrojonych doświadczeń żywieniowych, dotyczących wielkości i dynamiki potrzeb pokarmowych krów mlecznych w warunkach hormonalnej stymulacji (GH, reGH) produkcji mleka. Niezbędne będzie też uzupełnienie tych doświadczeń studiami nad dynamiką rezerw tkankowych (tempem ich odbudowy), a także wydajnością mleczną i płodnością zwierząt w następujących cyklach produkcyjnych.

Podobne implikacje żywieniowe mogą być wynikiem stosowania GH–RH (60) czy też immunologicznej neutralizacji somatostatyny (61), pozwalających również na uzyskanie wzrostu wydajności mlecznej przeżuwaczy.

#### 4.2. Sterowanie procesami wzrostu

Wzrost zwierząt, podobnie jak proces laktacji, podlega złożonej regulacji hormonalnej (62), w której kluczowe znaczenie posiada przysadkowy hormon wzrostu (GH), wraz z towarzyszącymi mu neurohormonami podwzgórza (GH–RH, GH–IF).

W ocenie aktywności metabolicznej GH u rosnących zwierząt wyróżnia się przede wszystkim stymulujące oddziaływanie tego hormonu na anaboliczne procesy podziału komórkowego, wzrostu tkanki kostnej i tkanki mięśniowej. GH stymuluje jednocześnie kataboliczny proces lipolizy oraz obniża stopień wykorzystania glukozy przez tkanki obwodowe (63). W ostatecznym efekcie hormonalnej redystrybucji substratów metabolicznych, w składzie chemicznym organizmu zwierzęcego następują istotne zmiany, sprowadzające się do wzrostu stosunku tkanki mięśniowej do tkanki tłuszczowej. Obserwowana jest też istotna poprawa wykorzystania paszy (62). Przy czym, ujemny wpływ GH na rozwój tkanki tłuszczowej może odbijać się na wielkości przyrostów masy ciała.

Wielkość efektów produkcyjnych uzyskanych w wyniku podawania GH lub reGH, w doświadczeniach na różnych gatunkach zwierząt doświadczalnych, zestawili ostatnio Hart i Johnsson (63) oraz Karg (62). Warto tu przytoczyć np. wyniki dość licznych prac na rosnących świniami, wskazujące na możliwość uzyskania 0–16% poprawy przyrostów masy ciała i podobnej poprawy wykorzystania paszy. Notowano jednocześnie 0–25% wzrost zawartości białka w tkance mięśniowej, przy jednoczesnym zmniejszeniu grubości słoniny, sięgającym 0–20%.

Z implikacji żywieniowych, na które warto zwrócić uwagę, istotne znaczenie może mieć interakcja pomiędzy poziomem żywienia a sekrecją GH. Wykazano mianowicie, że u zwierząt o wysokim potencjale wzrostowym, ograniczenie poziomu żywienia względnie częstotliwości podawania paszy, zwiększa istotnie poziom GH w krwi (64). Można zatem sądzić, że w wyrównanych warunkach żywieniowych, różnice w poziomie hormonu wzrostu pomiędzy zwierzętami o wysokim (wysoki poziom GH) i niskim (niski poziom GH) potencjale wzrostowym, będą wynikiem względnego niedoboru składników pokarmowych, w przypadku tych pierwszych. Spostrzeżenia te potwierdził Machlin (65) w doświadczeniach na rosnących świniami.

sugerując, że warunki ograniczonego żywienia mogą pozwolić na uzyskanie najwyższej efektywności produkcyjnej (przyrostów masy ciała, wykorzystania paszy), podawanego GH. W przypadku przeżuwaczy, omawiana interakcja występuje jedynie w początkowym okresie wzrostu, a następnie stopniowo zanika (63).

Z innych, mniej znanych interakcji żywieniowych, można zwrócić uwagę na depresyjny wpływ wysokiego poziomu białka w dawce pokarmowej, na sekrecję GH (62).

Wydaje się, że wykorzystanie GH lub reGH w praktyce produkcyjnej, będzie wymagało bliższego poznania interakcji pomiędzy poziomem żywienia (poziomem indywidualnych składników pokarmowych) oraz złożonym mechanizmem hormonalnej regulacji wzrostu.

Kończąc, warto wspomnieć o pracach nad wykorzystaniem GH-RH (63) oraz immunologicznej neutralizacji GH-IF (66), w sterowaniu procesami wzrostu. Stwarzają one potencjalnie podobne implikacje żywieniowe.

### 4.3. Sterowanie procesami wzrostu wełny

Wzrost wełny u owiec, sprowadzający się zasadniczo do produkcji białka (keratyny), jest w znacznej mierze zależny od stopnia pokrycia potrzeb aminokwasowych zwierząt i przemiany pośredniej aminokwasów, głównie aminokwasów siarkowych (67). Istotne znaczenie posiadają tu współzależności metaboliczne pomiędzy metioniną oraz cysteiną i cystyną (68).

Wyniki dotychczasowych doświadczeń nad rolą GH w procesie wzrostu wełny są dość sprzeczne (63). Ostatnio jednak wykazano (69), że GH, prawdopodobnie na drodze zwiększonego wykorzystania aminokwasów w procesach syntezy keratyny (kosztem procesów katabolicznych tych związków), może zwiększać wydajność wełny o 50%. Do implikacji żywieniowych można tu zaliczyć występowanie interakcji pomiędzy poziomem żywienia owiec i wpływem GH na wzrost wełny (63).

Warto w tym miejscu wspomnieć o przyszłych metodach sterowania wzrostem wełny. Rozwój inżynierii genetycznej stwarza bowiem możliwość wbudowania bakteryjnej sekwencji DNA, kodującej syntezę cysteiny, do genomu owczego; cysteina jest pierwszym aminokwasem ograniczającym wzrost wełny (70). Prace nad tym zagadnieniem prowadzone są obecnie w Australii (67), a ich perspektywy są o tyle realne, że uzyskano już zwierzęta transgeniczne (w tym również owce), których komórki posiadają zdolność wytwarzania hormonu wzrostu (71).

Kwestia implikacji żywieniowych sprowadza się tu do zwiększonego zapotrzebowania transgenicznych owiec (syntetyzujących endogennie cysteinę) na glikogenną serynę, będącą prekursorem metabolicznym cysteiny. Można sądzić, że w warunkach niedostatecznego pokrycia potrzeb energetycznych i białkowych tych zwierząt, szczególnie w okresie zwiększonego zapotrzebowania na glukozę i aminokwasy podczas ciąży i laktacji, aminokwasem limitującym produkcję wełny stanie się seryna (67). W tej chwili jednak, powyższe rozważania pozostają jedynie w sferze teorii.

### Literatura

1. Armstrong D. G., (1986), *Recent Advances in Animal Nutrition*, Ed. W. Haresign, D. J. A. Cole, 89-103, London, Butterworth.
2. Allen C. E., (1983), *J. Anim. Sci.*, 57 (Suppl.2), 16-27.
3. Petters R. M., (1986), *J. Anim. Sci.*, 62, 1759-1768.
4. Fuller M. F., Livingstone R. M., Baird B. A., Atkinson T., (1979), *Br. J. Nutr.*, 41, 321-331.
5. Fuller M. F., Mennie I., Crofts R. M. J., (1979), *Br. J. Nutr.*, 41, 333-340.
6. Grosbach D. A., Lewis A. J., Peo E. R., (1985), *J. Anim. Sci.*, 60, 487-494.
7. Shewry P. R., Kreis M., (1987), *Proc. Nutr. Soc.*, 46, 379-385.
8. Botstein D., Shortle D., (1985), *Science*, 229, 1193-1201.
9. Fromm M. E., Taylor L. P., Walbot V., (1986), *Nature*, 319, 791-793.

10. Lörtz H., Baker B., Schell J., (1985), *Mol. Gen. Genet.*, 199, 178–182.
11. Thomas C., Thomas P. C., (1985), *Recent Advances in Animal Nutrition*, Ed. W. Haresign, D. J. A. Cole, 223–256, London, Butterworth.
12. Wilkinson J. M., (1985), *Silage Aids UK*, Marlow: Chalcombe Publ.
13. Hooper P. G., Rooke J. A., Blackburn F., Armstrong D. G., (1984), *Proceedings of the 7<sup>th</sup> Silage Conference*, Belfast, Queens University.
14. Woolford M. K., (1984), *The Silage Fermentation*, New York, Marcel Dekker.
15. Ryu D. D. Y., (1989), *Biotechnology for Livestock Production*, Ed. FAO, Anim. Prod. Health Div., 223–243, New York, Plenum Press.
16. Paterson A., (1989), *Biotechnology for Livestock Production*, Ed. FAO, Anim. Prod. Health Div., 245–261, New York, Plenum Press.
17. Sundstøl F., Owen E., (1984), *Straw and Other Fibrous Byproducts as Feeds*, Amsterdam, Elsevier Press.
18. Crawford R. L., Crawford D. L., (1984), *Enzyme Microbial Technol.*, 6, 434–442.
19. McCarthy A. J., Paterson A., Broda P., (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 347–352.
20. Kamra D. N., Zadrazil F., (1988), *Treatment of Lignocellulosics with White Rot Fungi*, Ed. F. Zadrazil, R. Reiniger, 56–63, London, Elsevier Press.
21. Agosin E., Daudin J. J., Odier E., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 132–138.
22. Agosin E., Odier E., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 397–403.
23. Agosin E., Tollier M. T., Brillouet J. M., Thivend P., Odier E., (1986), *J. Sci. Fd. Agric.*, 37, 97–106.
24. Ørskov E. R., McDonald I., (1979), *J. Agric. Sci. Camb.*, 92, 499–503.
25. Eriksson K. E., Johnsrud S. C., Vallander L., (1983), *Arch. Microbiol.*, 135, 161–168.
26. Johnsrud S. C., Eriksson K. E., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 320–327.
27. Tosaka O., Enei H., Hirose Y., (1983), *Trends Biotechnol.*, 1, 70.
28. Reverend B. D., Botte M., Deshamps A. M., Lebault J. M., Sano K., Takinami K., Pate J. C., (1982), *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 227–231.
29. Hesselman K., Elwinger K., Thomke S., (1982), *Anim. Feed Sci. Technol.*, 7, 351–358.
30. Koreleski J., Ryś R., (1985), *Biul. Inf. Przem. Pasz.*, 24, 35–41.
31. Koreleski J., Antoniewicz A., (1988), *Rocz. Nauk. Zoot.*, 15, 189–195.
32. Newman C. W., Eslick R. F., El-Negoumy A. M., (1983), *Nutr. Rep. Int.*, 28, 139–146.
33. Bergen W. G., Bates D. B., (1984), *J. Anim. Sci.*, 58, 1465–1485.
34. Schelling G. T., (1984), *J. Anim. Sci.*, 58, 1518–1527.
35. Parker D. S., Armstrong D. G., (1987), *Proc. Nutr. Soc.*, 46, 415–421.
36. Nagaraja T. G., Avery T. B., Bartley E. E., Galizer S. J., Dayton A. D., (1981), *J. Anim. Sci.*, 33, 206–216.
37. Dennis S. M., Nagaraja T. G., Bartley E. E., (1981), *J. Anim. Sci.*, 418–426.
38. Dennis S. M., Nagaraja T. G., Bartley E. E., (1981), *J. Dairy Sci.*, 64, 2350–2356.
39. Demeyer D., Van Nevel C., Teller E., Godeau J. M., (1986), *Arch. Anim. Nutr.*, 36, 132–143.
40. Muntifering R. B., Theurer C. B., Noon T. H., (1981), *J. Anim. Sci.*, 50, 930–936.
41. Poos M. I., Henson T. L., Klopfenstein T. J., (1979), *J. Anim. Sci.*, 48, 1516–1524.
42. Jouany J. P., Thivend P., (1989), *Biotechnology for Livestock Production*, Ed. FAO, Anim. Prod. Health Div., 277–294, New York, Plenum Press.
43. Heitzman R. J., (1986), *Recent Advances in Animal Nutrition*, Ed. D. J. A. Cole, W. Haresign, 157–175, London, Butterworth.
44. Forsberg C. W., Crosby B., Thomas D. Y., (1986), *J. Anim. Sci.*, 63, 310–325.
45. Hespell R. R., (1987), *Proc. Nutr. Soc.*, 46, 407–413.
46. Gregg K., Bauchop T., Leng R. A., (1989), *Biotechnology for Livestock Production*, Ed. FAO, Anim. Prod. Health Div., 263–275, New York, Plenum Press.
47. Teather R. M., (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 298–302.
48. Klieve A. V., Hudman J. F., Bauchop T., (1986), *Aust. Microbiologist*, 7, 150.
49. Mann S. P., Hazelwood G. P., Orpin C. G., (1985), *Curr. Microbiol.*, 13, 17.
50. Teather R. M., Erfle J. D., Crosby W. L., Collier B., Thomas D. Y., (1984). *Zob. poz.* 46.
51. Hazelwood G. P., Mann S. P., Orpin C. G., Romaniec R. P. M., (1984), *Recent Advances in Anaerobic Biotechnology*, Ed. S. P. Boriello, Boston, Martinus Nijhoff.
52. Storm E., Ørskov E. R., (1984), *Br. J. Nutr.*, 52, 613–620.

53. Teather R. M., (1985), *Can. J. Anim. Sci.*, 65, 563-574.
54. Jaynes J. M., Langridge P., Anderson K., Bond C., Sands D., Newman C. W., Newman R., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 200.
55. Karg H., Mayer H., (1989), *Biotechnology for Livestock Production*, Ed. FAO, Anim. Prod. Health Div., 181-205, New York, Plenum Press.
56. Hart I. C., (1987), *Proc. Nutr. Soc.*, 46, 393-405.
57. Johnsson I. D., Hart I. C., (1986), *Recent Advances in Animal Nutrition*, Ed. W. Haresign, D. J. A. Cole., 105-123, London, Butterworth.
58. Hart I. C., (1988), *Nutrition and Lactation in the Dairy Cow*, Ed. P. C. Garnsworthy, 232-247, London, Butterworth.
59. Hart I. C., Lawrence S. E., Mephram T. B., (1980), *J. Physiol.*, 308, 46-47.
60. Enright W. J., Chapin L. T., Moseley W. M., Zinn S. A., Tucker H. A., (1986), *J. Dairy Sci.*, 69, 344-351.
61. Spencer G. S. G., Garssen G. J., Welling A. M. A. W., (1985), *Anim. Prod.*, 40, 572-573.
62. Karg H., (1989), *Biotechnology for Livestock Production*, Ed. FAO, Anim. Prod. Health Div., 159-179, New York, Plenum Press.
63. Hart I. C., Johnsson I. D., (1986), *Control and Manipulation of Animal Growth*, Ed. P. J. Buttery, N. B. Haynes, D. B. Lindsay, 135-159, London, Butterworth.
64. Driver P. M., Forbes J. M., (1981), *J. Physiol.*, 317, 413-424.
65. Machlin L. J., (1972), *J. Anim. Sci.*, 35, 794-800.
66. Lawrence M. E., Schelling G. T., Byers F. M., Green L. W., (1986), *J. Anim. Sci.*, 63 (Suppl.1), 215.
67. Leng R. A., Nolan J. V., Bird S. H., Romulo B., (1989), *Biotechnology for Livestock Production*, Ed. FAO, Anim. Prod. Health Div., 207-217, New York, Plenum Press.
68. Pisulewski P. M., Buttery P. J., (1985), *Br. J. Nutr.*, 54, 121-129.
69. Johnsson I. D., Hart I. C., Butler-Hogg B., (1985), *Anim. Prod.*, 41, 207-217.
70. Reis P. J., Tunks D. A., Downes A. M., (1973), *Aust. J. Biol. Sci.*, 26, 249-258.
71. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Brinberg N. C., Evans R. M., (1982), *Nature*, 300, 611-615.

## Applications of biotechnology in animal nutrition

### Summary

The paper presents current and future applications of the new technologies in animal nutrition. The biotechnologies aimed at the improvement of feeds are applied to: plant breeding (e.g. grain amino acid composition, elimination of antinutritional constituents from legume seeds), silage production (e.g. bacterial inoculants as silage additives), delignification of lignocellulosics (e.g. lignolytic bacteria and white rot fungi) and development of bacterial strains for production of essential amino acids (lysine). The second group of new technologies is aimed at the improvement in digestion and absorption of nutrients. These technologies include: addition of bacterial and fungal enzyme preparations to non-ruminant feeds (e.g.  $\beta$ -glucanase), indirect manipulation of rumen fermentation using selective ionophores as feed antibiotics and genetic manipulation of rumen fermentation, using genetically engineered rumen bacteria, expressing desired traits. Finally, nutritional implications (nutrient requirements) resulting from hormonal (GH, reGH) stimulation of animal productivity (enhanced milk production, growth, wool growth), are considered.

### *Adres dla korespondencji:*

Paweł M. Pisulewski, Instytut Zootechniki, Zakład Żywienia i Fizjologii Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa.