

УДК 636.2:591.133.16.

ТРАНСФОРМАЦИЯ КАРОТИНА В РУБЦЕ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

А.А. ИВАНОВ

(Кафедра физиологии и биохимии с.-х. животных)

С использованием метода жидкостной хроматографии доказано присутствие каротина и ретиноидов в рубце коров независимо от состава рациона. Проверка этого положения в условиях *in vitro* показала, что каротин в рубце жвачных трансформируется в ретиноиды. Автором поддерживается концепция нецентрального разрыва молекулы каротина при трансформации в витамин А. Конечным продуктом рубцового метаболизма каротина является эфирная форма витамина А. Разрыв и эстерификацию образующихся при этом остатков молекулы каротина осуществляют ферментные системы, продуцируемые бактериями и инфузориями рубца.

Каротиноиды являются уникальными пигментами, синтезируемыми высшими растениями и некоторыми микроорганизмами. В настоящее время известно несколько сот химических соединений, относящихся к этой группе. В растительном организме каротиноиды участвуют в процессах утилизации солнечной энергии и обеспечивают защиту клеточных и субклеточных мембран от разрушительного воздействия кислорода.

Млекопитающие не способны к синтезу каротина. Единственным источником последнего для них являются растения. В организме животных каротин может усваиваться сразу после по-

тупления с кормом или же в некоторых случаях депонироваться в тканях и использоваться позже. Наибольшее значение для животных имеет β -каротин, который обладает наибольшей активностью и весьма распространен в зеленых растениях. При изучении физиологической роли каротина исследователи, как правило, обращали основное внимание на способность его к трансформации в витамин А. Такое отношение к этому нутриенту в животноводстве остается и по сей день. Однако в последние годы в ряде лабораторий мира представление о каротине исключительно как о предшественнике витамина А было пересмотрено. Экспери-



Схема биологических функций β -каротина.

ментальные данные, полученные на лабораторных животных и человеке, говорят о том, что каротин имеет свои собственные биохимические функции в животном организме.

Эпидемиологические наблюдения за людьми, потребляющими большое количество каротиноидов без витамина А, свидетельствуют о связи каротина с понижением риска заболевания некоторыми формами рака [3, 20]. И эта связь подтверждается в экспериментах на животных [4].

Каротин оказывает непосредственное влияние на иммунологический статус животного организма, повышая его общую и специфическую резистентность [2, 6, 18]. Довольно убедительны сообщения об антимутагенных эффектах [16] и фотозащитных реакциях каротина у животных и человека [10, 15]. Возможные и более или менее экспериментально подтвержденные биохимические функции каротина в жи-

вотном организме представлены на схеме.

Частично специфические физиолого-биохимические эффекты каротина объясняются его антиоксидантными свойствами, которые подтверждены как *in vitro*, так и *in vivo* [9, 13]. Количественная оценка антиоксидантных свойств показала, что β -каротин в десятки раз эффективнее витамина Е. Если 1 моль α -токоферола необратимо разрушает 120 моль кислорода, то 1 моль β -каротина принимает на себя 2000—2500 моль кислорода [11]. Причем антиоксидантные свойства каротина проявляются в широком диапазоне парциального давления кислорода. Поэтому он выполняет антиоксидантные функции практически во всех тканях животного организма [8].

Таким образом, относиться к каротину только как к потенциальному источнику А-витамина уже нельзя. Тем не менее даже в странах с очень высо-

кой культурой ведения животноводства уровень каротина в рационах не складывается в качестве обязательного показателя. Например, в системе рационального питания молочного скота Спартан-II, разработанной специалистами Мичиганского университета (США) и широко используемой в Северных Штатах, вообще не учитывается содержание каротина в рационе, а дается содержание ретинолпальмитата.

Справедливости ради надо сказать, что метаболизм каротиноидов у жвачных животных даже в роли предшественника витамина А изучен крайне поверхностно. Гипотетически принимается, что каротин всасывается в тонком отделе кишечника и затем превращается в витамин А. Эта схема выстроена на результатах опытов с моногастричными животными, на жвачных она перенесена по существу механически. При более внимательном рассмотрении данной проблемы применительно к жвачным животным возникает ряд вопросов, на которые пока нет убедительных ответов. Среди них и вопрос о возможной специфической роли преджелудков жвачных в метаболизме каротиноидов и ретиноидов. Имеющиеся в литературе отрывочные сведения по этому вопросу [7, 14] скорее запутывают проблему, чем ее разрешают.

Нами предпринята попытка выяснить роль рубца в метаболизме каротина в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Методика

Опыты *in vivo* проведены на 10 коровах голштинской породы, принадлежащих Сельскохозяйственному колледжу Мичиганского государственного университета (США).

Возраст животных — 2—4 лактации, среднесуточный удой — от 10 до

41 кг, содержание — стойлово-выгульное, кормление — 3-кратное, доение — 2-кратное. У всех коров были фистулы рубца. Для получения рубцовой жидкости разного состава подопытные группы коров содержали на разных рационах: I группа — люцерновое сено вволю; II — рацион для среднеудойных коров Mix-75 (концентраты из расчета 3 кг на 1 гол); III — рацион для высокоудойных коров Mix-90 (концентраты — 7,4 кг на 1 гол.).

Опыты *in vitro* выполнены на установке, разработанной М.С. Алленом (лаборатория питания жвачных Мичиганского государственного университета). Количественное определение каротина и ретиноидов проводили методом жидкостной хроматографии на установках фирмы Waters с флюоресцентным детектором PS-4. Ретинол и ретинолпальмитат определяли в рубцовой жидкости с использованием стандартов фирмы Sigma и колонок Supelcosil LC-Si в системе с нормальной фазой, каротин и ретиноиды в одном образце — с использованием колонок Partisil DS-3 в системе с обратной фазой.

Образцы рубцовой жидкости получали до утреннего кормления и через 3 ч после кормления.

Фракционирование рубцовой жидкости осуществляли методом ультрацентрифугирования (центрифуга фирмы Du Pont-RC 5C (ротор 05) и методом фильтрования (мембранные фильтры фирмы TFE Zitex). Фракцию инфузорий отделяли центрифугированием нативной жидкости при 4°C и скорости 1,0 тыс. об/мин. Оставшуюся после отделения инфузорий жидкость подвергали центрифугированию при той же температуре со скоростью 48 тыс. об/мин.

Все работы с каротином и ретиноидами выполняли при желтом искусственном освещении в атмосфере

азота или углекислого газа.

Образцы обезвоживали на охлажденном ацетоне в темноте и затем их хранили при -24°C .

Результаты

Рубцовая жидкость у коров разных групп сильно различалась по своим физико-химическим свойствам. Содержание сухого вещества колебалось от 2 до 4%, рН — от 6,0 до 6,9, цвет — от светло-желтого до темно-зеленого. В рубце коров II и III групп преобладали частицы 10—30 мм, I группы — более крупные частицы. Однако независимо от состава рациона в рубце всех коров обнаружены каротин и ряд ретиноидов (табл. 1).

Рубцовая жидкость коров II и III групп содержала значительно больше каротина и ретиноидов (за исключением ретинола). При этом уровень каротина у них был в несколько раз выше, чем у I группы, хотя в расчете на единицу сухой массы рациона содержание каротина в I группе было почти в 2 раза больше: соответственно 8,3, 4,5, и 4,3 мг%. Полученные данные труднообъяснимы. Можно лишь предположить, что у коров II и III групп каротиноиды из растительной массы пере-

ходили в рубцовую жидкость более активно. Этому процессу могли способствовать более высокая насыщенность их рационах жирами (4,3 и 5,15% против 2,6% в I группе), более высокая степень измельчения растительной массы, а также иная технологическая подготовка кормов к скармливанию. Следует иметь в виду и различия в физиологическом состоянии животных, а также то, что коров II и III групп до нашего эксперимента использовали в других опытах, в частности им давали гормональные препараты.

Жидкостная хроматография свидетельствует о широком спектре ретиноидов в рубцовой жидкости коров. Большую их часть трудно идентифицировать, однако около 99% — это ретинол (13%) и его эстерифицированные формы — ретинилпальмитат (74%) и ретинилацетат (12%). Впервые нам удалось обнаружить и количественно оценить присутствие в рубцовой жидкости ретиноевой кислоты и ее эфирной формы метилретиноата. Содержание этой кислоты крайне незначительно и составляет 50—130 нг в 100 г сухого вещества, концентрация метилретиноата на порядок выше и колеблется в пределах 1,0—1,5 мкг на 100 г.

Присутствие в рубце ретиноидов у

Таблица 1
Содержание β -каротина и ретиноидов в рубцовой жидкости коров (мкг/100 мл)

Соотношение	Группа			Среднее по стаду
	I	II	III	
Каротин	474 \pm 210	1903 \pm 267	2111 \pm 806	1496
Ретинилпальмитат	159 \pm 40	488 \pm 77	748 \pm 58	465
Ретинол	102 \pm 10	104 \pm 7	53 \pm 8	86
Ретинилацетат	24 \pm 3	85 \pm 8	121 \pm 15	77
Ретиноевая кислота*	52 \pm 4	86 \pm 5	124 \pm 16	87
Метилретиноат*	1025 \pm 58	1340 \pm 79	1666 \pm 142	1344

*В нг на 100 г сухого вещества.

Таблица 2

Содержание каротина, ретинола и ретинилпальмитата (мг/100 мл) до инкубации β -каротина с различными фракциями рубцовой жидкости *in vitro* (числитель) и после нее (знаменатель)

Фракция рубцовой жидкости	Каротин	Ретинол	Ретинилпальмитат
Нативная	8,2	2,13	2,47
	1,52	2,40	4,09
Без инфузорий	7,92	1,30	0,71
	1,51	1,12	2,9
Без бактерий	8,05	1,08	2,20
	2,69	1,32	3,65
Плазма	7,90	5,90	1,10
	2,60	4,60	11,60

коров I группы позволяет предположить, что каротин может трансформироваться в витамин А задолго до поступления провитамина в кишечник. Для проверки этой гипотезы была выполнена серия опытов *in vitro* с рубцовой жидкостью, взятой у коров, рацион которых не содержал никаких источников ретиноидов, кроме каротина, входящего в состав люцернового сена (8,3 мг% каротина, 20% сырого протеина, 22% клетчатки и 2,6% жира). В опытах *in vivo* было установлено, что наиболее выраженные изменения концентрации каротина и ретиноидов в рубце происходят в течение первых трех часов после кормления. Изменения состава рубцового содержимого в это время связаны с его физическим разбавлением вследствие поступления в рубец корма и воды. В последующие 3 ч под влиянием главным образом рубцового микронаселения происходит восстановление нарушенных пропорций. Поэтому в опытах *in vitro* рубцовую жидкость извлекали через 3 ч после кормления коров и в целях выявления роли микронаселения в трансформации каротина выделяли фракции: нативную рубцовую жидкость, жидкость, из которой предварительно удаляли инфузории, жидкость без бактерий и жидкость без инфузорий и бактерий (в дальнейшем мы будем называть ее плазмой). Объем фракций, используемый при инкубации, 60 мл. К каждой фракции добавляли 1 мл кристаллического каротина, растворенного в твин-80 (препарат фирмы «Сигма» Tween-80 состоит на 70% из моноолеата и на 30% из смеси линолевой, пальмитиновой и стеариновой жирных кислот). Естественное содержание каротина в рубцовой жидкости и ее фракциях составляло 1,9—2,2 мг на 100 мл. С учетом дополнительно введенного кристалли-

ческого каротина до начала инкубации общая его концентрация составляла 7,9—8,2 мг на 100 мл.

Трехчасовая инкубация β -каротина с разными фракциями рубцовой жидкости приводила к его разрушению (табл. 2). В нативной рубцовой жидкости разрушилось 81,5% β -каротина, в рубцовой жидкости без инфузорий — 80,9, без бактерий — 66,6, в плазме — 67,1%. Судя по тому, что во всех случаях разрушение каротина сопровождалось накоплением ретинилпальмитата, следует говорить не о случайном физико-химическом разрушении каротина, а о его трансформации в витамин А. Позвоительно предположить, что все фракции рубцовой жидкости содержат оксигеназные ферментные системы, способные разрывать молекулу каротина. Сопоставление концентрации витамина А-спирта и его эстерифицированных форм до и после инкубации говорит о количественной зависимости накопления ретиноидов от

Содержание каротина и ретиноидов (мг/100 мл) в рубцовой жидкости, инкубируемой *in vitro* с каротином в разных концентрациях

Исходная концентрация каротина в рубцовой жидкости	Каротин	Ретинол	Эфиры витамина А
2,1	1,34	1,77	2,09
5,1	1,76	0,81	2,81
7,1	1,93	1,23	3,91
9,1	3,48	1,44	4,17
11,1	2,33	1,90	6,89
13,1	3,94	1,33	6,24
15,1	6,01	3,17	10,67
17,1	10,30	8,74	9,00
19,1	10,00	6,34	7,76

исходной концентрации каротина в среде. Коррелятивный анализ выявил положительную связь между исходным уровнем каротина в среде и концентрацией эфиров витамина А в конце инкубации (табл. 3). При увеличении концентрации каротина в среде с 2,1 до 15,1 мг на 100 мл коэффициент корреляции составил 0,92. При дальнейшем ее повышении до 19,1 мг на 100 мл коррелятивная связь ослабевала.

Инкубирование β -каротина в рубцовой жидкости отдельно с бактериями, инфузориями или без них позволяет выяснить их роль в процессе окисления каротина и эстерификации продуктов окисления. Если причастность симбиотической микрофлоры преджелудков жвачных к гидролизу компонентов корма общезвестна [1], то участие в этом процессе инфузорий неоспорно. А.Г. Вильямс и Г.С. Кольман [19] после обобщения результатов культивирования отдельных видов инфузорий из рубца пришли к заключению, что инфузории активно участвуют в рубцовом превращении липидов. Так, *Entodinium sandatum* и *E. simplex* используют для своей жизнедеятельности свободные стеариновую, олеиновую, линолевую и пальмитиновую кислоты. Пос-

ледние 3 кислоты включаются в фосфолипиды инфузориальных клеток. Причем смешанные культуры Protozoa быстрее всего метаболизируют пальмитиновую кислоту, которая далее обнаруживалась в составе фосфолипидов и частично в составе моно-, ди- и триглицеридов. Смешанные культуры инфузорий в присутствии пенициллина и стрептомицина гидрогенизировали 95% линолевой кислоты.

У инфузорий рода *Epidinia* наблюдалось быстрое превращение триена хлоропластов в диен, а моноена — в насыщенные жирные кислоты. В ряде опытов инфузории обеспечивали 30% гидролиза триглицеридов и синтеза отдельных жирных кислот и триглицеридов.

Приведенные данные свидетельствуют о возможности окисления каротина и эстерификации продуктов окисления в преджелудках жвачных, однако такие реакции в литературе не описаны. Результаты наших опытов дают основания для такого предположения. Так, направленность метаболизма β -каротина в рубцовой жидкости с бактериями и инфузориями была одинаковой; в том и другом случае отмечалось резкое падение концентрации каротина: в бактериальной среде оно составило 81%, в

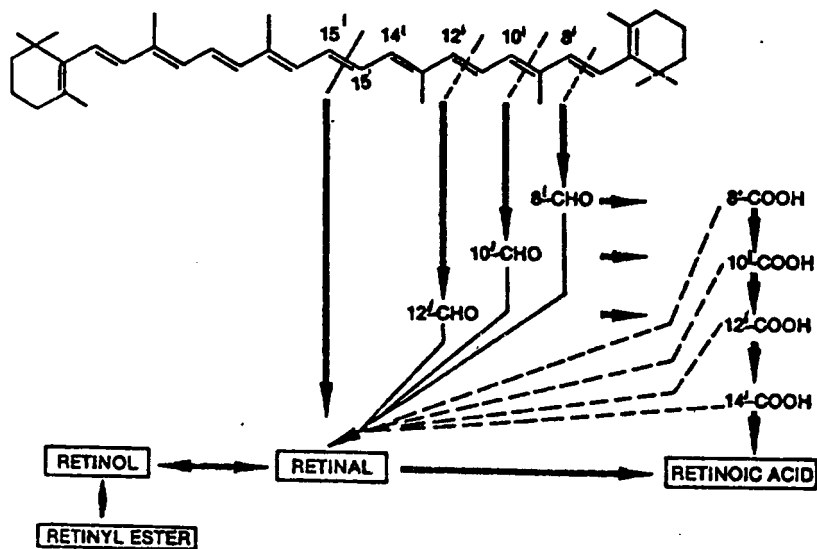
суспензии Protozoa — 67%. Уровень спиртовой формы витамина А при 3-часовой инкубации практически не менялся в этих вариантах опыта и равнялся 1,0—1,3 мг на 100 мл, что в 2 раза меньше, чем в варианте с нативной рубцовой жидкостью, и в 4—5 раз меньше, чем в варианте с плазмой.

Увеличение концентрации ретинилпальмитата при инкубировании каротина в бактериальной фракции составило 2,19, а в присутствии инфузории — 1,45 мг на 100 мл.

Совершенно неожиданными оказались результаты инкубирования каротина в плазме рубцовой жидкости. Концентрация каротина за 3 ч снизилась с 7,9 до 2,6 мг на 100 мл. Относительно высокой оказалась концентрация ретинола — 5,9 мг до и 4,6 мг на 100 мл в конце инкубации. Содержание ретинилпальмитата выросло десятикратно — с 1,1 до 11,60 мг/100 мл.

По всей видимости, процедура освобождения нативной рубцовой жидкости от микробных тел повлияла на процесс эстерификации витамина А. Вероятно, ультрацентрифугирование приводит к разрушению клеточных оболочек бактерий и мелких инфузорий и выходу субклеточных структур в плазму рубцовой жидкости. При этом субклеточные мембраны с расположенными на них ферментными системами вступают в непосредственный контакт с каротином и продуктами его гидролиза, что повышает скорость реакции эстерификации и приводит к резкому увеличению содержания эфирной формы витамина А в инкубационной среде.

Известно [17], что митохондриальная и микросомальная фракции гомогенатов печени крыс и цыплят обладают высокой оксидазной активностью по каротиноидам. Добавление к культуральной среде НАД⁺ и НАДФ⁺ резко



Предполагаемая схема трансформации каротина [17].

повышает выход каротиноидных кислот в реакциях окисления даже апо- β -каротиноидов.

Расчеты с учетом молекулярной массы и подтверждают допустимость вышесказанного выше определения. В условиях опыта в расчете на 100 мл среды за 3 ч было разрушено 5,3 мг, или 10 ммоль, β -каротина. За это же время увеличение ретинилпальмитата составило 10,5 мг, или 20 ммоль. Теоретически такое возможно в случае, когда 1 молекула β -каротина трансформируется в 2 молекулы ретиналя с последующей эстерификацией и образованием 2 молекул ретинила. Столь высокая эффективность трансформации каротина в витамин А возможна, если разрыв молекулы каротина происходит по центральной ($15' = 15''$) связи (рисунок), что маловероятно. Более правдоподобна версия о разрыве центральной и периферической связи в молекуле β -каротина. По представлению Дж. Гангули и П.С. Сартри [5], диоксигеназа атакует неспецифически любую двойную связь в молекуле каротина, однако центральная связь более прочна. Образующийся при разрыве периферической связи апо- β -каротиналь может быть трансформирован в ретиналь или окислен в соответствующую апокаротиноевую кислоту, которая, в свою очередь, может быть превращена в ретиналь или ретиноевую кислоту. При таком течении событий значение коэффициента трансформации каротина в эфирную форму витамина А может приблизиться к 2.

В условиях нашего эксперимента следует учесть возможность эстерификации присутствовавшего до начала инкубации ретинола. Разница в концентрации спиртовой формы витамина А до и после инкубации составила 1,30 мг на 100 мл, или 4,5 ммоль. Следовательно, коэффициент трансформа-

ции каротина в витамин А-эфир равен только 1,4, что близко к результатам определений *in vivo* на лабораторных животных.

Тем не менее к количественной оценке трансформации каротина в витамин А в рубце следует подходить с большой осторожностью и прежде всего потому, что приведенные выше расчеты сделаны на основании данных опытов *in vitro*. Для инкубации был использован синтетический кристаллический транс- β -каротин, который перед введением в инкубационную среду растворялся в петролейном эфире, а затем в твин-80, т.е. каротин в среде находился в растворе жирных кислот. Логично предположить, что каротин, входящий в состав кормов, будет менее доступен ферментным системам преджелудков жвачных, а его трансформация в витамин А будет менее эффективна.

Заключение

У жвачных животных метаболизм каротина определяется особенностями физиологии данной группы животных. Трансформация каротина начинается в рубце. В рубцовой жидкости коров независимо от состава рациона помимо каротина присутствуют ретиноиды (в порядке убывания их концентрации): ретинилпальмитат, ретинол, ретинилацетат, метилретиноат, ретиноевая кислота.

Рубцовая жидкость обладает оксигеназной активностью по отношению к β -каротину. За 3 ч инкубации *in vitro* в рубцовой жидкости или ее фракциях разрушалось от 60 до 80% введенного в среду каротина. Результаты опытов подтверждают вероятность разрыва нецентральной (или не только центральной) двойной связи в молекуле каротина. При инкубировании плазмы

рубцовой жидкости, свободной от кормовых частиц и микробных тел, 1 ммоль каротина трансформировалась в 1,4 ммоль ретинилпальмитата. Наиболее активную роль в этом процессе играют, по-видимому, бактерии, что не исключает, однако, причастности инфузорий к трансформации каротина. Во всяком случае искусственно разделенные бактерии и инфузории рубца *in vitro* проявляли высокую оксигеназную активность по отношению к кристаллическому каротину, растворенному в твин-80, приводившую к накоплению ретиноидов. Трансформация продуктов окисления каротина в основном сводилась к реакции эстерификации с использованием прежде всего пальмитиновой и в меньшей мере уксусной кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курилов Н.В., Кроткова А.П. Физиология и биохимия пищеварения жвачных. — М.: Колос, 1971. — 2. Bendich A. — *Am.J. Nutr.*, 1989, N 119, p. 112—115. — 3. Byers T., Perry G. — *Annu. Rev. Nutr.*, 1992, N 12, p. 139—159. — 4. Edes E., Gysters D.G. — *Nutr. Cancer*, 1991, N 15, p. 159—166. — 5. Ganguly J., Sastry P.S. — *World Review of Nutrition a. Dietics*, 1985, N

45, p. 198—220. — 6. Hoskinson C.D., Chew B.P., Wong T.C. — *Biol. Neonate*, 1992, N 62, p. 325—336. — 7. Keating E.K., Hale W.H., Hubbert F. — *J. Anim. Sci.*, 1964, N 23, p. 111—117. — 8. Kennedy T.A., Lieber D.C. — *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, N 7, p. 4658—4663. — 9. Krinsky N. — *Am.J. Clin. Nutr.*, 1991, vol. 53, p. 238S—246S. — 10. Methews—Roth M.M. — *Federation Proc.*, 1987, N 46, p. 1890—1893. — 11. Mayne S.T. — *Subcellular distribution of dietary carotene in chicks*. Cornell Univ., 1985. — 12. *Oncology overview. Selected Abst. on Retinoids, β -carotene a. Cancer.* — US Dept. Health. Human Services, 1986, July. — 13. Palozza P., Krinsky N. — *Methods in Enzymology*, 1992, vol. 213, p. 403—420. — 14. Rode L.M., McAllister T.A., Cheng K.J. — *Can.J. Anim. Sci.*, 1990, N 70, p. 227—233. — 15. Roe D.A. — *Federation Proc.*, 1989, N 46, p. 1886—1889. — 16. Rosin M.P. — In: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II.* — Plenum Publ. Corp., 1992, p. 45—59. — 17. Sharma R.V., Mathur S.M., Dmitrovsky A.D., Das R.C., Ganguly J. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1977, vol. 486, p. 183—194. — 18. Srikanta S., Kinoshita M., Pasatiempo A.M.G., Ross A.C. — *Nutr. Res.*, 1992, vol. 12, p. 1009—1024. — 19. Williams A.G., Coleman G.S. — *The Rumen Protozoa.* — Springer-Verlag, 1992. — 20. Ziegler R.G. — *J. Nutr.*, 1989, N 119, p. 116—122.

Статья поступила 10 ноября 1993 г.

SUMMARY

It has been shown by liquid chromatography technique that carotene and retinoids are always present in cows' rumen, irrespective of the composition of ration. After checking *in vitro* the conclusion was made about transformation of carotene into retinoids in the rumen of ruminants. The conception of non-central break of carotene molecule during transformation into vitamin A is supported. Etheric form of vitamin A is considered the final product of rumen metabolism of carotene. The break as well as esterification of carotene molecule residues formed in this process are realized by enzymatic systems produced by rumen bacteria and infuzoria.