

6 Zusammenfassung

Fette sind durch die ^{13}C -Diskriminierung der Pyruvatdecarboxylierung abgereichert an schwereren Kohlenstoffisotopen. Auch im Pansenstoffwechsel ist die während der Synthese von Acetat und Butyrat stattfindende Pyruvatdecarboxylierung eine ^{13}C -diskriminierende Umsetzung. Propionat wird im Pansenstoffwechsel aus Pyruvat ohne diesen Decarboxylierungsschritt gebildet. Es wird daher eine geringere ^{13}C -Diskriminierung für die Propionatsynthese angenommen. Diese Annahme wurde bisher durch die Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse in Milchfett und Laktose jedoch nur indirekt bestätigt. Bei Energiemangel durch reduzierte Fütterung und während der Ketose wird bei Milchkühen eine Annäherung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses der Laktose an den tieferen Wert des Milchfettes beobachtet. Dieser Effekt wird durch das Übertreten von Kohlenstoffatomen des Acetyl-CoA aus dem Fettabbau über den Zitratzyklus in das Oxalacetat und daher beim Mangel an Vorläufersubstanzen in die Glukoneogenese erklärt.

Durch eine angenommene Mitwirkung des Glyoxylatzyklus kann die für Fette typische ^{13}C -Abreicherung auf Propionat, ein wesentliches Substrat der Glukoneogenese, übertragen werden. Die daraus folgende Veränderung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses der Laktose hätte die gleiche Tendenz, wie bei Tieren beobachtet, die unterhalb ihres Bedarfs gefüttert wurden oder sich in der Ketose befanden.

Unter Verwendung der Rumen Simulation Technique (Rusitec) wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob im Pansenstoffwechsel des Wiederkäuers der Glyoxylatzyklus zur Propionatbildung beschritten werden kann. Der nach fünf Tagen in den Fermentationsgefäßen erreichte „steady state“ wurde über drei Tage beobachtet, anschließend Glyoxylat über fünf Tage kontinuierlich den Zulagefermentern zugesetzt und abschließend für weitere fünf Tage die Fermentationsvorgänge beobachtet.

Es wurden in dieser Arbeit erstmals die Kohlenstoffisotopenverhältnisse, ausgedrückt als $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, der im Pansenstoffwechsel gebildeten flüchtigen Fettsäuren in einer Gaschromatograph-Verbrennungs-Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometer-Gerätekombination (GC-C-IRMS) bestimmt.

Der Glyoxylatzyklus konnte im Rusitec-System nicht induziert werden. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß Glyoxylat die Mikroorganismen schädigt, was sich in einem insgesamt reduzierten Bakterienstoffwechsel zeigte. Davon waren Butyratbildner und methanogene Bakterien am stärksten betroffen. Über die Art der Schädigung konnte keine Aussage gemacht werden.

Die chromatographische Trennung der Fettsäuren, die für ihre massenspektrometrische Messung erforderlich war, gestaltete sich schwierig. Aufgrund der methodischen Probleme konnte die Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ für Acetat nicht erfolgen. Da Butyrat aus Acetyl-CoA gebildet wird, kann für die geradzahligen flüchtigen Fettsäuren das gleiche Kohlenstoffisotopenverhältnis vorausgesetzt werden.

Es konnte trotz der Schwierigkeiten bei der chromatographischen Trennung ein Unterschied im $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Propionat gegenüber Butyrat abgesichert werden, dieser beträgt mindestens 3,23 ‰. Damit ist bewiesen, daß es bei der Propionatbildung im Pansenstoffwechsel zu einer deutlich geringeren ^{13}C -Diskriminierung kommt als bei der Bildung von Acetat und Butyrat.

Telse Maïke Bruns:

Investigations on the glyoxylic acid cycle and the stable carbon isotope ratios of short chained fatty acids in rumen fermentation (in vitro)

7 Summary

Fat shows a lower $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio when compared with carbohydrate or protein due to a discrimination of ^{13}C during the conversion of pyruvate to acetyl-CoA. During rumen fermentation of carbohydrates, leading to the production of short chained fatty acids, the decarboxylation of pyruvate, which occurs during the formation of acetate and butyrate, shows the very same discrimination of ^{13}C . This pathway is not involved in the formation of propionate in the rumen. Therefore the ^{13}C -discrimination for propionate formation was assumed to occur at a lesser extent. It was not yet proved by direct analysis but assumed on the basis of investigations on the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of milkfat and lactose. In cows on a reduced energy diet or during the state of ketosis the carbon isotope ratio of lactose approaches the lower ratio found in milkfat. This effect is based on the crossing of carbon atoms of fat through the citric acid cycle to oxaloacetate, which is used in gluconeogenesis, if other precursors are reduced.

The typical ^{13}C -depletion of acetyl-CoA would lead to a lower $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ratio of propionate through a supposed concurrence of the glyoxylic cycle. In ruminant metabolism the tendency of the changes in the carbon isotope ratios of lactose related to milkfat would then be the same observed during ketosis and reduced energy supply. Using the rumen simulation technique (Rusitec) investigations were carried out on the possible contribution of the glyoxylic acid cycle to the formation of propionate in rumen metabolism. After the cultures had reached the steady state of fermentation, fermentation pattern were observed for three days. Then glyoxylic acid was added continuously for five days and fermentation patterns were observed during this period and a further five days on.

For the first time the carbon isotope ratios of the short chained fatty acids formed by the rumen were measured in a combined gaschromatograph combustion isotope ratio mass spectrometer (GC-C-IRMS).

The glyoxylic acid cycle could not be induced in the Rusitec-system. Reduced fermentation was observed and therefore it was assumed that glyoxylic acid damages the rumen microorganisms. Butyrate-producing species and methanogenes seemed to be damaged more than other species. The type of damage could not be determined.

The chromatographic separation of the short chained fatty acids for mass spectrometry was found to be complicated. Due to methodical problems the carbon isotope ratio of acetate could not be determined. Butyrate is formed from acetyl-CoA in the rumen so that the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio can be assumed to be the same for the fatty acids with an even numbered amount of C-atoms. Despite the problems that occurred during the chromatographic separation of the short chained fatty acids a difference in the $\delta^{13}\text{C}$ value of 3,23 ‰ was found between propionate and butyrate and thus acetyl-CoA. It could be shown that during propionate formation in the rumen the ^{13}C discrimination is remarkably less than during acetate and butyrate formation. Cows fed at maintenance show a lactose-fat-difference of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios which is now directly shown to be related to ^{13}C depletion during rumen formation of the major short chained fatty acids.