

ROZKŁAD PEKTYNY *IN VITRO* PRZEZ CZYSTE SZCZEPY BAKTERII WYIZOLOWANE ZE ŻWACZA OWIEC

Hanna Tomerska

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonie koło Warszawy
Dyrektor Instytutu; prof. dr J. Kielanowski

Związki pektynowe ze względu na ich rozmieszczenie i powszechne występowanie w tkankach roślinnych stanowią ważny składnik pasz. Rozkładane są one w żwaczu, a udział w tych procesach biorą pierwotniaki i bakterie, np. prace: Wright [11], Mah [9], Abou Akkada i Howard [7], Clarke i in. [5], Dehority [6]. Badanie pektynolitycznych własności frakcjonowanego płynu żwaczowego przeprowadzili Howard [7] oraz Ziółcki i Wojciechowicz [12].

Celem przedstawionej pracy było zbadanie jakie bakterie występujące w żwaczu owiec biorą udział w rozkładzie pektyny oraz jak ogólnie ten rozkład przebiega. Wybrano metodę wyizolowania ze żwacza czystych szczepów bakterii, które mogą korzystać z pektyny jako jedyne źródła węgla w podłożu. Badanie rozkładu pektyny przez wybrane szczepy bakterii prowadzono dwoma sposobami: (1) pektynolityczne własności płynów pochodzących badano metodą płytkową, wiskozymetryczną i chromatograficzną oraz (2) rozkładano pektynę w podłożach bez bakterii aktywnymi preparatami enzymatycznymi otrzymanymi z płynów pochodzących, a powstające związki wykrywano chromatograficznie.

Materiał do izolacji bakterii pobierano z treści żwacza owiec przez stałe przetoki. Owce były żywione sianem łąkowym, wysłodkami buraczanymi suszonymi i śrutą jeczmienną. W podłożach używanych do hodowli bakterii oraz doświadczeń jedynym źródłem węgla była pektyna cytrusowa, źródłem azotu — azot nieorganiczny w postaci soli amonowej. Podłoża zawierały 10% objętości płynu żwaczowego odwirowanego przez 30 min przy 5300 xg oraz bufor węglanowy; pH podłoż 6,9-7,1. Warunki beztlenowe utrzymywano stosując CO₂ wolny od tlenu oraz dodatek kwasu tioglikolowego. Przy izolowaniu czystych szczepów bakterii, posługiwano się metodą rozcieńczeń używając podłoż płynnych i stałych. Izolacje powtarzano wielokrotnie i otrzymywano zawsze ten sam zespół morfologicznych typów bakterii. Czyste szczepy otrzymane z tych zespołów w różny sposób oddziaływały na pektynę. Wyodrębniono szczepy: (1) pektynolityczne, (2) powodujące galaretowacenie podłoża pektynowego, (3) nie zmieniające lepkości podłoża, (4) nie korzystające

z pektyny lecz z produktów częściowego jej rozkładu: ze związków oligogalakturonowych oraz kwasu galakturonowego. Wyizolowane szczepy spełniały kryteria stawiane właściwym bakteriom zwaczowym. Otrzymano je z wysokich rozcieńczeń 10^{-7} - 10^{-8} , wszystkie rosły beztlenowo, większość z nich była ścisłymi beztlenowcami, część szczepów wymagała do wzrostu dodatku płynu zwaczowego do podłoża.

Próbowano umieścić otrzymane bakterie w grupach systematycznych:

Streptococcus bovis — szczepy 13P, 14P;

Bacteroides ruminicola (Bryant, 1957) — szczepy: 1, 52, 30, 31;

Selenomonas ruminantium (Bryant, 1955) — szczepy: 20P, 12, 13, 56, 10M, 10T.

Na razie nie znaleziono odpowiedników w znanej literaturze i nie zidentyfikowano następujących szczepów:

pałeczki gram-ujemne, nieruchliwe — nr 72, 81, 62;

pałeczka gram-ujemna, ruchliwa, wrzecionowatego kształtu — nr 8.

Zbadano wzrost posiadanych szczepów bakterii na podłożach zawierających różne związki galakturonowe. Wyniki podano w tabeli 1.

Własności pektynolityczne wyizolowanych szczepów badano metodą płytkową i wiskozymetryczną. Wyniki otrzymane obiema metodami były zgodne. Bakterie upłynniające pektynę dawały wynik dodatni na płytkach pektynowo-agarowych. Część szczepów, a wśród nich *Streptococcus bovis*, dawały wyniki dodatnie w obu testach, niezależnie od aktualnej obecności pektyny w podłożu hodowlanym; stwierdzono własności pektynolityczne płynów pohodowlanych u kultur rosnących na glukozie lub skrobi.

Za pomocą metody chromatograficznej stwierdzono różnice w sposobie rozkładu pektyny przez poszczególne szczepy. Chromatografia bibułowa jest od dawna z powodzeniem stosowana do badania związków spotykanych przy rozkładzie pektyny lub innych poliuronidów, np.: Smith [10], Wright [11], Abou Akkada i Howard [1], Ziółcki i Wojciechowicz [12]. Zastosowano chromatografię bibułową zstępującą przy dwóch układach rozwijających. Jako związek standardowy służył kwas galakturonowy. Otrzymano następujące wyniki:

1. Bakterie pektynolityczne.

(a) Szczepy *Streptococcus bovis* rozkładały pektynę na oligogalakturonidy złożone prawdopodobnie z 4-7 monomerów. Nie powstał przy tym kwas galakturonowy.

(b) Szczepy *Bacteroides ruminicola* rozkładały cząsteczkę pektyny do związku dwugalakturonowego, który wykorzystywały. Na podstawie prowadzonych badań w dziale chemicznym Pracowni Mikrobiologicznej stwierdzono, że dwugalakturonid ten wykazuje własności związku nienasyconego. Jest to ściśle związane z wytwarzaniem przez omawiane bakterie zwaczowe enzymów pektolitycznych o charakterze liaz.

Tabela 1

Wykorzystywanie różnych związków galakturonowych przez wyizolowane szczepy bakterii żwaczowych

Utilization of different galacturonides by isolated rumen bacteria

Substrat Substrate	Nr szczepu — Strain No.															
	1	52	30	31	72	81	13P	14P	62	8	56	13	12	10M	10T	20P
Pektyna cytrusowa ^a Citrus pectin ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+g	+	+	+	+	+	+	+
Pektyna buraczana ^b Beet pectin ^b	+	+	+	+	+g	+g	—	—	+	0	+	+	+	+	+	+
Kwas poligalaktu- ronowy ^c Polygalactu- ronic acid ^c	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—
Kwas galakturono- wy ^d Galacturonic acid ^d	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—

+ = substrat wykorzystany przez szczep, — = substrat niewykorzystany, 0 = nie badano, g = szczep powoduje galaretowacenie podłoża.

^a Pektyna przemysłowa oczyszczana wg Jermyn i Tomkins [8]. ^b Pektyna galaretująca z suszonych fabrycznie wysłoków buraczanych. ^c Polygalacturonsaure Nr 19081 Dr. Theodor Schuchard und Co., GMBH, Munchen. ^d D- α -galacturonic acid puriss, 4660 201, Carl Roth OHG.

+ = utilized, — = not utilized, 0 = not investigated, g = jellification of the medium.

^a Commercial citrus pectin purified by the method of Jermyn and Tomkins [8]. ^b Jellyfrying pectin from commercial dried sugar beet pulp. ^c Polygalacturonsaure Nr 19081 Dr. Theodor Schuchard und Co., GMBH, Munchen. ^d D- α -galacturonic acid puriss, 4660 201, Carl Roth OHG.

(c) Szczepy nr 72 i 81 przeprowadzały rozkład pektyny z równoczesnym nagromadzeniem kwasu galakturonowego, z którego nie korzystały.

2. Bakterie nie upłynniające pektyny.

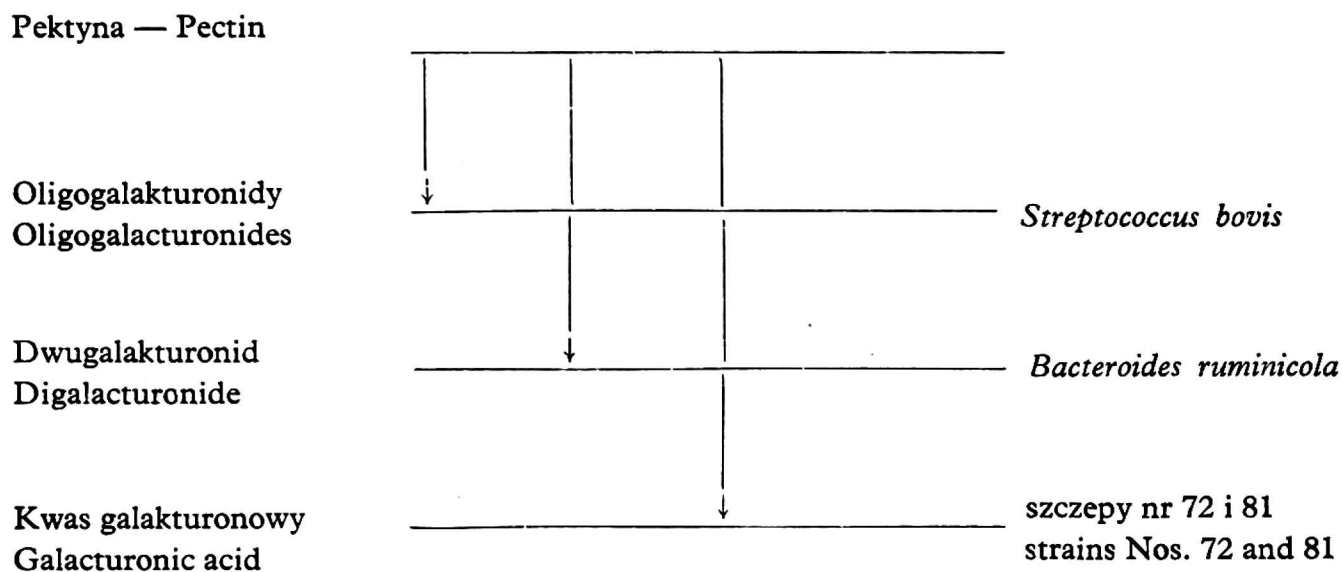
Chromatograficznie nie stwierdzono aby szczepy nr 8, 62 oraz *Selemonas ruminantium* powodowały rozkład pektyny do oligogalakturonidów lub kwasu galakturonowego. Wyniki ilustruje tabela 2.

Przeprowadzono rozkład pektyny w bezbakteryjnym podłożu aktywnymi preparatami enzymatycznymi. Preparaty enzymatyczne przygotowane były z płynów pochodzących z 24-godzinnych hodowli szczepów nr 1 i 72 przez dr M. Wojciechowicz. Rozkładane podłoża w zależności od aktywności preparatu enzymatycznego oraz czasu inkubacji zawierały produkty degradacji pektyny o różnych wielkościach cząsteczki. Chro-

Tabela 2

Schemat rozkładu pektyny przez wyizolowane szczepy bakterii żwaczowych oparty na wynikach uzyskanych przy zastosowaniu chromatografii bibułowej

A schematic representation of pectin degradation by isolated rumen bacteria, based on results obtained with paper chromatography



matograficznie wykazano obecność oligogalakturnonidów w różnych proporcjach ilościowych między tymi związkami. Gdy preparaty enzymatyczne pochodziły z płynu hodowlanego od *Bacteroides ruminicola* — szczep nr 1, rozkład pektyny przebiegał do związku dwugalakturnonowego. Gdy preparaty te pochodziły ze szczepu nr 72 otrzymywano na chromatogramach plamy wskazujące, że powstaje kwas galakturonowy. Wyniki tych doświadczeń są zgodne z podanymi poprzednio.

LITERATURA

1. Abou Akkada A. R., Howard B. H., 1961. *Biochem. J.* 78, 512.
2. Bryant M. P., 1956. *J. Bacteriol.* 72, 162.
3. Bryant M. P., Small Nola, Bouma Cecelia, Chu Hilda, 1958. *J. Bacteriol.* 76, 15.
4. Bryant M. P., 1959. *Bacteriol. Rev.* 23, 125.
5. Clarke R. T. J., Bailey R. W., Blanche D. E. Gaillard, 1969. *J. Gen. Microbiol.* 56, 79.
6. Dehority B. A., 1969. *J. Bacteriol.* 9, 189.
7. Howard B. H., 1964. *Proc. Nutr. Soc.* 20, XXIX.
8. Jermyn M. A., Tomkins R. G., 1950. *Biochem. J.* 47, 437.
9. Mah R. A., 1962. Thesis Univ. of California, Davis, Calif.
10. Smith W. K., 1958. *J. Gen. Microbiol.* 18, 33.
11. Wright D. E., 1961. *N. Z. J. agric. Res.* 4, 203.
12. Ziółcki A., Wojciechowicz M., 1965. *Arch. Tierernährung* 15, 417.

X. Томерска

РАЗЛОЖЕНИЕ ПЕКТИНА IN VITRO ЧИСТЫМИ ШТАММАМИ БАКТЕРИЙ
ИЗОЛИРОВАННЫМИ ИЗ РУБЦА ОВЕЦ

Резюме

Из содержимого рубца фистулированных овец изолировали чистые штаммы бактерий, которые могут употреблять пектины как единственный источник угля в субстрате. Среди штаммов с пектолитическими свойствами идентифицировали 4 как *Bacteroides ruminicola* 2 как *Streptococcus bovis*. Не идентифицировали двух грамотрицательных неподвижных палочек № 72 и 81. Применяя хроматографию на бумаге констатировано разницу в способе разложения пектина разными штаммами: (1) *Bacteroides ruminicola* создает дигалактуроновое соединение, которое использует, (2) *Streptococcus bovis* создает олигогалактурониды состоящие вероятно из 4-7 мономеров и не производит галактуроновой кислоты, которой не использует, (3) Штаммы № 72 и 81 разлагают пектин с одновременным накапливанием галактуроновой кислоты, которой не используют. Среди бактерий, которые используют пектин не разжижая его, изолировали 6 штаммов *Selenomonas ruminantium* и неидентифицированные: грамотрицательную подвижную, веретенообразной формы палочку № 8 и грамположительную, неподвижную палочку № 62, которая вызывает желатинирование пектинового субстрата.

H. Tomerska

BREAKDOWN OF PECTIN IN VITRO BY PURE STRAINS OF BACTERIA
ISOLATED FROM THE SHEEP RUMEN

Summary

Pure strains of bacteria, which can utilize pectin as the sole source of carbon in the medium, were isolated from fistulated sheep rumen contents. Among strains with pectinolytic properties four were identified as *Bacteroides ruminicola*, two as *Streptococcus bovis*, and two gram-negative nonmotile rods, marked Nos. 72 and 81, remained unidentified. Differences in the way pectin was broken down by various strains were recorded using paper chromatography. (1) *Bacteroides ruminicola* formed a di-galacturonic compound which was then utilized, (2) *Streptococcus bovis* formed oligogalacturonides probably consisting of 4-7 monomers and did not release nor utilize galacturonic acid, (3) Strains 72 and 81 broke down pectin with the simultaneous accumulation of galacturonic acid which was not utilized. Among bacteria which utilized pectin without liquefying it the following were recorded: six strains of *Selenomonas ruminantium*, a gram-negative, motile, spindle-shaped rod marked No. 8, and a gram-negative, nonmotile rod marked No. 62 which caused the jellyfication of the medium containing pectin.