

**Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN**



Mgr inż. Katarzyna Elżbieta Stan-Głasek

**Zdolność wykorzystania sacharozy i polimerów fruktozy
przez bakterie żwaczowe szczepu k3
*Pseudobutyrvibrio ruminis***

**The ability of the rumen bacteria *Pseudobutyrvibrio ruminis* strain k3
to utilize sucrose and the polymers of fructose**

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Promotor:

Prof. dr hab. Tadeusz Michałowski
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN

Recenzenci:

Prof. dr hab. Kazimierz Kochman
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN

Prof. dr hab. Jacek Bielecki

Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii

Jabłonna, 2013

9. STRESZCZENIE

Rośliny zielone, przede wszystkim trawy, mają znaczący udział w naturalnej diecie przeżuwaczy. Głównym składnikiem roślin zielonych są wielocukry strukturalne, takie jak celuloza i hemiceluloza. Wiele gatunków roślin syntetyzuje również sacharozę i składające się z fruktozy fruktany i odkłada je jako węglowodany zapasowe. Ssaki przeżuwające nie syntetyzują enzymów trawiących wymienione cukrowce. Korzystają więc z pomocy drobnoustrojów zasiedlających żwacz. Piśmiennictwo dotyczące trawienia i metabolizmu węglowodanów strukturalnych w żwaczu jest bardzo bogate. Literatura odnosząca się do przemian sacharozy i fruktanów jest natomiast bardzo uboga. Ta opinia dotyczy zarówno identyfikacji gatunków drobnoustrojów uczestniczących w przemianach sacharozy i fruktanów w żwaczu jak również ich zdolności trawiennych i wykorzystania produktów trawienia do pokrycia zapotrzebowania na energię. Spodziewano się, że przedsięwzięte badania poszerzą naszą wiedzę na temat wymienionych zagadnień.

Celem badań było: 1) dokonanie weryfikacji przynależności gatunkowej szczepu bakterii będącego obiektem badań tej rozprawy, 2) określenie zdolności badanego szczepu bakterii do wzrostu na podłożu zawierającym sacharozę lub polimery fruktozy jako jedyne źródło węgla, 3) zbadanie zdolności trawienia sacharozy oraz oligomerów i polimerów fruktozy przez badany szczep bakterii i dokonanie identyfikacji i charakterystyki enzymów katalizujących ten proces, 4) zbadanie zdolności fermentowania sacharozy, oligomerów i polimerów fruktozy przez badany szczep bakterii oraz identyfikacja produktów końcowych tego procesu i określenie jego intensywności.

Obiektem badań były bakterie szczepu k3, wyizolowane w 1999 roku z płynu żwacza owcy, na podłożu zawierającym fruktan z tymotki jako jedyne źródło węgla. Na podstawie cech morfologicznych i fizjologicznych, wyizolowane bakterie zaliczono do gatunku *Butyrivibrio fibrisolvens*. Weryfikacja, dokonana metodami genetycznymi, wykazała jednak, że badany szczep bakterii reprezentuje gatunek *Pseudobutyrvibrio ruminis*.

Wyniki hodowli bakterii na podłożach uzupełnionych sacharozą, oligomerami i polimerami fruktozy oraz fruktozą i glukozą wykazały, że w ciągu pierwszych 8-12 godzin inkubacji następował bardzo intensywny wzrost gęstości optycznej kultur bakterii. Stwierdzono także, że tempo przyrostu gęstości populacji zależało od

węglowodanu dodanego do podłoża hodowlanego. Największy przyrost gęstości optycznej stwierdzono w przypadku kultur bakterii hodowanych na podłożach uzupełnionych glukozą i fruktanem z tymotki. Natomiast najwolniej rozwijała się populacja bakterii zaszczerpionych na podłoże z inuliną. Wykazano, że po uzyskaniu maksymalnej gęstości optycznej następowało jej stopniowe zmniejszenie się do poziomu 50-64 % wartości maksymalnej. Stwierdzono, że zmianom gęstości optycznej kultur towarzyszyły zmiany zawartości węglowodanów w podłożu hodowlanym. Stwierdzono, że stężenie fruktanu z tymotki, inulo-oligosacharydów, sacharozy, glukozy i fruktozy zmniejszyło się o 94-96% w ciągu pierwszych 8-12 godzin hodowli bakterii. Natomiast stężenie inuliny zmniejszyło się tylko o 34%. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian stężenia węglowodanów w ciągu ostatnich 12-16 godzin hodowli bakterii. Uzyskane wyniki wskazują więc, że przyrostowi gęstości optycznej kultur bakterii towarzyszył postępujący ubytek węglowodanów w podłożu hodowlanym. Te wyniki mogą sugerować, że ubywanie węglowodanów z podłoża było spowodowane ich wychwytem przez hodowane bakterie. Tę sugestię potwierdzają wyniki identyfikacji węglowodanów w podłożu po zakończeniu hodowli bakterii. W podłożu uzupełnionym inuliną stwierdzono, bowiem niewykorzystany wielocukier, co było prawdopodobnym powodem słabszego rozwoju populacji rosnących tam bakterii.

Materiałem do badań enzymatycznych był surowy preparat enzymatyczny, jego frakcja sedymentowa i rozpuszczalna oraz jej podfrakcje. Stwierdzono, że aktywność trawienna bakterii zależała od węglowodanu dodanego do podłoża, na którym hodowano te mikroorganizmy. Wykazano, że surowy preparat enzymatyczny bakterii hodowanych na fruktanie z tymotki katalizował najszybszy rozkład tego właśnie węglowodanu. Natomiast, najszybszym rozkładem sacharozy charakteryzował się surowy preparat enzymatyczny bakterii hodowanych na podłożu z inuliną i sacharozą. Wykazano również, że surowe preparaty enzymatyczne bakterii hodowanych na podłożach uzupełnianych cukrami prostymi, a zwłaszcza fruktozą, wykazywały wielokrotnie mniejszą aktywność niż pozostałe preparaty. Uzyskane wyniki sugerowały, więc, że węglowodany dodawane do podłoża były czynnikiem wybiórczo indukującym syntezę enzymów fruktanolitycznych i sacharolitycznych w komórkach bakterii.

Identyfikacji i charakterystyki enzymów dokonano wykorzystując surowy preparat enzymatyczny, jego frakcję sedymentową i rozpuszczalną oraz najaktywniejsze

podfrakcje frakcji rozpuszczalnej. Zidentyfikowano 4 enzymy. Dwa z nich katalizowały wyłącznie rozkład fruktanu z tymotki, to jest polimeru, w którym reszty fruktozylowe są połączone wiązaniami β -2,6-glikozydowymi. Stwierdzono, że końcowymi produktami rozkładu substratu były frukto-oligosacharydy złożone z dwóch do sześciu reszt fruktozylowych. Na podstawie uzyskanych wyników uznano, iż oba enzymy należą do fruktanohydrolaz 2,6- β -D-fruktanu (EC 3.2.1.65), nazywanych pospolicie endolewanazami. Stwierdzono, że zidentyfikowane enzymy przejawiały największą aktywność katalityczną gdy pH mieszaniny reakcyjnej wynosiło 6,0 a temperatura - 45°C. Masa cząsteczkowa, endolewanaz wynosiła, zaś 60,000 i 53,000, odpowiednio. W celu pełniejszej charakterystyki enzymów wyznaczono stałą Michaelisa (K_m) oraz maksymalną szybkość reakcji (V_{max}). Stwierdzono, że K_m endolewanaz wynosiła 0,75 i 1,75%, odpowiednio. Uzyskane wyniki wskazują, więc na większe powinowactwo do substratu pierwszej endolewanazy w porównaniu z drugą. V_{max} reakcji rozkładu substratu wynosiła 2,03 i 2,6 μ M fruktozy/mg białka na minutę, odpowiednio. Aktywność swoista częściowo oczyszczonych endolewanaz wynosiła 0,13 i 0,23 μ M uwolnionego produktu/mg białka na min.

Trzecim zidentyfikowanym enzymem była niespecyficzna β -fruktofuranazydaza czyli fruktohydrolaza β -D-fruktanu (EC 3.2.1.80) lub fruktohydrolaza β -D-fruktofuranazydów (EC 3.2.1.26). Enzym ten katalizuje rozkład sacharozy oraz odłączenie końcowej reszty fruktozylowej od polimerów fruktozy, w których reszty tego cukru są połączone wiązaniami zarówno β -2,6 (lewan) jak i β -2,1 (inulina) glikozydowymi. Ciężar cząsteczkowy enzymu oszacowano na 121,500. Stwierdzono, że najszybszy rozkład inuliny zachodził w mieszaninie reakcyjnej o pH 6,5 a fruktanu z tymotki i sacharozy - 6,0. Optymalna temperatura rozkładu wynosiła zaś 40°C. Nie stwierdzono wysycania się enzymu substratem, gdy była nim sacharoza a zależność między tempem rozkładu sacharozy a jej stężeniem w mieszaninie reakcyjnej była prostoliniowa. Stwierdzona zależność nie upoważniała do wyznaczenia stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej reakcji rozkładu.

Czwartym enzymem była, wykazująca swoistość substratową fosforylaza sacharozy. Zidentyfikowany enzym jest glukotransferazą dwusacharydu (EC 2.4.1.7). Analiza końcowych produktów rozkładu sacharozy wykazała obecność fruktozy, glukozo-1-fosforanu i niewielkich ilości wolnej glukozy. Stwierdzono, że zidentyfikowany enzym wykazywał również cechy syntazy, a jego aktywność zależała od obecności nieorganicznego fosforu w mieszaninie reakcyjnej. Wykazano, że

optymalne stężenie jonów fosforanowych wynosiło 56 mM. Zidentyfikowana fosforylaza sacharozy wykazywała optimum aktywności w pH 6.0 i temperaturze 45°C, a szybkość początkowa reakcji rozkładu substratu zależała od jego stężenia w mieszaninie reakcyjnej. Stwierdzono, że K_m formowania glukozy-1-fosforanu oraz uwalniania fruktozy wynosiły 4,4 mM i 6,39 mM sacharozy, odpowiednio. Wykazano również, że V_{max} reakcji tworzenia glukozy-1-fosforanu i uwalniania fruktozy z rozkładanej sacharozy wynosiły 1,19 mM i 1,56 mM produktu/mg białka na min. Uzyskane wyniki sugerowały również pewne zdolności tego enzymu do katalizowania hydrolizy sacharozy, która wspomagała, przypuszczalnie, fosforolizę przy wyższych stężeniach substratu w mieszaninie reakcyjnej. Stwierdzono, że fosforylaza sacharozy była obecna w surowych preparatach enzymatycznych bakterii hodowanych na fruktanie z tymotki, inulinie i sacharozie. Aktywność swoista częściowo oczyszczonej fosforylazy wynosiła 0.29 μ M uwolnionego produktu/mg białka na min, a ciężar cząsteczkowy – 48,000.

W badaniach fermentacyjnych stwierdzono, że podczas inkubacji z poszczególnymi węglowodanami bakterie uwalniały do podłoża kwas L-mlekowy i masłowy. Ich stężenie zwiększyło się wraz z czasem inkubacji z około 0,04-0,05 mM/100 ml do 1,1-3,5 mM/100 ml oraz z 0,18-0,19 mM/100ml do 0,3-0,44 mM/100 ml, odpowiednio i zależało od fermentowanego substratu. Najmniejszy przyrost mleczanu dawała fermentacja inuliny a największy - fruktozy Natomiast najmniejszy przyrost stężenia maślanu dawała również fermentacja inuliny a największy - sacharozy i fruktanu z tymotki. Wykazano także, że tempo produkcji kwasu masłowego wahało się od 0.1 do 0.35 μ M/mg białka mikrobiologicznego/godzinę, a L-mlekowego - od 0,30 do 7, 32 μ M/mg białka/godzinę i zależało od fermentowanego węglowodanu i okresu inkubacji. Przedstawione wyniki wskazują więc, że fermentacja mlekowa była głównym szlakiem przemian badanych węglowodanów w komórkach bakterii szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis*.

Podsumowanie: Zdolność wykorzystania sacharozy oraz fruktanu z tymotki i inulo-oligosacharydów przez bakterie żwaczowe szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis* oraz niezdolność wykorzystania wielkocząsteczkowej inuliny może sugerować ich przystosowanie do użytkowania węglowodanów występujących głównie w trawach, które są stałym składnikiem naturalnej diety przeżuwaczy.