

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

URČENÍ DOSTUPNOSTI AMIDOVANÝCH PEKTINŮ PRO MIKROORGANISMY TRAČNÍKU

MILAN MAROUNEK^{a,b}, ANDRIY SYNYTSYA^c,
JANA ČOPÍKOVÁ^c a KAMIL SIROTEK^{a,b}

^aÚstav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Vědecká 1083, 142 20 Praha 4, ^bVýzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, 104 01 Praha 10, ^cÚstav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
marounek@iapg.cas.cz

Došlo 5.1.05, přijato 10.3.05.

Klíčová slova: pektin, pektinamid, tračník, fermentace, mikroorganismy

Úvod

Pektin je polymer kyseliny D-galakturonové, z větší části esterifikované methanolem. Obsahuje i menší množství neutrálních sacharidů a necukerných složek. Tím, že je obsažen v zelenině a ovoci, je běžnou součástí naší stravy. Pektin má v organismu řadu významných účinků daných okolností, že v trávicím traktu zvyšuje viskozitu střevního obsahu a je dobře fermentován mikroorganismy terminálního ilea a tračníku. Zvýšení viskozity střevního obsahu ztěžuje vstřebávání cholesterolu, žlučových kyselin a lipidů. V pokuse s potkany pektin snížil cholesterolémii a obsah cholesterolu a lipidů v játrech¹. U prasat pektin snížil aktivitu pankreatické amylasy a zvýšil přestup proteinu a organické hmoty krmiva do tlustého střeva². Další autoři upozorňují, že pektin rovněž snižuje aktivitu pankreatické lipasy³. Ve fermentačních oddílech trávicího traktu je pektin přeměněn na směs těkavých mastných kyselin (TMK) a další metabolity⁴. Ve vztahu ke kolorektálnímu karcinomu je role pektinu dvojznačná. Na jedné straně je zdrojem energie pro bakteriální proteosyntézu, která vede ke snížení koncentrace toxického amoniaku. Na druhé straně rozpustné polysacharidy, ke kterým pektin patří, ztěžují sorpci kancerogenních látek hydrofobní povahy na nerozpustnou vlákninu a jejich následné vyloučení výkaly⁵. Fyziologické účinky pektinu jsou ovlivněny jeho fyzikálně-chemickými vlastnostmi. U potkanů byl hypocholesterolemický účinek významný jen při použití preparátu o vysoké molekulové hmotnosti a stupni esterifikace¹. Dá se očekávat, že hydro-

fobní deriváty pektinu budou mít v trávicím traktu jiné účinky než výchozí pektin, který má značnou afinitu k vodě, vytváří gel a zvyšuje viskozitu. Molekulu pektinu dokáží v trávicím traktu štěpit pouze mikrobiální enzymy. První zkouškou modifikovaných pektinů by proto mělo být zjištění dostupnosti pro mikroorganismy tračníku. V této práci popisujeme zkoušky dostupnosti amidovaných pektinů pro mikroorganismy tračníku prasat. Způsobem trávení se prasata a primáti zásadně neliší a k podobným zkouškám jsou vhodnější než laboratorní potkani. Stejný model použili pro srovnání amidovaného pektinu s pektinem o vysokém a nízkém stupni esterifikace methanolem Denis a spol.⁶

Experimentální část

Příprava amidovaných pektinů

Amidované pektiny byly připraveny z citrusového pektinu o vysokém stupni esterifikace (73 %) pomocí heterogenní amidace s *n*-butylaminem, *n*-hexylaminem, *n*-oktylaminem, *n*-dodecylaminem a *n*-oktadecylaminem⁷. Byly připraveny pektinamidy o nízkém (6,2 až 9,1 %) i vysokém (24,3–53,0 %) stupni substituce. Derivatizace změnila fyzikálně-chemické vlastnosti pektinu, zejména snížila rozpustnost a zvýšila schopnost vázat nepolární molekuly.

Inkubace amidovaných pektinů s obsahem tračníku prasat

Prasata krmená komerční směsí na bázi cereálií a extrahovaného sójového šrotu byla poražena v experimentálních jatkách VÚ živočišné výroby. Obsahy prvních třetin dvou tračníků byly smíchány a ředěny pufrům v poměru 4 g zažítiny + 36 ml pufru s hydrogenuhličitane sodným a dihydrogenfosforečnanem draselným⁸. Substrát byl přidán v množství 0,6 g. Inkubace probíhala ve 100 ml NTS lahvích s gumovými zátkami pod atmosférou CO₂, 24 h na vodní lázni při 39 °C. V kontrolních kulturách bylo 0,6 g pektinu použitého k syntéze pektinamidů doplněno 20 mg močoviny. Každé uspořádání bylo inkubováno ve 4 kulturách. Po ukončení inkubace byl v lahvích změřen tlak a v inkubační tekutině změřeno pH, stanoveny TMK (titračně, po vydestilování vodní parou) a laktát mikrodifusní metodou. Mikrodifusní metoda byla použita i pro stanovení amoniaku⁹ (v dalším pokuse).

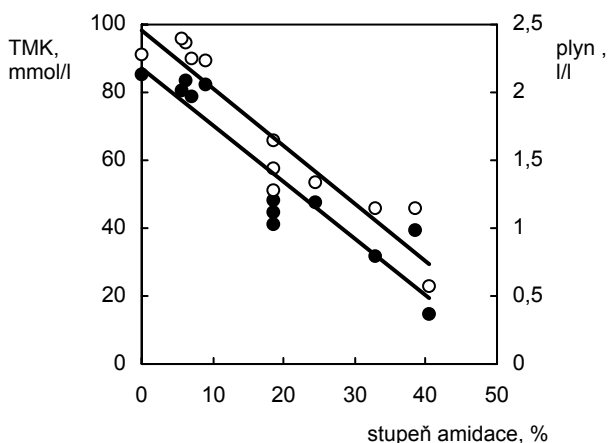
Růst bakterií tračníku na amidovaných pektinech

Obsah tračníku z celkem tří prasat byl příslušně zředěn a rozlit na Petriho misky s agarem Wilkins-Chalgren (Oxoid). Do půdy byl přidán pektin či oktadecylpektinamid o stupni substituce 30 a 53 % v množství 5 g l⁻¹. Petri-

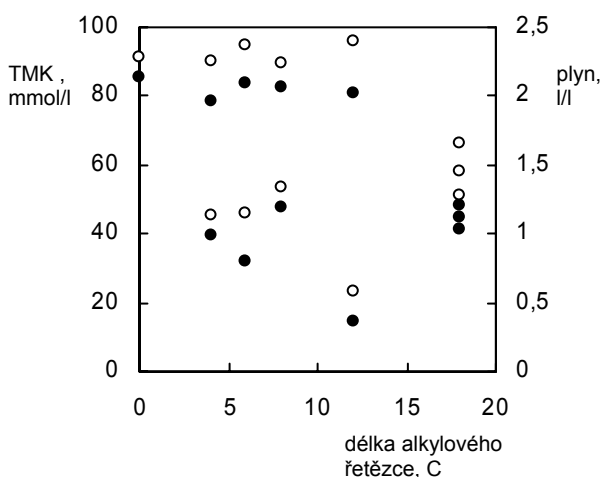
ho misky byly kultivovány 2 dny při 39 °C v anaerostatech (Anaerobic Plus System, Oxoid) pod atmosférou CO₂/H₂ (9:1). Pak byly narostlé kolonie spočítány a u náhodně zvolených zjištěna morfologie buněk po barvení podle Grama.

Výsledky a diskuse

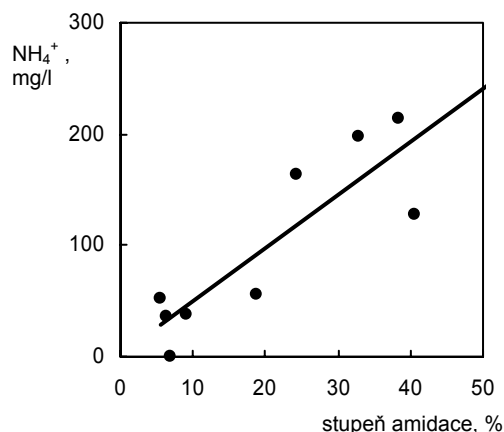
Produkce TMK i plynu v kulturách s amidovanými pektiny byla nižší než v kontrolních kulturách s výchozím preparátem pektinu. Produkce TMK a fermentačního plynu v kulturách s pektinem spolu korelovaly ($r = 0,92$; $P < 10^{-3}$). Nižší produkci metabolitů z amidovaného pektinu (vyjma amoniaku) pozorovali i Denis a spol.⁶, kteří však zkoušeli jediný pektinamid a neuvádí povahu jeho



Obr. 1. Tvorba těkavých mastných kyselin ● a fermentačního plynu ○ z pektinamidů o různém stupni amidace



Obr. 2. Tvorba těkavých mastných kyselin ● a fermentačního plynu ○ z pektinamidů s různou délkou alkylového řetězce



Obr. 3. Tvorba amoniaku z pektinamidů o různém stupni amidace

alkylového řetězce. Jak ukazuje obr. 1, produkce TMK i plynu negativně korelovaly se stupněm amidace molekul pektinu ($r = -0,93$ a $-0,88$; $P < 10^{-3}$). Při stupni amidace cca 20 % klesala fermentační rychlost na polovinu. Délka uhlíkatého řetězce alkylových substituentů neměla na fermentaci modifikovaných pektinů vliv (obr. 2). Z obr. 3 vyplývá, že s vyšším stupněm amidace se v kulturách s pektinem zvýšila i tvorba amoniaku ($r = 0,87$; $P < 10^{-3}$). Použitá analytická metoda však neumožňuje rozlišit mezi amoniakem a těkavými aminy uvolněnými hydrolýzou amidové vazby. Produkce kyseliny mléčné byla zanedbatelná, menší než 1 mmol l⁻¹.

Střední počet bakterií tračnicku prasat, schopných růstu na agaru s pektinem, byl 7,9.10⁸/g. Jiní autoři¹⁰ našli počty pektinolýtických bakterií v tračnicku prasat poněkud vyšší, 4,7.10⁹/g. Byl-li pektin nahrazen okta-decylpektinamidem o stupni amidace 30 %, klesl počet bakterií schopných růstu na tomto substrátu na 7,7.10⁷/g, při stupni amidace 53 % až na 4,9.10⁷/g. Mikroskopickým pozorováním bylo zjištěno, že bez ohledu na typ pektinu, byly hlavní morfologickou skupinou bakterií gramnegativní tyčinky (až 42 %), následované gram pozitivními koky (až 25 %) a tyčinkami (až 17 %). Další skupiny bakterií byly u různých zvířat zastoupeny velmi rozdílně.

Práce vznikla s podporou grantu GA ČR č. 525/03/0358.

LITERATURA

1. Judd P. A., Truswell A. S.: Br. J. Nutr. 53, 409 (1985).
2. Mosenthin R., Sauer W. C., Ahrens F.: J. Nutr. 124, 1222 (1994).
3. Tsujita T., Sumiyoshi M., Han L.-K., Fujiwara T., Tsujita J., Okuda H.: J. Nutr. Sci. Vitaminol. 49, 340 (2003).

4. Bourquin L. D., Titgemeyer E. C., Fahey G. C., Jr.: *Nutr. Res.* 16, 1119 (1996).
5. Ferguson L. R., Robertson A. M., Watson M. E., Triggs C. M., Harris P. J.: *Chem. Biol. Interact.* 95, 245 (1995).
6. Denis I., Durand M., Stevani J., Hannequart G., Dumay C.: *Sci. Aliments* 10, 265 (1990).
7. Synytsya A., Čopíková J., Marounek M., Mlčochová P., Sihelníková L., Blafková P., Tkadlecová M., Havlíček J.: *Czech J. Food Sci.* 21, 162 (2003).
8. Burroughs W. N., Frank A., Gerlaugh P., Bethke R. M.: *J. Nutr.* 40, 9 (1950).
9. Conway E. J.: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, 4. vydání. Crosby Lockwood & Son, London 1957.
10. Butine T. J., Leedle J. A. Z.: *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1112 (1989).

M. Marounek^{a,b}, A. Synytsya^c, J. Čopíková^c, and K. Sirotek^{a,b} (^a*Institute of Animal Physiology and Genetics, Prague*, ^b*Research Institute of Animal Production, Prague*, ^c*Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Assay of Availability of Amidated Pectins for Colon Microorganisms**

Amidated pectins were tested in cultures of the pig colon content. The cultures were incubated under CO₂ at 39 °C for 24 h and then production of volatile fatty acids (VFA), gas and ammonia were measured. Citrus pectin used for syntheses of amidated derivatives served as a control. Production of VFA and gas were significantly lower in cultures with amidated pectins than in control cultures. Production of VFA and gas correlated negatively and that of ammonia positively with the degree of amidation. The length of the carbon chain of alkyls had no effect on fermentability of modified pectins. Amidation of pectin reduced the number of colon bacteria capable of growing on the pectins by one order of magnitude. Gramnegative rods were the most numerous pectinolytic isolates.

40. konference

POKROKY V ORGANICKÉ, BIOORGANICKÉ A FARMACEUTICKÉ CHEMII – „LIBLICE 2005“

Sportovní Centrum Nymburk, 18.–20. listopadu 2005

Vážení kolegové,

Odborná skupina organické, bioorganické a farmaceutické chemie České společnosti chemické si Vás dovoluje pozvat na tradiční fórum českých a slovenských chemiků. Vedle zvaných hlavních přednášek (40+5 min) a (25+5 min) budou tvořit náplň konference krátká původní sdělení (10+5 min) a postery (0,85 × 0,85 m). Tématika těchto příspěvků nemusí navazovat na výše uvedené referáty. Vítána jsou sdělení z oblastí, které leží na hranici okruhu témat vytčených názvem konference. Podrobnosti a formuláře naleznete na webové stránce naší odborné skupiny, <http://uoch.vscht.cz/orbifachos/>. **Uzávěrka přihlášek a abstraktů je 5. září 2005.** V případě, že nemáte přístup k e-mailu nebo budete potřebovat další informace, kontaktujte, prosím, organizátory konference, prof. Pavla Drašara, tel. 220 444 283, fax 233 339 990, e-mail Pavel.Drasar@vscht.cz, nebo doc. Jaroslava Kvíčalu, tel. 220 444 242, fax 220 444 278, e-mail kvicalaj@vscht.cz.