

[Bakteriologisches Institut an der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt und Institut für Grünlandlehre der Technischen Universität München]

## Über den Abbau von Grasfruktosanen durch Laktobazillen aus Silage Decomposition of Grass-Fructosanes by Lactobacilli from Silage

A. Kleeberger und W. Kühbauch

Mit 3 Abbildungen

### Summary

Lactobacilli isolated from grass silage were shown to belong to *Lb. plantarum*, *Lb. casei* and *Lb. brevis*.

In studies on the degradation of fructosanes significant differences among the three species were found. While all strains of *L. casei* were able to degrade fructosanes from *Dactylis glomerata* or *Phleum pratense* regardless of the degree of polymerization, no member of *Lb. plantarum* or *Lb. brevis* could attack these polysaccharides.

### Zusammenfassung

Aus Grassilage wurden 33 Stämme isoliert, welche als Vertreter von *Lb. plantarum*, *Lb. casei* und *Lb. brevis* identifiziert werden konnten. In der Fähigkeit, Grasfruktosane abzubauen, unterschieden sich diese drei Spezies deutlich. Während sämtliche Vertreter von *Lb. casei* die aus Knautgras, und Lieschgras gewonnenen Fruktosane unabhängig von deren Polymerisationsgrad vergoren, zeigten sich die Vertreter von *Lb. plantarum* und *Lb. brevis* gegenüber diesen Polysacchariden inaktiv.

### Einleitung

Fruktosane sind die hauptsächlichen Reservekohlenhydrate der Gräser in den gemäßigten Klimazonen (OJIMA u. ISAWA 1968). Sie sind bei der Verfütterung an den Wiederkäuer voll verdaulich (NEHRING 1968), und es ist zu vermuten, daß der hohe Polymerisationsgrad dieser Verbindungen für eine gute Verträglichkeit verantwortlich ist. Am Beispiel der Stärke wurde ja bereits nachgewiesen, daß höherpolymere Kohlenhydrate in größeren Mengen besser vertragen werden als entsprechende Anteile Monosaccharide (KAUFMANN 1968). Es wäre also aus dieser Sicht wünschenswert, wenn gerade diese Kohlenhydrate den Silierungsprozeß überstehen und bei der Verfütterung noch unversehrt zur Verfügung stehen würden. Andererseits stellen aber die Fruktosane Gärsubstrate dar, welche im Falle mangelnder Mono- und Disaccharidmengen eine ausreichende Säurekonservierung in Silage sichern könnten. So konnten wir in einer früheren Arbeit (KÜHBAUCH u. KLEEGERGER 1974) feststellen, daß Fruktosane unterschiedlichen Polymerisationsgrades und unterschiedlicher Herkunft sowohl durch Silagepreßsaft als auch durch aus Silage isolierte Mischkulturen praktisch vollständig abgebaut werden. Ungeklärt blieb jedoch weiterhin die Frage, ob sämtliche der üblicherweise am Silierungsprozeß beteiligten Milch-



## Ergebnisse

Bei allen von uns isolierten Stämmen handelte es sich um Gram-positive, sporenlöse, Katalase-negative Stäbchen, welche Glucose unter anaeroben Bedingungen abbauten. Wir konnten also alle Isolate definitionsgemäß der Gattung *Lactobacillus* zuordnen. Die Feststellung der Zellmorphologie erbrachte im wesentlichen zwei verschiedene Ergebnisse. Entweder waren die Zellen ziemlich plump und dann in der Regel auch einzeln liegend, oder es handelte sich um größere länglichere Zellen, welche dann auch in fast allen Fällen in Ketten angeordnet waren.

Alle von uns isolierten Stämme wuchsen bei 15 °C. Sämtliche Isolate konnten deshalb den Streptobakterien bzw. den Betabakterien zugeordnet werden.

Die von uns getesteten und zur Feindifferenzierung verwendeten Merkmale sind in Tabelle 1 angegeben. Zur Differenzierung unserer bei 15 °C vermehrungsfähigen Laktobazillen benutzten wir den in Abb. 1 wiedergegebenen Bestimmungsschlüssel, der im wesentlichen aus den Angaben von SHARPE, FRYER u. SMITH (1966) resultiert.

Dabei erhielten wir drei Gruppen von Laktobazillen, welche wir als Vertreter von *Lb. plantarum*, *Lb. casei* und *Lb. brevis* identifizieren konnten. Unsere Ergebnisse stimmen damit gut mit den Angaben in der Literatur überein, wonach hauptsächlich diese Gruppen für die Silierung bedeutsam sind (REHM 1967, BUDZIER 1964, EICHHOLTZ 1960). Abweichend von den Angaben in der Literatur (SHARPE, FRYER u. SMITH 1966) konnten die von uns isolierten Vertreter der *Lb. brevis*-Gruppe Arabinose nicht vergären. Auf Grund der übrigen von uns geprüften Merkmale halten wir dennoch die Zuordnung zu dieser Gruppe für gerechtfertigt. Auch unsere Ergebnisse zur Zellmorphologie bestärkten uns in dieser Annahme, da es sich bei den von uns als *Lb. brevis* identifizierten Stämmen überwiegend um einzeln liegende, sehr plumpe Stäbchen handelte.

Innerhalb der von uns gefundenen Gruppierungen verhielten sich die verschiedenen Stämme in ihren physiologischen Eigenschaften sehr einheitlich. Einzelne abweichende Ergebnisse konnten von uns auf Grund der Übereinstimmung in den übrigen Eigenschaften vernachlässigt werden.

Hinsichtlich der Fähigkeit, Grasfruktosane abzubauen, unterschieden sich diese drei Spezies sehr deutlich. Während die Vertreter von *Lb. plantarum* und *Lb. brevis* die beiden von uns geprüften Fruktosane praktisch nicht abbauten, konnten die Stämme der *Lb. casei*-Gruppe beide Fruktosane bis auf einen geringen Rest spalten

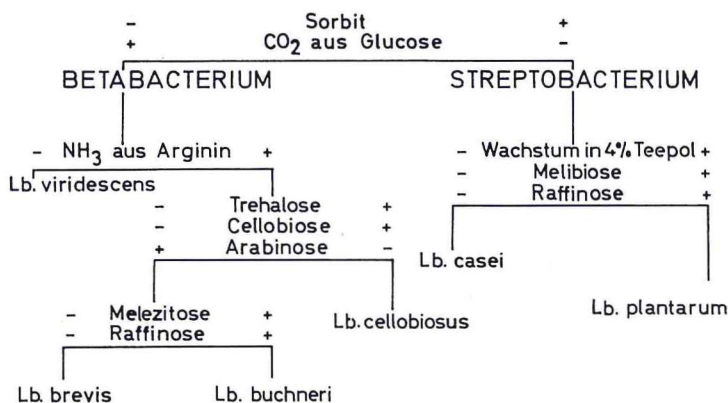


Abb. 1. Bestimmungsschlüssel für bei 15 °C vermehrungsfähige Laktobazillen.



säurebakterien die Fähigkeit besitzen, Fruktosane abzubauen. Die Kenntnis über diese Fähigkeit wäre aber eine der Voraussetzungen, hochwertige Silage durch Zugabe von Starterkulturen zu erhalten. An Versuchen in dieser Richtung hat es nicht gefehlt. Derartige Steuerungen des Silierungsprozesses lieferten jedoch nicht immer positive Ergebnisse. Dennoch dürften Versuche in dieser Richtung auch in Zukunft von Bedeutung sein. Für den gezielten Einsatz von Reinkulturen wäre es jedoch wünschenswert, einige definierte für einen günstigen Silierungsverlauf bedeutsame Eigenschaften der verwendeten Milchsäurebakterien zu kennen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die aus den oben genannten Mischkulturen isolierten Stämme zu differenzieren und festzustellen, ob sich die einzelnen Reinkulturen in bezug auf den Fruktosanabbau unterscheiden.

## Material und Methoden

### Isolierung der Reinkulturen

Die von uns im Rahmen einer früheren Arbeit (KÜHBAUCH u. KLEEBERGER 1974) isolierten Mischkulturen wurden auf MRS-Agar (DE MAN, ROGOSA u. SHARPE 1960) fraktioniert ausgestrichen und anaerob bei 30 °C bebrütet. Weiterhin wurden die Mischkulturen in flüssiges MRS-Medium geimpft und bei 7, 15, 20 und 30 °C bebrütet. Auch von diesen Flüssigkulturen wurden fraktionierte Reinigungsausstriche auf MRS-Agar angelegt und bei 30 °C anaerob bebrütet. Die abgestuften Bebrütungstemperaturen sollten Stämme mit verschiedenen Temperatursprüchen unterschiedlich bevorzugen und zu einer möglichst großen Anzahl von einzelnen Reinkulturen führen.

Nach erfolgter Bebrütung wurden von allen Ausstrichen Kolonien isoliert, welche sich morphologisch unterschieden. Diese Kolonien wurden daraufhin noch zweimal auf MRS-Agar gereinigt und die so erhaltenen Reinkulturen in stichbeimpftem MRS-Agar aufbewahrt.

### Differenzierung der Stämme

Die auf die angegebene Weise isolierten 33 Stämme wurden im Phasenkontrastmikroskop auf ihre Zellmorphologie geprüft. Außerdem wurde nach Gram gefärbt und auf Katalasereaktion getestet. Zur Feststellung des anaeroben Wachstums in Glucosemedium wurden die stichbeimpften MRS-Kulturen herangezogen. Und schließlich wurden jeweils Ausstriche auf MRS-Agar angelegt, welche sowohl aerob als auch anaerob bebrütet wurden.

Die in dieser Weise grobdifferenzierten Stämme wurden anschließend auf folgende Eigenschaften geprüft: Wachstum bei 15 °C, Wachstum in 0,4 % Teepol, Bildung von  $\text{NH}_3$  aus Arginin, Gasbildung aus Glucose sowie Vergärung von Arabinose, Galaktose, Trehalose, Cellobiose, Maltose, Melibiose, Saccharose, Raffinose, Melezitose, Sorbit, Salicin und Amygdalin.

Die Wachstumsversuche wurden in MRS-Bouillon durchgeführt. Ebenso wurde auf Gasbildung aus Glucose in MRS-Bouillon mit Durhamröhrchen geprüft. Der Test auf  $\text{NH}_3$ -Produktion aus Arginin wurde nach den Angaben von COWAN (1965) durchgeführt, und zu den Gärversuchen wurde ein modifiziertes MRS-Medium (SHARPE, FRYER u. SMITH 1966) benutzt, dem die einzelnen Kohlenhydrate in einer Endkonzentration von 0,5 % sterilfiltriert zugegeben wurden. Die Bebrütungszeit betrug beim Test auf Argininhydrolyse 24 Std., bei allen übrigen Tests 7 Tage. Als Bebrütungstemperatur wählten wir abgesehen von den Temperaturversuchen 30 °C.

Die Differenzierung der Stämme erfolgte nach den Angaben von SHARPE, FRYER u. SMITH (1966).

### Bakterieller Abbau von Grasfruktosanen

Zur Bestimmung des Abbaus von Grasfruktosanen wurde modifiziertem MRS-Medium alternativ Fruktosan aus Lieschgras mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad (DP) von 155 oder Fruktosan aus Knaulgras mit einem DP von 52 in einer Endkonzentration von 0,1 % sterilfiltriert zugegeben. Diese Medien wurden jeweils mit den von uns isolierten 33 Stämmen beimpft und bei 30 °C 48 Std. bebrütet. Als Kontrollen dienten uns unbeimpfte Röhrchen, welche ebenfalls 48 Std. bei 30 °C bebrütet wurden. Der Kohlenhydratabbau wurde im enteweißten Medium mit Hilfe eines kolorimetrischen Verfahrens mit Arsenmolybdat (SOMOGYI 1952) in der bereits beschriebenen Weise bestimmt (KÜHBAUCH 1973).



Abb. 2. Bakterieller Abbau von Fruktosan aus Knautgras (DP = 52).

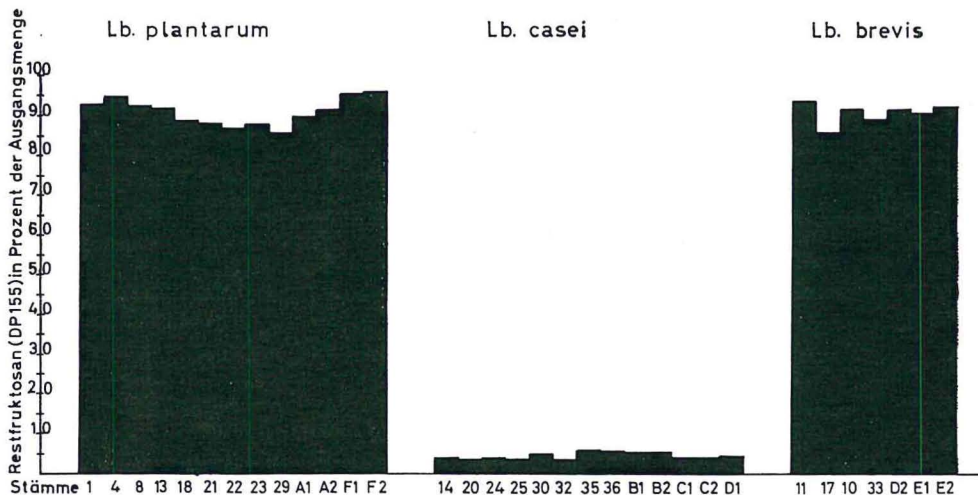


Abb. 3. Bakterieller Abbau von Fruktosan aus Lieschgras (DP = 155).

(Abb. 2 und 3). Grasfruktosan mit einem DP von 155 wurde dabei noch besser abgebaut als Grasfruktosan mit einem DP von 52. Während letzteres bis auf einen mittleren Rest von 10,36 % der Ausgangsmenge vergoren wurde, verblieb von Fruktosan mit einem DP von 155 lediglich ein mittlerer Rest von 4,57 %. In früheren Untersuchungen (KÜHBAUCH u. KLEEBERGER 1974) konnten wir nachweisen, daß Fruktosan mit einem DP von 52 wesentlich schneller abgebaut wird als Fruktosan mit einem DP von 155. Damals arbeiteten wir jedoch ausschließlich mit Mischkulturen, und außerdem läßt die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendete Bebrütungszeit von 48 Std. keinen Schluß auf die Abbaukinetik während dieses Zeitraums zu.

Tabelle 1. Merkmalstabelle für die aus Silage isolierten Laktobazillen

Stamm	15 °C	0,4 % Teepol	Arginin	Gas aus Glucose	Arabinose	Galaktose	Trehalose	Cellulose	Maltose	Melibiose	Saccha- rose	Raffinose	Melezitose	Sorbit	Salicin	Amyg- dalin	aerobes Wachstum	Zellmor- phologie
<i>Lb. plantarum</i>																		
1	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	pe
4	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pe
8	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pe
13	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pe
18	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pe
21	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pk
22	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pe
23	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pe
29	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	pe
A1	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pe
A2	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pk
F1	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pe
F2	+	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pe
<i>Lb. casei</i>																		
14	+	-	-	-	-	+	(+)	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	gk
20	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	gk
24	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	gk
25	+	-	-	-	-	+	(+)	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	gk
30	+	-	-	-	-	+	(+)	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	gk
32	+	-	-	-	-	+	(+)	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	pk
35	+	-	-	-	-	+	(+)	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	gk
36	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	pk
B1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	pk
B2	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	gk
C1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	gk
C2	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	gk
D1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	gk
<i>Lb. brevis</i>																		
11	+	-	+	+	-	(+)	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	-	-	+	pe
17	+	-	-	+	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	+	-	-	-	+	pe
10	+	-	+	+	-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-	+	-	-	-	+	pe
33	+	-	+	+	-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-	+	-	-	-	+	pe
D2	+	-	+	+	-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-	+	-	-	-	+	pk
E1	+	-	+	+	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	+	-	-	-	+	pe
E2	+	-	+	+	-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-	+	-	-	-	+	pe

+ = positiv; - = negativ; (+) = schwach positiv; p = plumpe Stäbchen; g = große Stäbchen; e = einzeln liegend; k = in Ketten angeordnet.



Wir betrachten unsere Ergebnisse als einen weiteren Schritt, die Verwendung von Starterkulturen in der Silagebereitung zu verbessern. Dabei plädieren wir für biotop eigene Stämme, welche darüber hinaus definierte, für den Silierungsprozeß günstige stoffwechselphysiologische Eigenschaften besitzen.

### Literatur

- BECK, TH.: Die Mikrobiologie der Gärfutterbereitung. Eine zusammenfassende Darstellung des derzeitigen Wissensstandes. Das Wirtschaftseigene Futter **12** (1966), 227—263.
- BUDZIER, H. H.: Beiträge zur Methodik der mikrobiologischen Untersuchung von Gärfutter. 7. Mitt.: Die Kolonietypen von stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (*Lactobacillus* spp.) auf Tomatensaft-Acetat-Agar. Zbl. Bakt. II **118** (1964), 667—670.
- COWAN, S. T.: Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge 1965.
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M., and SHARPE, M. E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. J. appl. Bact. **23** (1960), 130.
- EICHHOLTZ, F.: Silage und ähnliche Gärerzeugnisse. Sammlung „Die Wissenschaft“. Braunschweig 1960.
- KAULMANN, W.: Hohe Leistung von Milchkuhen und Mastrindern erfordern beste Futterqualität und richtige Rationsgestaltung (Vortrag). Arch. DLG **43** (1968).
- KÜHBAUCH, W.: Veränderung von Kohlenhydratfraktionen in Blättern und Stengeln einiger Knäulgrassorten während des Wachstums. Landw. Forschung **26** (1973), 213—220.
- and KLEEGERGER, A.: Bacterial Decomposition of Polymerization. J. Brit. Grassland Soc. **30**, 223—227 (1975).
- NEHRING, K.: Die Bestimmung der Kohlenhydrate in den Futterstoffen — ein Beitrag zur Entwicklung der Futtermittelanalyse. Sitzber. dtsh. Akad. Landwirtschaftswiss. **10** (1968), 101—118.
- NILSSON, G., and NILSSON, P. E.: The microflora on the surface of some fodder plants at different stages of maturity. Arch. Mikrobiol. **24** (1956), 412—422.
- OJIMA, K., and ISAWA, T.: The variation of carbohydrates in various species of grasses and legumes. Canad. J. Bot. **46** (1968), 1507—1511.
- REHM, H. J.: Industrielle Mikrobiologie. Berlin 1967.
- RYDIN, C.: Silage studies, VII. Studies on fermentation processes in silage. Starch as a source of carbohydrate for the lactic acid fermentation. Arch. Mikrobiol. **27** (1957), 82—104.
- SHARPE, M. E., FRYER, T. F., and SMITH, D. G.: Identification of the Lactic Acid Bacteria. In: Identification Methods for Microbiologists. Part A, London 1966.
- SOMOGYI, M.: Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. **195** (1952), 19—23.

Anschrift der Verfasser:

A. KLEEGERGER, Bakteriologisches Institut an der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, TU München, 805 Freising-Weihenstephan (BRD), und Dr. W. KÜHBAUCH, Institut für Grünlandlehre, TU München, 805 Freising-Weihenstephan (BRD).

## Diskussion

Die von uns aus Grassilage isolierten Milchsäurebakterien konnten wir als Vertreter von *Lb. plantarum*, *Lb. casei* und *Lb. brevis* identifizieren. Damit stimmen unsere Ergebnisse gut mit den Angaben in der einschlägigen Literatur überein, nach denen im wesentlichen diese Gruppen für den Silierungsablauf bedeutsam sind (REHM 1967, BUDZIER 1964, EICHHOLTZ 1960). Während *Lb. plantarum* und *Lb. casei* den homofermentativen Streptobakterien zuzuordnen sind, repräsentiert *Lb. brevis* die heterofermentative Untergruppe der Betabakterien. Nach EICHHOLTZ (1960) greifen nacheinander *Lb. plantarum*, *Lb. casei* und Vertreter der Betabakterien in den Silierungsprozeß ein. Die Starterfunktion für die Milchsäuregärung übernehmen also die Vertreter von *Lb. plantarum*.

In bezug auf die Fähigkeit, Fruktosane abzubauen, erwiesen sich die drei von uns identifizierten Gruppen als sehr homogen. Während sämtliche Stämme der *Lb. casei*-Gruppe beide von uns untersuchten Fruktosane praktisch vollständig abbauten, erwiesen sich alle Vertreter von *Lb. plantarum* und *Lb. brevis* gegenüber diesen Polysacchariden als inaktiv.

Dieses derart scharf abgrenzende Merkmal könnte durchaus als weitere Eigenschaft zur taxonomischen Untergliederung der Laktobazillen Verwendung finden. Von besonderem Interesse wäre es dabei festzustellen, ob die für Milch so typischen Vertreter von *Lb. casei* ebenfalls diese Fähigkeit besitzen.

Für die Auswahl von Starterkulturen können unsere Ergebnisse zum Fruktosanabbau ebenfalls von Bedeutung sein. Wenn man bestrebt ist, höherpolymere gutverträgliche Kohlenhydrate, wie sie die Fruktosane darstellen, während des Silierungsprozesses zu erhalten, scheidet also *Lb. casei* als Impforganismus von vornherein aus. Vermutlich würden sich auf Grund des frühen Eingreifens in die Milchsäuregärung Vertreter von *Lb. plantarum* am ehesten für diesen Zweck eignen.

Selbstverständlich müßte geklärt werden, ob Grasfruktosane während der Silierung nicht ohnehin durch saure Hydrolyse oder durch pflanzeneigene bzw. bakterielle Carbohydrasen in niedermolekulare Bestandteile zerlegt werden, welche dann auch von *Lb. plantarum* vergoren werden können. Derartige Carbohydrasen spielen nach RYDIN (1957) vor allem bei angewelktem Siliergut eine Rolle.

Eine ausreichende Säuerung dürfte durch die in den Gräsern vorhandenen niedermolekularen Kohlenhydrate gewährleistet sein. Derartige Kohlenhydrate sind in der sog. Siloreife der Gräser in ziemlich großer Menge vorhanden.

Ein rasches Einsetzen der Milchsäuregärung ist ja für einen erfolgreichen Ablauf des Silierungsprozesses von entscheidender Bedeutung. Da Laktobazillen jedoch auf den zur Silierung benutzten Pflanzen in der Regel deutlich unterrepräsentiert sind (BECK 1966, NILSSON u. NILSSON 1956), erscheint eine Beimpfung des Silierguts auch aus dieser Sicht in Zukunft erfolversprechend zu sein. Für diesen Zweck ist jedoch in jedem Fall die Verwendung von biotopeigenen Stämmen zu fordern. Die Auswahl von biotopfremden Laktobazillen ist wohl für die zum Teil bis jetzt unbefriedigenden Ergebnisse mitverantwortlich.

Die von uns im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Stämme müßten sich jedoch nach unserem Dafürhalten für eine künstliche Beimpfung eignen. Von Bedeutung könnte dabei auch die Tatsache sein, daß abgesehen von den Stämmen 35 und 36, also zwei Vertretern der *Lb. casei*-Gruppe, alle Isolate unter aeroben Verhältnissen gutes Wachstum zeigten (Tabelle 1). Diese Eigenschaft könnte für ein rasches Einsetzen der Milchsäuregärung sorgen. Während der anfänglich im Siliergut enthaltene Restsauerstoff für mikroaerophile Laktobazillen ungünstige Verhältnisse bietet, könnten die von uns isolierten Stämme vermutlich sofort aktiv werden.