

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXIII, 28

SECTIO E

1968

Z Katedry Technologii Rolnej Wydziału Rolniczego WSR w Lublinie.
Kierownik: prof. dr Stanisław Bujak

Stanisław BUJAK i Eugenia PODGÓRSKA

**Wpływ pH środowiska na plony β -karotenu w hodowlach
wybranego szczepu drożdży z rodzaju *Rhodotorula***

Влияние pH среды на выход каротина при взращивании выбранного штамма
дрожжей из рода *Rhodotorula*

Influence of pH of the Medium on the Yield of β -Carotene in Cultures of a Selected Strain of Yeast of the *Rhodotorula* Genus

Badania prowadzone w wielu krajach nad mikrobiologiczną syntezą karotenów miały głównie na celu uzyskiwanie wysokich plonów tego prowitaminu. Ciegler i jego współpracownicy (5, 6, 7) przy użyciu szczepów *Blakeslea trispora* uzyskiwali plony β -karotenu wynoszące ok. 140 mg w 100 ml hodowlanego podłoża. Podobne plony uzyskiwał w Polsce Paz oła również w oparciu o ten gatunek drobnoustroju (13, 14). We Francji w zakładach Rhone-Poulence otrzymywano plony wynoszące ok. 200 mg β -karotenu w 100 ml hodowli dzięki stosowaniu stymulatorów w tej syntezie w postaci pochodnych pirydyny, kwasu izonikotynowego oraz trójmetylocykloheksanonu (12, 15). Podobne badania przy użyciu *Blakeslea trispora* są prowadzone w Związku Radzieckim (8, 11, 17).

Jednakże pomimo uzyskiwania tak wysokich plonów głównie β -karotenu w hodowlach *B. trispora* są prowadzone dalsze poszukiwania organizmów syntetyzujących karoteny, chociaż nawet mniej wydajnych w tej syntezie niż *B. trispora* (10, 16, 18, 19, 20). Przyczyn tego zjawiska należy doszukiwać się prawdopodobnie w trudnościach dobrego opanowania hodowli *B. trispora* i przechowywania go w kolekcjach muzealnych, dzięki czemu plony karotenu w przypadku użycia tego organizmu w produkcji ulegały znacznym wahaniom.

Chu i Lilly (4) badali uzdolnienia *Choanephora cucurbitarum* do

syntezy karotenów, Brewers i inni (2) hodowali w tym celu *Physarum polycephalum*, a Masei i Rouborn *Penicillium sclerotinum* (10). Wozniakowska i Chotjanowicz (20) poszukiwali producentów pigmentów karotenoidowych wśród epifitycznej mikroflory, Trofimienko i współpracownicy w obrębie rodzaju drożdży *Rhodotorula* (18), Tarasowa zaś wśród innych grzybów (16). Bobkova (1) badała pigmenty karotenoidowe drobnoustrojów wykorzystujących węglowodory jako jedyne źródło węgla, wśród których dominowały bakterie i drożdże z rodzaju *Rhodotorula* (1).

W ostatnich latach zainteresowanie drożdżami z rodzaju *Rhodotorula*, producentami pigmentów karotenoidowych, znacznie zmalało, prawdopodobnie z powodu uzyskiwania niskich plonów biomasy i karotenów (3, 19).

W poprzedniej pracy (3) zaobserwowano, że w czasie trwania hodowli tych drożdży występowało znaczne obniżanie się pH środowiska hodowlanego, co w znacznym stopniu wpływało na obniżenie plonu biomasy drożdży i β -karotenu.

Celem tej pracy było zbadanie dynamiki zmian pH podłoża w hodowli wybranego szczepu *Rhodotorula* oraz wpływu odczynu środowiska na plon β -karotenu.

METODY BADAŃ

W badaniach używano szczepu Rh-3, o cechach zbliżonych do *Rhodotorula aurantiaca*. Hodowle prowadzono na wytrząsarce rotacyjnej, na podłożu zawierającym sacharozę jako źródło węgla, azotan amonu jako źródło N i potrzebne sole mineralne, podobnie jak w poprzedniej pracy (3), w pracach Dyra i Prausa (9) oraz Wittmanna (19).

Czas trwania każdej hodowli wynosił 4 doby w temp. 30° w pomieszczeniu ciemnym. Po 4 dobach hodowli drożdże odwirowywano, osad drożdżowy przemywano i powtórnie odwirowywano, następnie oznaczano plon suchej masy drożdży i zawartość β -karotenu. Zawartość w drożdżach karotenu oznaczano wg metody używanej przez Dyra i Prausa (9).

Dla zbuforowania podłoża hodowlanego dodawano buforu składającego się z 1,3 g kwasu cytrynowego, 1,9 g glicyny i 1,9 g KH_2PO_4 w 50 ml destyl. H_2O . W ten sposób sporządzony bufor miał $pH = 3,5$. Dla ustalenia pH podłoża na odpowiednim poziomie dodawano, oprócz buforu, od 0,3 do 0,8 ml 30% roztworu wodnego NaOH na 25 ml płynu buforowego.

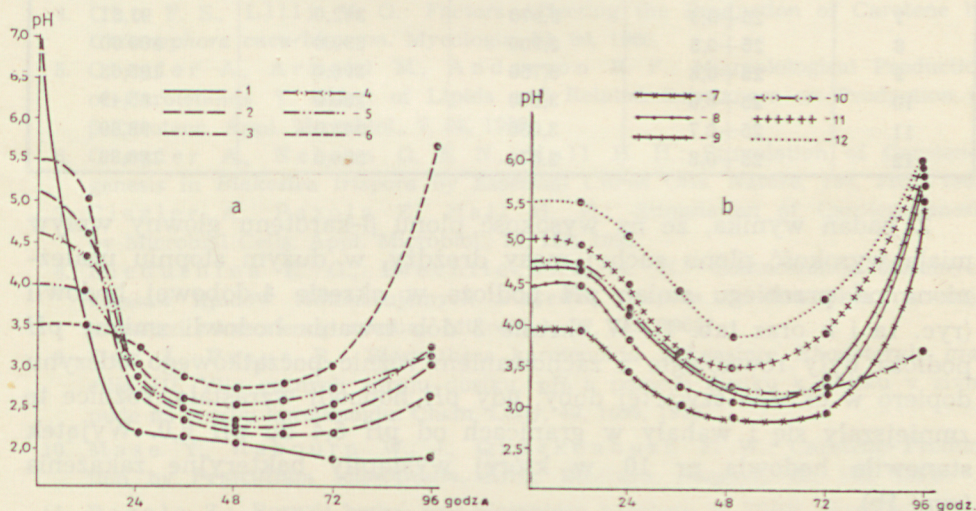
Hodowle prowadzono w 2 równoległych powtórzeniach w kolbach płaskodennych o pojemności 500 ml. Objętość każdej hodowli wynosiła 100 ml. Podłoża zaszczipiano 5 ml 3-dobowej hodowli.

PRZEBIEG I WYNIKI BADAŃ

Ogółem przeprowadzono 12 hodowli w podłożach niezbuforowanych i zbuforowanych w różnym stopniu w celu zbadania zmian pH środo-

wiska w okresie 4-dobowej fermentacji i określenia wpływu tych zmian na plon suchej masy drożdży i zawartość w nich β -karotenu. Przebieg zmian pH środowisk hodowlanych przedstawiono na ryc. 1a i b, a uzyskane plony w tab. 1.

W podłożach niezbuforowanych (nr 1) już w okresie pierwszych 12 godz. trwania hodowli następował gwałtowny spadek wartości pH do ok. 2,5 i dalszy już nieznaczny spadek do 1,9 po 96 godz., pomimo iż początkowe pH podłoża było wysokie. Już nawet słabe zbuforowanie podłoża przez dodatek 5 ml buforu do 100 ml hodowli zwiększało plon karotenu o ok. 100% w stosunku do kombinacji bez buforu, chociaż pH obniżało się znacznie, bo do ok. 2,2 po 48 godz. trwania hodowli przy niewielkim wzroście odczynu pod koniec doświadczenia. W kombinacji, do której dodano 25 ml buforu na 100 ml podłoża uzyskano dalszy wzrost plonu karotenu i suchej masy drożdży, chociaż początkowe pH hodowli było stosunkowo niskie (ryc. 1a i tab. 1). W tym ostatnim przypadku nastąpił znaczny wzrost pH po 72 godz. trwania fermentacji.



Ryc. 1. Wpływ zbuforowania podłoża hodowlanego na przebieg zmian pH w okresie 96-godzinnej hodowli szczepu Rh-3; a — podłoże słabo zbuforowane, b — podłoże dobrze zbuforowane; krzywe 1—12 odpowiadają numerom hodowli w tab. 1
Influence of buffering of culture medium on changes in pH during 96-hours' culturing of strain Rh-3; a — medium slightly buffered, b — medium well buffered; curves 1—12 correspond to the numbers of cultures in Table 1

Przez użycie podłoży dobrze zbuforowanych, których początkowe pH ustalono w granicach od ok. 4,0 do 5,5 przez dodatek różnej ilości NaOH uzyskiwano plony karotenu powyżej 300 μ g w 100 ml hodowli (ryc. 1b). Jedynie w przypadku hodowli nr 10, w której na skutek bakteryjnej

infekcji pH po 72 godz. podwyższyło się tylko do ok. 4,7, uzyskano plon karotenu niższy (ryc. 1b).

W podłożu niezbuforowanym zawartość karotenu w 1 g s.m. drożdży nie odbiegała od zawartości tego prowitaminu w s.m. drożdży uzyskanych w środowiskach dobrze zbuforowanych, jedynie plon s.m. drożdży był 4 do 6 razy niższy od plonów uzyskiwanych przy użyciu buforu.

Tab. 1. Plony suchej masy drożdży i β -karotenu w hodowlach szczepu Rh-3
Yield of dry mass of yeast and of β -carotene from cultures of strain Rh-3

Nr hodowli	Dodatek buforu i NaOH ml	Plon s. m. drożdży w 100 ml g	Plon β -karotenu w 100 ml hodowli μg	β -karoten w 1 g s. m. drożdży μg
1	bez buforu	0,710	70,0	98,01
2	5	2,362	136,0	57,58
3	6	2,505	234,0	93,41
4	8	2,666	244,0	91,52
5	12	2,815	244,0	86,68
6	25	3,445	280,0	81,28
7	25+0,3	3,970	362,0	91,31
8	25+0,5	3,900	390,0	100,00
9	25+0,6	3,750	396,0	105,63
10	25+0,6	3,280	280,0	85,49
11	25+0,7	3,680	345,0	93,69
12	25+0,8	3,570	360,0	100,89

Z badań wynika, że na wysokość plonu β -karotenu główny wpływ miała wysokość plonu suchej masy drożdży, w dużym stopniu uzależniona od przebiegu zmian pH podłoża w okresie 4-dobowej hodowli (ryc. 1a i b oraz tab. 1). W okresie 3 dób trwania hodowli zmiany pH podłoża były równoległe z zachowaniem różnic początkowego odczynu dopiero w okresie czwartej doby, gdy pH hodowli wzrastało, różnice te zmniejszały się i wahały w granicach od pH 5,4 do pH 6,0. Wyjątek stanowiła hodowla nr 10, w której wystąpiły bakteryjne zakażenia (ryc. 1b).

WNIOSKI OGÓLNE

1. Wybrany szczep Rh-3, o cechach zbliżonych do *Rhodotorula aurantiaca* w okresie 3 dób hodowli na podłożu płynnym, zawierającym sacharozę jako źródło węgla i azotan amonu jako źródło azotu, w znacznym stopniu obniżał pH środowiska.

2. W czwartej dobie hodowli następował szybki wzrost pH zbuforowanych środowisk; w przypadku użycia podłoża niezbuforowanego, odczyn jego nie ulegał większym zmianom w tym okresie.

3. pH hodowli prowadzonych w środowiskach w dostatecznym stopniu zbuforowanych było zawsze wyższe po 4 dobach od odczynu początkowego.

4. Plony suchej masy drożdży i wysokość plonów β -karotenu zależały od przebiegu zmian pH podłoża, zachodzących w okresie hodowli.

5. Nie znaleziono zależności pomiędzy charakterem zmian pH podłoża, występujących podczas hodowli, a zawartością β -karotenu w 1 g suchej masy drożdży.

PIŚMIENNICTWO

1. Bobkova T. S.: Karotinoidnyje pigmenty mikobaktierii i drożdżej. *Mikrobiol.*, 34, 277, 1965.
2. Brewer E. N., Kuraishi S., Garver J. C., Strong F. M.: Mass Culture of a Slime Mold *Physarum polycephalum*. *Appl. Microbiol.*, 12, 161, 1964.
3. Bujak S.: Wstępne badania nad syntezą karotenów przez różne szczepy drożdży *Rhodotorula*. *Acta Microb. Polon.*, 10, 408, 1961.
4. Chu F. S., Lilly V. G.: Factors Affecting the Production of Carotene by *Choanephora cucurbitarum*. *Mycologia*, 52, 80, 1960.
5. Ciegler A., Arnold M., Anderson R. F.: Microbiological Production of Carotenoids. V. Effect of Lipids and Related Substances on Production of β -Carotene. *Appl. Microbiol.*, 7, 98, 1959.
6. Ciegler A., Nelson G. E. N., Hall H. H.: Stimulation of Carotenogenesis in *Blakeslea trispora* by Essential Citrus Oils. *Nature*, 198, 1305, 1965.
7. Ciegler A., Pazoła Z., Hall H. H.: Stimulation of Carotenogenesis by Microbial Cells. *Appl. Microbiol.*, 12, 150, 1964.
8. Dieduchina E. G., Biechtierowa M. N.: Sootnoszenije otdielnykh klassow lipidow sintezirujemykh *Blakeslea trispora* w dinamike razwitiya w swiazi s karotienogenezom. *Mikrobiol.*, 37, 245, 1968.
9. Dyr J., Praus R.: Biosyntheseza karotenoidu v kvasince *Rhodotorula gracilis*. III. Vliv ruznykh zdroju dusiku, pH a pomeru dusiku k uhliku v zivne pude na tvorbu karotenoidu. *Chem. Listy*, 49, 1699, 1955.
10. Mase Y., Rouborn W. J., Quackenbush F. W.: Carotene Production by *Penicillium sclerotinum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 68, 150, 1957.
11. Pazoła Z.: Rozwój badań nad biosyntezą karotenu w ZSRR. *Biul. Informac. Przem. Koncentr. Spożyw.*, 4, 25, 1967.
12. Pazoła Z.: Nowe osiągnięcia w dziedzinie badań nad otrzymywaniem karotenu metodą fermentacji. *Biul. Informac. Przem. Koncentr. Spożyw.*, 7, 16, 1967.
13. Pazoła Z., Świtek H., Janicki J., Michnikowska W.: Otrzymywanie karotenu metodą fermentacji za pomocą pleśni *Blakeslea trispora*. Część I. *Prace Instyt. i Laborat. Bad. Przem. Spożyw.*, 3, 117, 1967. Część II. *ibid.*, 4, 267, 1967.
14. Pazoła Z., Niewiadomski H., Salmonowicz J., Świtek H., Michnikowska W.: Effect of Various Lipids on the Production of Carotenoids by Mated Strains of *Blakeslea trispora* and on the Chemical Composition of Mycelium Fat. *Acta Microbiol. Polon.*, 17, 75, 1968.

15. Rhone-Poulence, francuskie patenty: 1 377 523 (6 XI 1964); 1 412 506 (17 VIII 1964).
16. Tarasowa N. W., Biechtierowa M. N.: Biosintez karotina niektórymi gribami. Usp. Mikrobiol., 3, 174, 1966.
17. Tarasowa N. W., Bołtianska E. W., Kałmykowa H. J., Fieofilowa E. P., Iptyszewa K. D., Biechtieriewa M. N.: Dinamika razwitiya kultury *Blakeslea trispora* i obrazowanije jeju karotina. Prikladn. Bioch. Mikrobiol., 3, 173, 1967.
18. Trofimienko N. M., Griszina E. M., Kotielew W. W.: Srawnitielnoje izuczenije kultur mikroorganizmow po sposobnosti sintieza karotinoidowych pigmentow. Ispolzowanije mikroorganizmow w narodnom choziajstwie. Kartja Mold., Kisziniew, 3, 1965.
19. Wittmann H.: Changes in Carotenes of *Rhodotorula rubra* in Different Conditions of Growth. Arch. Mikrobiol. 25, 373, 1957.
20. Wozniakowska J. M., Chotjanowicz A. W.: Otor mikrobow- producentow karotina iz epifitnoj mikroflory. Prikl. Bioch. Mikrobiol., 1, 299, 1965.

РЕЗЮМЕ

Целью работы было изучение процесса изменений происходящих в pH субстрата, в котором культивировался похожий на *Rhodotorula aurantiaca* выбранный штамм Rh-3, и определение влияния этих изменений на выход β -каротина.

Культивирование проводилось в жидком субстрате, содержащем сахарозу и азотнокислый аммоний как источники углерода и азота, на ротационной болталке в течение 96 часов при температуре $30^{\circ}C$ в темноте. Для того чтобы довести объем субстрата до 100 мл, кроме необходимых минеральных солей прибавлялось 6—25 мл буферного раствора, состоящего из 1,3 г лимонной кислоты, 1,9 г глицина и 1,9 г KH_2PO_4 в 50 мл дистиллированной H_2O .

В течение 72 часов культивирования наблюдалось значительное понижение pH среды, а потом происходило повышение pH культуры (рис. 1а и б). Независимо от степени буферности субстрата его конечный pH после 96 часов всегда был больше, чем начальный pH .

Количество сухой массы дрожжей и выход β -каротина зависели от процесса изменений pH субстрата. Самый большой урожай β -каротина был получен при начальном pH равном 4,0—4,7, после 48 и 72 часов культивирования при уровне 3,1—3,3, а в конце культивирования — 5,7—5,9.

SUMMARY

The object of the work was to investigate the changes in pH of the medium in which the selected strain Rh-3, similar to *Rhodotorula auranti-*

tiaca, was cultured, and to determine the influence of these changes on the yield of β -carotene.

The cultures were carried on in a liquid medium containing saccharose and ammonia nitrate as sources of carbon and nitrogen; a rotary shaker was used for 96 hours at 30°, in darkness. The culture medium was given, apart from the necessary mineral salts, also a buffer solution consisting of 1.3 g citric acid, 1.9 g glycine and 1.9 g KH_2PO_4 in 50 ml distilled water, to complete the volume of the medium to 100 ml.

During the first 72 hours of culturing there occurred a considerable decrease of the pH of the medium; later, the pH of the culture increased (Fig. 1, a and b). Independently of the degree of buffering of the medium, its final pH after 96 hours was always higher than the initial pH.

The yield of dry mass of yeast and of β -carotene depended on the changes of the pH of the medium. The highest yield of β -carotene was obtained at the following pH values: initial from 4.0 to 4.7, after 48 and 72 hours of culturing from 3.1 to 3.3, final from 5.7 to 5.9.