

Instytut Chemii i Technologii Rolnej Wydziału Rolniczego
Akademii Rolniczej w Lublinie

Stanisław BUJAK, Bohdan ACHREMOWICZ,
Ewa KISIELEWSKA, Eugenia PODGÓRSKA

**Wpływ dodatków kwasu pimelinowego na przyrost plonu drożdży
piekarskich**

Влияние прибавок пимелиновой кислоты на урожай пекарских
дрожжей

The Effect of Additions of Pimelic Acid on the Yields of Baker's Yeast

Drożdże piekarskie produkuje się najczęściej w podłożu składającym się z roztworu melasy buraczanej oraz azotowych i fosforowych soli mineralnych. Wydajność biomasy drożdży w takim podłożu, w przeliczeniu na 100 kg sacharozy zawartej w melasie użytej do produkcji, zależy od wielu czynników, wśród których najważniejsze są: uwarunkowania genetyczne użytej rasy drożdży, technologia stosowana w produkcji oraz skład chemiczny melasy.

Wśród składników melasy, wywierających wpływ na plon biomasy drożdży, należy wymienić: zawartość cukru inwertowego, kwasów lotnych, organicznych, przyswajalnych przez drożdże połączeń azotowych, azotynów, mikroelementów oraz substancji wzrostowych.

Zawartość w melasie ponad normę cukru inwertowego, kwasów lotnych i azotynów niekorzystnie oddziałuje na wydajność plonu drożdży, podobnie jak niedobór przyswajalnych połączeń azotowych i substancji wzrostowych (9).

Szczególnie pozytywny wpływ na wydajność plonu drożdży wywierają biotyna i wolne aminokwasy (8, 12). Według Zapory i Nikityny (14) zapotrzebowanie drożdży na biotynę zależy od intensywności napowietrzania podłoża hodowlanego. Przy niedostatecznym napowietrzaniu zapotrzebowanie na tę substancję wzrostową wynosi 200 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ suchej masy drożdży, a w dobrych warunkach napowietrzania tylko 50 μg . Za-

stąpienie części N mineralnego w podłożu dodatkiem kwasu glutaminowego podwyższało plon drożdży; nieco mniej korzystnie oddziaływał dodatek asparaginy (14). Odwrotne zależności obserwowano w przypadku użycia melasy ubogiej w biotynę. Dodatek asparaginy korzystniej wpływał na przyrost plonu biomasy niż kwasu glutaminowego. Makarowa (8) tłumaczy ten fakt możliwością zastępowania biotyny asparaginą u drożdży w syntezie kwasu γ -aminomasłowego.

Według White'a wysoką wydajność biomasy drożdży piekarskich można uzyskać z melasy zawierającej ok. 0,3 g biotyny na tonę tego surowca. Zawartość biotyny w melasach buraczanych mieści się w granicach od 1 do 6,4 $\mu\text{g}/100$ g melasy (3). Rola tej substancji wzrostowej w komórkach drożdży polega na udziale w reakcjach biosyntezy w związku z jej koenzymatycznymi funkcjami (1).

Kwas pimelinowy bierze udział w mikrobiologicznej syntezie biotyny (2). Wobec częstego występowania wadliwych melas — dochodzącego w niektórych latach nawet do 77% (10) — między innymi z powodu niskiej zawartości przyswajalnych połączeń azotowych i biotyny, zachodzi potrzeba poszukiwania prekursorów biotyny w postaci jej niektórych witamerów. Badania przedstawione w tej pracy zmierzały do ustalenia, w jakim stopniu można poprawić wydajność biomasy drożdży piekarskich przez dodawanie do podłoża hodowlanego kwasu pimelinowego.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach materiałem zarodowym były drożdże piekarskie II generacji, wyprodukowane w fabryce drożdży piekarskich. Przed użyciem do badań pasażowano je w podłożu syntetycznym, zawierającym sacharozę i sole mineralne, aby zmniejszyć w komórkach zawartość biotyny. Hodowle doświadczalne prowadzono w podłożu zawierającym melasę, jako źródło C, oraz sole azotowe i fosforowe w postaci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH i $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ w ilościach 0,041 g N i 0,046 g P_2O_5 na 1 g sacharozy. Inne kombinacje zamiast melasy zawierały sacharozę. Kwasowość podłoża utrzymywano na poziomie pH 4,5—5,0, temperatura hodowli wynosiła 28° , a czas jej trwania 8 godz. Posiew drożdży zarodowych był rzędu 15% suchej masy w stosunku do sacharozy zawartej w melasie przewidzianej do wprowadzenia do środowiska. Podłoże melasowe i syntetyczne dodawano do hodowli systemem dolewowym wg następującego rozkładu:

godz. fermentacji	dawka roztworu melasy (%)
0	10
1	10
2	12,5
3	17,5
4	20,0
5	17,5
6	12,5
7	0,0
8	0,0

Doświadczenia prowadzono w propagatorze o pojemności 10 l przy końcowym napełnieniu 6 l, napowietrzając za pomocą turbinowego mieszadła (1200—1400 obr./min.), które zasysało powietrze i emulgowało je w podłożu.

Po zakończeniu hodowli pobierano próbki o objętości 500 ml, odwirowywano drożdże, przemywano i ponownie wirowano. Po zważeniu świeżej biomasy drożdży z odwirowanej próbki oznaczono w niej zawartość suchej masy i biotyny. Na podstawie wyników oznaczenia plonu suchej masy w pobranej próbce hodowli obliczano plon całej hodowli i wydajność w stosunku do sacharozy poddanej fermentacji.

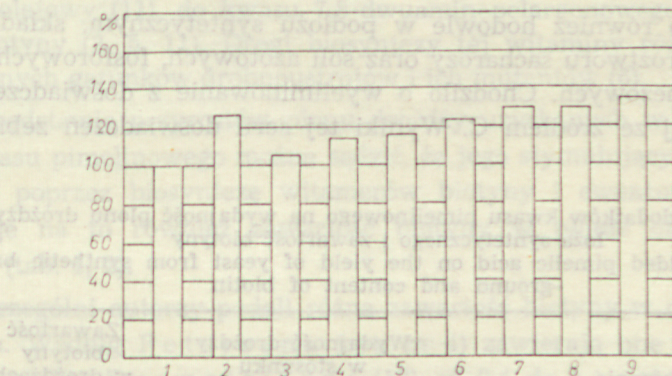
Zawartość biotyny w drożdżach i w melasie oznaczano przy użyciu *Neurospora crassa* (7). Zawartość sacharozy w melasie oznaczano metodą Bertranda (po hydrolizie), przeliczając oznaczoną zawartość substancji redukujących na sacharozę.

Jako kontrole służyły hodowle prowadzone bez dodatku kwasu pimelinowego.

PRZEBIEG I WYNIKI BADAŃ

Ogółem przeprowadzono 35 hodowli, w tym 10 kontrolnych dla określenia zdolności produkcyjnej urządzenia użytego w badaniach. Średnią wydajność suchej masy z hodowli kontrolnych przyjęto za 100; z nią porównywano wyniki fermentacji doświadczalnych.

Wyniki badań z pierwszej serii doświadczeń, prowadzonych z użyciem melasowego podłoża, przedstawiono na ryc. 1. Średnia wydajność z hodowli kontrolnych wynosiła 38,2%. Z uzyskanych danych wynika, że dodatek 20 mg kwasu pimelinowego na litr podłoża przyczyniał się do otrzymania wydajności podobnej do tej, jaką uzyskiwano w kombinacji z dodatkiem 10 µg biotyny. Trzeba zaznaczyć, że użyta w badaniach melasa



Ryc. 1. Wpływ dodatków kwasu pimelinowego do podłoża na wysokość plonu drożdży piekarskich, w stosunku do kontroli; 1 — kontrola, 2 — 10 µg biotyny/l, 3 — 1 mg kw. pml/l, 4 — 5 mg kw. pml/l, 5 — 10 mg kw. pml/l, 6 — 15 mg kw. pml/l, 7 — 20 mg kw. pml/l, 8 — 30 mg kw. pml/l, 9 — 45 mg kw. pml/l.

The effect of adding pimelic acid to the breeding-ground on the yield of baker's yeast, in relation to the control; 1 — control, 2 — 10 µg of biotin/l, 3 — 1 mg of pml acid/l, 4 — 5 mg of pml acid/l, 5 — 10 mg of pml acid/l, 6 — 15 mg of pml acid/l, 7 — 20 mg of pml acid/l, 8 — 30 mg of pml acid/l, 9 — 45 mg of pml acid/l.

nie należała do wadliwych, zawierała bowiem 6,4 μg biotyny na 100 g. Przedstawione dane wskazują, że dodatek kwasu pimelinowego przyczyniał się do wzrostu wydajności plonu suchej masy drożdży. Dopiero dawka kwasu pimelinowego przekraczająca 20 mg/l nie powodowała wzrostu wydajności drożdży. Dawka w wysokości 45 mg tego kwasu wpłynęła na dalszą zwyżkę plonu drożdży.

Dane, dotyczące zawartości biotyny w drożdżach wyrosłych w kombinacjach doświadczalnych, zestawiono w tab. 1. Wynika z nich, że ze wzrostem wielkości dawki kwasu pimelinowego dodanego do podłoża wzrastała w drożdżach zawartość biotyny od 14% do 27%. Drożdże zarodowe, pochodzące z drożdżowni, zawierały 1,71 μg biotyny w g suchej masy.

Tab. 1. Zawartość biotyny w drożdżach w zależności od wielkości dodatku kwasu pimelinowego do podłoża melasowego
Content of biotin in the yeast depending on the quantity of added pimelic acid to the molasses breeding-ground

Kombinacje doświadczalne	Biotyny w drożdżach $\mu\text{g/g}$ s.m.	Biotyny w drożdżach w stosunku do kontroli %
Kontrola	1,95	100
1 mg kw. pimel./l	2,17	111
5 mg kw. pimel./l	2,23	114
10 mg kw. pimel./l	2,31	118
15 mg kw. pimel./l	2,31	118
30 mg kw. pimel./l	2,48	127
Drożdże zarodowe	1,71	89

Prowadzono również hodowle w podłożu syntetycznym, składającym się z wodnego roztworu sacharozy oraz soli azotowych, fosforowych, potasowych i magnezowych. Chodziło o wyeliminowanie z doświadczeń biotyny wnoszonej ze źródłem C. Wyniki tej serii doświadczeń zebrano w tab. 2.

Tab. 2. Wpływ dodatków kwasu pimelinowego na wydajność plonu drożdży z podłoża syntetycznego i zawartość biotyny
The effect of added pimelic acid on the yield of yeast from synthetic breeding-ground and content of biotin

Kombinacje doświadczalne	Wydajność drożdży w stosunku		Zawartość biotyny w drożdżach w stosunku do kontroli %
	do cukru %	do kontroli %	
Kontrola	30,4	100	100
5 mg kw. pimel./l	31,5	103,7	110
10 mg kw. pimel./l	33,5	110,3	—
20 mg kw. pimel./l	34,7	114,1	148
Drożdże zarodowe	—	—	200

Pomimo braku wielu składników w syntetycznym podłożu, takich jak organiczne połączenia azotowe, których niedobór mógł ograniczać wzrost drożdży, dodatek kwasu pimelinowego przyczyniał się do wzrostu wydajności plonu drożdży i zawartości w plonie biotyny. Jednakże nie osiągnięto w drożdżach zawartości tej substancji wzrostowej w takiej ilości, jaką zawierały drożdże zarodowe.

DYSKUSJA

Poznanie stymulującego oddziaływania biotyny na wzrost licznych gatunków drobnoustrojów skłoniło badaczy do poszukiwania źródeł zasobnych w tę substancję wzrostową oraz pozwoliło wytłumaczyć przyczyny niepowodzeń produkcyjnych w zakresie uzyskiwania wyznaczonych wskaźników technologicznych produkcji. Melasa buraczana, podstawowy surowiec w produkcji drożdży piekarskich, nie zawsze jest dobrym składnikiem podłoża hodowlanego, co dobrze ilustrują wyniki badań tego surowca (3). Zapotrzebowanie drożdży na tę substancję wzrostową zależy od warunków technologicznych produkcji (14). Szczegółowe badania wskazują, że biosynteza witamerów biotyny wiedzie również poprzez syntezę kwasu pimelinowego z różnych związków, takich jak kwas malonowy (2) czy olejowy (11), do kwasu 7,8-dwuaminopelargonowego, dethiobiotyny i biotyny (2, 5, 11). Drogi biosyntezy tej witaminy różnią się u poszczególnych gatunków drobnoustrojów i ich mutantów (6).

Na podstawie przyrostów plonu drożdży uzyskanych w obecności dawek kwasu pimelinowego można sądzić, że jego stymulujący wpływ ujawniał się poprzez biosyntezę witamerów biotyny i ewentualnie biotyny. Wskazuje na to również zawartość biotyny w plonie otrzymywanych drożdży (tab. 1, 2).

Poszczególni autorzy podali różną zawartość biotyny w drożdżach piekarskich. Według Petersona (cyt. za 4) zawierają one od 0,8 do 2,4 $\mu\text{g/g}$, a według Suomalainena (13) od 0,4 do 1,1 $\mu\text{g/g}$ suchej masy. W naszych badaniach drożdże zarodowe zawierały 1,71 $\mu\text{g/g}$ suchej masy tej witaminy, a pochodzące z hodowli na podłożu wzbogacanym dodatkami kwasu pimelinowego — od 2,17 do 2,48 $\mu\text{g/g}$ suchej masy. Drożdże hodowlane w podłożu syntetycznym, całkowicie pozbawionym biotyny, wzbogacanym dodatkami kwasu pimelinowego, zawierały od 0,186 do 0,276 μg tej substancji wzrostowej w g suchej masy, zależnie od wielkości dawki kwasu pimelinowego.

PIŚMIENICTWO

1. Bartosiński B., Zagalak B.: Koenzymatyczne funkcje biotyny. Post. Bioch. 13 (4), 1967.
2. Eisenberg M. A.: Biogenesis, Transport and Their Regulation. Adv. in Enzymology. 38, 1973.
3. Gluźńska W., Ostaszewicz D., Rzędowski W.: Badania nad zawartością biostymulatorów w melasach polskich. Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Spoż. XVII, 3, 1967.
4. Ingram M.: An Introduction to the Biology of Yeast. S. I. Pitman, London 1955.
5. Iwahara S., Ota Y.: Characteristics of Biotin-vitimers from Piemic Acid by a Biotin-producing Bacterium. Agr. Biol. Chem. 41, 1977.
6. Iwahara S., Shin M., Nakayama H., Togachi E.: Biotin-vitimers Produced by a Biotin-requiring Mutant. Arch. Biol. Chem. 41, 1977.
7. Kavanagh F.: Analytical Microbiology. Academ. Press, New York — London, 422, 1963.
8. Makarowa E. N.: O raznostoronnosti dejstwiia vitaminow na drożdżewye kletki w aerobnych usłowijach kultiwirowanija. Mikrobiologija 44, 6, 1975.
9. Malanowska J., Gluźńska W., Labendziński S.: Wpływ niektórych składników melasy na wydajność drożdży piekarskich. Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Spoż. XIX, 2, 1969.
10. Malanowska J., Rzędowski W., Duszyk H.: Charakterystyka melas polskich z kampanii 1964/65 i 1965/66. Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Spoż. XVIII, 1, 1968.
11. Ohsugi M., Ishikawa Y.: Biosynthesis of Biotin-vitimers from Oleic Acid by *Cryptococcus neoformans*. Agr. Biol. Chem. 39, 1975.
12. Smoszewskij N. D.: Stimulacija rosta razlicnych drożdż β -alaninom i pantotienowej kislotoj w prisutstwie asparagina. Prikladn. Bioch. Mikrob. 3, 1967.
13. Suomalainen H., Keräne A. I. A., Kangasperko J.: Yeast Growth Method for Assay of Biotin Activity. J. Instytut. Brew. 71, 1965.
14. Zapor E. M., Nikitina L. G.: Wlijanije aminokislot na nakoplenije biomasy piekarskich drożdż pri nedostatke biotina. Prikladn. Bioch. Mikrob. 3, 1967.

РЕЗЮМЕ

Исследовано влияние прибавок пимелиновой кислоты к культурной среде на урожайность сухой массы пекарских дрожжей, по отношению к сахарозе, подданной брожению. Культивирование вели в установке объема 10 л. (наполняя 6 л.) аэрацию проводили при помощи турбинной мешалки, насыщающей воздух. Раствор свекловичной мелассы, обогащенной прибавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ постепенно вводился в процесс культивирования на протяжении 7 часов во время 8 часового брожения. После окончания культивирования дрожжи центрифугировали, отделяя от основания, промывали и снова центрифугировали. В биомассе дрожжей определено содержание сухой массы и биотина. Прибавка пимелиновой кислоты равнялась от 1 до 45 мг/л основания. Контрольное культивирование не содержало пимелиновой кислоты. Получено прибавку урожая сухой массы дрожжей в пределах от 6 до 44% по отношению к контрольной

в зависимости от величины доз пимелиновой кислоты. Культивирование, которое велось на синтетическом основании (сахароза и минеральные соли), прибавление пимелиновой кислоты от 50 мг до 20 мг/л основания вызывало повышение урожая от 3 до 14% по отношению к контролю. В зависимости от величины прибавки пимелиновой кислоты повышалось содержание биотина в дрожжах, выросших на мелассовом основании (от 11% до 27% по отношению к контролю) и от 10% до 48% в дрожжах, выросших на синтетическом основании. Однако биомасса дрожжей, выросших на синтетическом основании содержала в себе меньше биотина, чем биомасса получена из мелассового основания или из посевных дрожжей.

SUMMARY

The subject of investigations was the effect of adding pimelic acid to the culture breeding-ground on the yield of baker's yeast dry mass in relation to the saccharose subject to fermentation. The culture was cultivated on 10 l capacity apparatus (6 l of final filling) and subject to aeration by means of turbine mixer sucking in the air. The solution of beet molasses was enriched with additions $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and was gradually introduced into the culture for 7 hours during 8-hour fermentation. When the culture was liquidated, the yeasts were centrifuged from the breeding-ground, then washed and again centrifuged. The content of dry mass and biotin in the yeast biomass has been determined. The additions of pimelic acid were from 1 to 45 mg/l of breeding-ground. The control cultures did not contain pimelic acid, 6—34% rise in the yield of dry mass of yeast in relation to the control depending on the quantity of pimelic acid doses was obtained. In the cultures cultivated on the synthetic breeding-ground (saccharose and mineral salts), with 5—20 mg addition of pimelic acid per 1 l of breeding-ground, the rise of yield was from 3 to 14% in relation to the control.

Depending on the quantity of the added acid the content of biotin in the yeast grown on molasses breeding-ground increased by 11—27% in relation to the control and by 10—48% in the yeast grown on synthetic breeding-ground. However, in the latter case the biomass of yeast contained less biotin than the one obtained on molasses breeding-ground and from breeding yeast.