

Edyta Lipińska, Elżbieta Hać-Szymańczuk, Joanna Roman

WPŁYW SUPLEMENTACJI PODŁOŻA HODOWLANEGO BIOTYNĄ NA JEJ ZAWARTOŚĆ W BIOMASIE KOMÓRKOWEJ DROŹDŻY

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Wydziału Nauk o Żywności,
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: dr hab. *M. Gniewosz*, prof. SGGW

*W pracy badano asymilację biotyny przez drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae*. Do hodowli biomasy komórkowej drożdży piekarskich wykorzystano melasę buraczaną rozcieńczoną do 10°Błg z dodatkiem $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ oraz $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Podłoża hodowlane zróżnicowano zawartością biotyny, która wynosiła: 2,54 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$; 3,54 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$; 7,54 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ i 12,54 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$.*

Stwierdzono, że niezależnie od zastosowanej dawki biotyny do podłoża hodowlanego końcowa jej zawartość w biomacie drożdżowej osiąga ten sam poziom (0,34 - 0,36 $\mu\text{g}/\text{g s.s.}$). Wykazano także, iż suplementacja hodowli drożdży piekarskich biotyną wpływa na zwiększenie plonu biomasy.

Słowa kluczowe: drożdże piekarskie, biotyna, melasa
Key words: baker's yeast, biotin, molasses

Biotyna jest niezbędnym składnikiem enzymów – karboksylaz biotynozależnych, odgrywających istotną rolę w wielu ważnych reakcjach biochemicznych. Enzymy te uczestniczą m.in. w glukoneogenezie, lipogenezie, biosyntezie wyższych kwasów tłuszczowych. Oprócz udziału w reakcjach karboksylacji, biotynozależne enzymy uczestniczą również w transkarboksylacji i dekarboksylacji (1, 2).

Niedobór biotyny jest odczuwany poprzez pogorszenie samopoczucia, a także nadwrażliwość bólową oraz czuciową. Ponadto może powodować depresję, osłabienie i apatię, pogorszenie metabolizmu tłuszczów oraz podwyższenie poziomu cholesterolu. Niekiedy brak biotyny wywołuje objawy skórne, zwłaszcza stany zapalne języka, skóry kończyn i szyi oraz wypadanie włosów, czyli łysienie. Wypadanie włosów jest jednym z podstawowych objawów wysokiego niedoboru biotyny w organizmie i dlatego biotyna stosowana jest jako suplement diety u pacjentów z tym schorzeniem (1). Nie ma ściśle zdefiniowanych zaleceń odnośnie suplementacji biotyny, choć wielu specjalistów twierdzi, że dawka 75-300 mikrogram na dobę wystarcza, aby zapobiec powstaniu niedoborów.

Biotyna występuje w wątrobie, orzechach włoskich i ziemnych, mące sojowej, żółtku jaj, krabach, migdałach, sardynkach, grzybach, brązowym (naturalnym) ryżu, mące pełnoziarnistej, szpinaku, marchwi, pomidorach a także drożdżach.

Przemysłowa produkcja drożdży piekarskich jest procesem złożonym. Polega na prowadzeniu kilkusetapowej hodowli tlenowej, ze zwiększaniem objętości podłoża

namnażającego w kolejnych etapach produkcji (3). Podstawowym surowcem stosowanym w procesie produkcji drożdży piekarskich jest melasa buraczana lub trzcinowa wzbogacona w przyswajalne przez drożdże źródła azotu i fosforu oraz biostymulatory (4). Biostymulatory stosowane w hodowli drożdży to witaminy z grupy B – szczególnie biotyna, kwas pantotenowy, pirydoksyna, niacyna, inozytol oraz niektóre aminokwasy (arginina, leucyna i lizyna) (5). Zawartość biotyny w melasach buraczanych, pochodzących z krajowych cukrowni wynosi od 0,01 mg do 0,13 mg/kg melasy (4). Przy tak zróżnicowanej zawartości tej witaminy w melasie, koniecznym staje się badanie jej zawartości i ewentualne uzupełnianie niedoboru.

Wzbogacenie podłoża hodowlanego drożdży piekarskich w biotynę wpływa na zwiększenie wydajności biomasy drożdży, ale równocześnie podwyższa koszt produkcji ze względu na wysoką cenę tej witaminy (6). Jednak, aby wygrać w rywalizacji o klienta, producenci drożdży nie mogą koncentrować się jedynie na uzyskaniu dobrych wskaźników ekonomicznych, lecz muszą przykładać dużą wagę do cech jakościowych oferowanego produktu (który m.in. może być bogatym źródłem witamin z grupy B i witaminy D), ponieważ to właśnie decyduje o jego handlowej atrakcyjności. W związku z powyższym, z punktu widzenia opłacalności procesu hodowli drożdży piekarskich, należy zoptymalizować ilość dodawanej biotyny. Dlatego celowe wydaje się sprawdzenie stopnia asymilacji biotyny przez wybrany szczep drożdży piekarskich przy jednoczesnym określeniu plonu biomasy oraz ilości biotyny w podłożu po hodowli (ilość biotyny niewykorzystanej).

MATERIAŁ I METODY

Do badań wykorzystano przemysłowy szczep drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* nr 102 pochodzący z Muzeum Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW w Warszawie.

Hodowlę szczepu drożdży piekarskich prowadzono w podłożu melasowym o zawartości ekstraktu 10°Blg , pH 5,0, wzbogaconym w $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,13 g/ 100 cm^3) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,27 g/ 100 cm^3). W doświadczeniu przyjęto następujący dodatek biotyny: 0 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (próba kontrolna), 1 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, 5 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ i 10 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, co po uwzględnieniu zawartości tej witaminy w melasie dało: 2,54 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$; 3,54 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, 7,54 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, 12,54 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Hodowlę drożdży prowadzono przez 72 godziny, w temperaturze 28°C, na wytrząsarce laboratoryjnej (Edmund Bühler typ SM-30 control) przy intensywnym napowietrzaniu (200 obr./min).

Zawartość biotyny w podłożu hodowlanym przed i po hodowli oraz w biomacie komórkowej drożdży oznaczano metodą turbidymetryczną, która polegała na spektrofotometrycznym pomiarze zmętnienia roztworu ($\lambda=570$ nm), powstałego na skutek wzrostu szczepu biotynozależnego *Lactobacillus arabinosus* ATCC 8014 (7).

Plon biomasy drożdży piekarskich oznaczano po odwirowaniu jej przy 3000 rpm przez 10 minut. Otrzymaną mokrą biomasę ważono, a następnie oznaczano w niej zawartość biotyny i suchej substancji. Oznaczenia zawartości suchej

substancji wykonywano metodą wagową za pomocą wagosuszarki (RADWAG typ WPS 30s) (8).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu Statgraphics Plus 5.1. Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji Testem Tukey'a, w założeniach przyjęto poziom istotności $\alpha=0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W badaniach stopnia asymilacji biotyny przez badany szczep drożdży piekarskich ustalono, że zawartość biotyny w biomacie drożdżowej kształtowała się w przedziale 0,34 – 0,36 $\mu\text{g/g}$ s.s. (tab. I). Z przeprowadzonej jednoczynnikowej analizy wariancji wynika, iż drobne różnice mieściły się w granicach błędu. Na tej podstawie można sądzić, że niezależnie od zastosowanej do podłoża hodowlanego dawki biotyny, stopień asymilacji tej witaminy przez szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* nr 102 utrzymany jest na wyrównanym poziomie – średnio ok. 0,35 $\mu\text{g/g}$ s.s.

Otrzymane wyniki są zgodne z danymi z piśmiennictwa, jednak nie odpowiadają maksymalnej zawartości tzn. 0,6 $\mu\text{g/g}$ s.s. (9) lub 2,4 $\mu\text{g/g}$ s.s. (6). Fakt ten może świadczyć o niskim stopniu asymilacji biotyny przez zastosowany do badań szczep drożdży piekarskich. Przypuszczać należy, że uzyskany wynik jest charakterystyczny dla określonego szczepu drożdży piekarskich stosowanego do otrzymania biomasy komórkowej. Według *Oura*'y i *Suommalainen*'a (10) asymilacja biotyny przez komórki drożdży jest możliwa tylko przy nadmiarze tej witaminy w środowisku hodowlanym. Wobec tego powstaje pytanie czy założony w doświadczeniu dodatek biotyny nie powinien być jeszcze zwiększony.

Analizując uzyskane wyniki plonu biomasy (tab. I) stwierdzono, że suplementacja podłoża hodowlanego drożdży *Saccharomyces cerevisiae* nr 102 biotyną wpływa na jego zwiększenie.

Tab e l a 1. Wpływ dodatku biotyny na jej zawartość w biomacie komórkowej drożdży oraz plon biomasy

Table 1. The influence of added biotin on the biotin content in yeast biomass and biomass yield

Ilość dodanej biotyny [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]	Zawartość biotyny w podłożu przed hodowlą [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]	Zawartość biotyny w podłożu po hodowli [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]	Zawartość biotyny w biomacie drożdżowej [$\mu\text{g}/\text{g}$ s.s.]	Plon biomasy [g s.s./ dm^3]
0	2,54	1,42 a*	0,36 a	2,83 a
1	3,54	1,73 a	0,36 a	4,87 b
5	7,54	3,90 b	0,34 a	7,91 c
10	12,54	7,57 c	0,35 a	13,40 d

*Jednakowymi literami w kolumnach oznaczono przynależność wyników do tych samych grup jednorodnych

Przy najniższej zawartości biotyny (próbna kontrolna) otrzymano najmniejszy plon, natomiast dla większych dawek uzyskano kolejno 4,87; 7,91 i 13,40 g s.s./dm³ podłoża. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono istotny wpływ dawki biotyny na zwiększenie plonu biomasy drożdżowej. Wyniki te potwierdzają opinię wielu badaczy (6, 10, 11). Według *Oura'y* i *Suomalainen'a* (10) rolą biotyny w organizmach jest funkcja grupy prostetycznej w różnych karboksylazach. Enzymami biotynowymi wpływającymi na wzrost drożdży piekarskich są karboksylaza pirogronianowa oraz karboksylaza acetylo-CoA. Katalizują one reakcje karboksylacji pirogronianu do szczawiooctanu i acylo-CoA do malonyla-CoA. Aktywność tych enzymów jest znacznie zredukowana, gdy drożdże piekarskie namnaża się w podłożu z niedostatecznym dodatkiem biotyny lub jej brakiem. Zmniejszona aktywność karboksylazy acetylo-CoA prowadzi do redukcji ilości kwasów tłuszczowych, natomiast osłabione działanie karboksylazy pirogronianowej wpływa na ograniczenie syntezy kwasu asparaginowego i glutaminowego, gdyż oba z nich są otrzymywane ze szczawiooctanu. Zmniejszenie ilości tych kwasów prowadzi do zmniejszenia aminokwasów otrzymanych z aspartanu i glutaminianu (izoleucyna, metionina, treonina, arginina, lizyna, prolina) i w ostateczności do redukcji poziomu białek i kwasów nukleinowych, które są budowane z tych aminokwasów (12, 13). W konsekwencji obserwuje się zmniejszenie plonu biomasy.

Zawartość biotyny w podłożu po hodowli kształtowała się zależnie od zastosowanej dawki. Najmniej (2,54 oraz 3,54 µg/dm³) było jej w próbkach z najniższą początkową zawartością biotyny. W pozostałych supernatantach stwierdzono istotne różnice w ilości pozostałej w podłożu biotyny. Przy dawce 7,54 µg/dm³ pozostało 3,90 µg/dm³, a przy dawce 12,54 µg/dm³ pozostało 7,57 µg/dm³. Jak wynika z doświadczenia zawsze pozostaje pewna ilość biotyny nie zasymilowana przez drożdże. W technologii drożdżownictwa podłoże po hodowli trafia do ścieków, a razem z nią niewykorzystana biotyna. Wobec tego wskazane jest prowadzenie dalszych badań w kierunku ustalenia optymalnej zawartości tej witaminy w podłożu tak, aby utrzymać na zadowalającym poziomie wydajność procesu namnażania oraz jakość biomasy a jednocześnie nie doprowadzić do dużych jej strat po hodowli drożdży.

WNIOSKI

Niezależnie od zastosowanej dawki biotyny do podłoża hodowlanego końcowa jej zawartość w biomacie drożdżowej osiąga ten sam poziom – średnio ok. 0,35 µg/g s.s.

Dodatek biotyny do podłoża hodowlanego drożdży piekarskich wpływa na zwiększenie plonu biomasy.

E. Lipińska, E. Hać-Szymańczuk, J. Roman

THE INFLUENCE OF BIOTIN ADDITIONS TO THE CULTURE MEDIUM ON THE BIOTIN CONTENT IN CELL BIOMASS OF YEAST

Summary

The assimilation of biotin by baker's yeast was investigated. The culture medium was a molasses brewery enriched with $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and the addition of biotin $2.54 \mu\text{g}/\text{dm}^3$; $3.54 \mu\text{g}/\text{dm}^3$; $7.54 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ and $12.54 \mu\text{g}/\text{dm}^3$.

The final biotin content in yeast biomass was independent of biotin addition and reached the same level ($0.34 - 0.36 \mu\text{g}/\text{g d.m.}$).

The enrichment of culture medium with biotin influenced on growing up of yeast biomass yield.

PIŚMIENNICTWO

1. *Moszczyński P., Pyć R.*: Biochemia witamin; Część I. Witaminy grupy B i koenzymy. PWN, 1998; 164-179. -2. *Streit W. R., Entcheva P.*: Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003; 61: 21-31. -3. *Libudziś Z., Kowal K.*: Mikrobiologia techniczna, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej Tom II, 2000; 45-60. -4. *Lipińska E., Raczyńska-Cabaj A., Sobczak E.*: Melasa jako podstawowy surowiec dla przemysłu drożdżowego. Przem. Ferm. Owoc. Warz., 2001; (5): 18-21. -5. *Piasecka-Jóźwiak K. A., Popławska S., Stecka K.*: Trendy we współczesnej nauce i praktyce przemysłowej drożdźownictwa. Przem. Ferm. Owoc.-Warz. 1999; 9: 28. -6. *Oura E., Suomalainen H.*: Biotin - active compounds, their existence in nature and the biotin requirements of yeasts. J. Inst. Brew., 1982; 88: 299-308. -7. *Myszkowska K., Tautt J., Tuszyńska S., Woźniak W.*: Mikrobiologiczne metody badania witamin z grupy B. WPLiS, Warszawa, 1963; 47-50. -8. PN- A-79005-4: Drożdże. Metody badań. Oznaczenie suchej masy. -9. *Olbrich H.*: Molasses as main raw material of baker's yeast production. Licht's Internationaler - Melassebericht, 1972; 9 (11): 1-7. -10. *Oura E., Suomalainen H.*: Biotin and the metabolism of baker's yeast. J. Inst. Brew., 1978; 84: 283-287. -11. *Szopa J.S.*: Biotin vitamers content of lactose and beet molasses. Acta Biotechnol., 2, 1982; 4: 369-375. -12. *Pérez-Vázquez V., Uribe S., Velázquez-Arellano A.*: Effects of biotin on growth and protein biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Nutr. Biochem., 2005; 16 (7): 438-440. -13. *Schlegel H.G.*: Mikrobiologia ogólna. PWN, 1996; 216, 338.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159c.