

Krystyna Trojanowska¹
Maria Markiewicz²
Anna Kolanowska²
Katarzyna Czaczyk¹
Anna Mueller¹
Krzysztof Gulewicz²

¹ Zakład Biotechnologii Akademii Rolniczej,
Poznań

² Instytut Chemii Bioorganicznej PAN,
Poznań

Ekstrakt łubinowy jako surowiec w biosyntezie białka paszowego na drodze mikrobiologicznej

1. Wprowadzenie

W przemysłowej biosyntezie białka najczęściej wykorzystuje się drożdże, które stanowią bogate źródło łatwo przyswajalnego białka, a także witamin grupy B oraz soli mineralnych. Substratem do syntezy białka przez mikroorganizmy obok węglowodanów mogą być różne substancje organiczne takie jak alkohole, kwasy organiczne, węglowodory, metan itp. Głównym surowcem w produkcji drożdży paszowych są melasa buraczana, wywar, ługi posiarzynowe, hydrolizaty drewna, serwatka i inne produkty przemysłu rolnego (1,2,3,4). Surowce te zawierają węglowodany (głównie pentozy i heksozy) i są doskonałą pożywką dla uzyskiwania dużych wydajności biomasy w procesie biosyntezy.

Dotychczas nie wykorzystywane jako źródło węglowodanów w produkcji drożdży paszowych były ekstrakty łubinowe, stanowiące produkty odpadowe w procesie utylizacji nasion łubinu gorzkiego (5,6). Oligosacharydy ekstraktu łubinowego, głównie cukry rodziny rafinozy, stanowią dominujący jego składnik (ok. 50% s.m. – suchej masy). W składzie chemicznym oprócz węglowodanów zidentyfikowano również alkaloidy (ok. 10% s.m.), wolne aminokwasy i peptydy (ok. 7% s.m.), kwasy organiczne (ok. 5,5% s.m.), związki mineralne (ok. 11% s.m.) i inne. Zawartość azotu i fosforu w suchej masie ekstraktu wynosi odpowiednio 4,1 i 0,5%, a stosunek C:N – 18:1 (7).

Ekstrakt łubinowy stwarza olbrzymie możliwości wykorzystania go jako substratu w produkcji wielu cennych, naturalnych związków – substancji metodami biotechnologicznymi. Odrębnym problemem pozostaje zagadnienie wykorzystania „nietypowych” dla metabolizmu drożdży cukrów ekstraktu oraz wpływu alkaloidów na ten proces. Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy stanowią próbę odpowiedzi na powyższe pytania.

2. Materiał i metody

Ekstrakt łubinowy zawierający ok. 30% s.m. uzyskiwano z nasion łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*) odm. Mirela metodą opracowaną w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (8).

Wszystkie, 22 szczepy drożdży stosowane w doświadczeniach pochodziły z kolekcji własnej Zakładu Biotechnologii AR w Poznaniu.

Inoculum – przed posiewem drożdże przeszczepiano na skosy brzeczkowe i hodowano przez 48 godzin w temperaturze 30°C. Dla wstępnej selekcji szczepów, prowadzonej w hodowcach próbówkowych, przygotowano inokulat w formie zawiesiny zawierającej 10⁶ komórek/ml.

Liczbę komórek oznaczano w komorze Thoma. W dalszych etapach pracy wyrosłe na skosach drożdże zmywano jałowym ekstraktem lubinowym i po hodowli w temperaturze 30°C przez 24 godziny otrzymywano *inoculum*, które dodawano do kolb doświadczalnych w ilości 10% w stosunku do objętości pożywki.

2. Pożywka doświadczalna i warunki biosyntezy

Hodowlę prowadzono na ekstrakcie lubinowym nierozcieńczonym i rozcieńczonym wodą w stosunku 1:1, którego pH wynosiło 5,8–6,0 i nie było korygowane. Następnie, pożywkę rozlewano do probówek lub kolb i wyjaławiano w aparacie Kocha (2 x 30 min).

Wstępną selekcję drożdży prowadzono w probówkach z rurkami Durhama zawierającymi 10 ml ekstraktu lubinowego. Po zaszczepieniu przygotowaną zawiesiną drożdży hodowlę prowadzono przez 48 godzin w temperaturze 30°C.

Hodowlę na większą skalę prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 750 ml przez 48 godzin w temperaturze 30°C na wytrząsarce. Po zakończeniu hodowli oznaczano pH, objętość oraz biomasę. Suchą masę komórek oznaczano poprzez suszenie przez 2 godziny w temperaturze 60°C, a następnie w 105°C do stałej wagi.

Zawartość węglowodanów w biomasie i płynach określano metodą chromatografii gazowej za pomocą chromatografu Pye–Uvicam 204 z detektorem FID na kolumnie szklanej (2 m x 2 mm) wypełnionej 2,5% OV-17 na chromosorbie 750. Alkaloidy oznaczano metodą wagową (9). Zawartość azotu w biomasie oznaczano metodą Kiejdahla; hydrolizę biomasy prowadzono w 6 N HCl w temperaturze 105°C przez 24 godziny w zatopionych fiolkach w atmosferze azotu. Analizę składu aminokwasowego wykonano na aparacie Beckman Multichrom B. Strawność biomasy oznaczano metodą chemiczną przez trawienie trypsyną (10).

3. Wyniki, dyskusja

Wstępną selekcję objęto 22 szczepy drożdży należące do następujących gatunków: *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida kefir*, *Candida pseudotropicalis*, *Torulopsis utilis*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces lactis*, *Torula casei*, *Saccharomyces sp.* (izolat własny), *Endomycopsis fibuliger*, *Torula utilis*, *Torula cremoris*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantica*, *Rhodotorula mucilaginoso* oraz drożdże gorzelnicze „Ja” 36, które hodowano na ekstraktach lubinowych o s.m. 30 i 15%. Na podstawie prowadzonych obserwacji dotyczących szybkości i intensywności przyrostu biomasy wytypowano do dalszych doświadczeń 13 szczepów. Wyniki uzyskanej suchej masy biomasy przedstawiono w tab. 1. W zależności od szczepu drożdży oraz podłoża stosowanego w hodowli wydajność suchej masy waha się w granicach 4,75 – 21,19 g/dm³ pożywki. Z wyjątkiem szczepu drożdży *Torula utilis*, przyrosty biomasy były znacznie wyższe w przypadku ekstraktów o stężeniu 21,95% s.m.. Wartości końcowe pH w zależności od szczepu drożdży wahały się od 4,2–5,8. Do dalszych testów wytypowano 5 szczepów, których plon komórek ukształtował się powyżej 14 g s.m./dm³ ekstraktu.

W tab. 2 przedstawiono wyniki produkcji biomasy przez wytypowane szczepy. Każde doświadczenie prowadzone było w trzech powtórzeniach, a przedstawione w tabeli wyniki stanowią ich wartość średnią. Stężenia ekstraktu – jak widać – jednoznacznie wpływają na plon komórek. W doświadczeniu II, gdzie sucha masa ekstraktu była najmniejsza (22%), sucha masa biomasy kształtowała się w granicach 10–11 g s.m./dm³. W przypadku hodowli na ekstrakcie lubinowym o stężeniu 30% s.m. (doświadczenie I) otrzymano nawet 29,5 g s.m. biomasy/dm³.

Tabela 1

Selekcja drożdży na ekstrakcie łubinowym

Szczep	Rodz. ekstr.*	Biomasa g/dm ³	Sucha masa		pH końc.
			%	g/dm ³	
<i>Torula casei</i>	I	43,47	28,55	12,37	4,2
	II	36,67	22,71	8,33	4,6
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	I	46,67	26,21	12,23	5,0
	II	50,00	14,22	7,11	4,7
<i>Saccharomyces sp.</i>	I	40,00	31,60	12,64	5,0
	II	53,33	22,82	12,17	5,5
<i>Torulopsis utilis</i>	I	36,67	25,30	10,12	4,6
	II	43,33	24,29	8,91	4,6
<i>Saccharomyces fragilis</i>	I	41,66	28,96	12,07	4,2
	II	40,00	24,16	9,66	4,4
<i>Saccharomyces lactis</i>	I	31,67	26,60	8,42	4,2
	II	26,67	17,80	4,75	4,2
<i>Torula utilis</i>	I	33,33	28,94	9,65	5,0
	II	60,00	23,60	14,16	5,1
<i>Torula cremoris</i>	I	40,00	19,90	7,96	5,2
	II	40,00	20,41	8,16	5,2
<i>Rhodotorula rubra</i>	I	53,30	32,99	17,58	5,4
	II	48,30	25,75	12,43	5,7
<i>Torula utilis</i>	I	71,67	29,57	21,19	5,4
	II	56,67	24,64	13,96	5,3
<i>Torula cremoris</i>	I	56,60	33,12	18,74	5,6
	II	45,00	28,42	12,71	5,8
<i>Torulopsis utilis</i>	I	66,67	30,21	20,14	5,2
	II	48,30	24,47	11,82	5,3
Drożdże „Ja” 36	I	55,00	30,94	17,02	5,7
	II	55,00	31,08	17,09	5,7

*I – ekstrakt zawierający 21,95 % s.m.

II – ekstrakt zawierający 11,95% s.m.

Tabela 2

Produkcja biomasy drożdżowej na ekstrakcie łubinowym* (w g suchej masy z 1 dm³ podłoża)

Nazwa szczepu	Doświadczenie				Średnia
	I	II	III	IV	
<i>Rhodotorula rubra</i>	14,78	11,36	16,00	15,45	14,40
<i>Torula utilis</i>	–	11,03	17,99	14,63	14,55
<i>Torula cremosis</i>	27,96	11,66	24,65	15,66	19,98
<i>Torulopsis utilis</i>	–	10,46	23,67	17,42	17,18
Drożdże „Ja” 36	29,50	11,37	23,20	14,82	19,72

* Suche masy ekstraktu wynosiły:

doświadczenie I – 30,0%

doświadczenie II – 22,0%

doświadczenie III – 27,5%

doświadczenie IV – 25,1%

– nie oznaczono

W biomasach uzyskanych w doświadczeniu II i III oznaczono zawartość białka, której wyniki przedstawiono w tab. 3.

Tabela 3

Zawartość białka w biomasach drożdży oraz ich strawność

Nazwa szczepu	% białka w suchej masie			Strawność w %
	doświadczenie II	doświadczenie III	Średnia	
<i>Rhodotorula rubra</i>	42,50	38,69	40,59	83,0
<i>Torula utilis</i> ,	38,12	37,84	37,98	82,0
<i>Torula cremoris</i> ,	35,62	39,87	37,75	81,9
<i>Torulopsis utilis</i>	37,12	33,87	35,49	n.b.
Drożdże „Ja” 36	38,00	42,37	40,18	81,9

Średnia zawartość białka w suchej masie biomasy waha się od 35,5–40,5%. Największą zawartością białka charakteryzują się biomas z hodowli drożdży gorzelnicznych „Ja-36” oraz *Rhodotorula rubra*, najniższą zawartość białka wykazuje *Torulopsis utilis*.

Zawartość metioniny i lizyny, a także sumy aminokwasów egzogennych i sumy aminokwasów endogennych z hodowli wyselekcjonowanych drożdży na ekstrakcie łubinowym przedstawiono w tab. 4. Nie zaobserwowano istotnych różnic w składzie aminokwasowym poszczególnych biomas. Suma aminokwasów egzogennych waha się w granicach 46,5–50,5%. Zawartość metioniny waha się w granicach 1,01–1,21%, a lizyny 6,52–7,57%.

Tabela 4

Skład aminokwasowy biomas drożdżowych

Nazwa szczepu	Suma aminokwasów		Metionina	Lizyna
	egzogennych	endogennych		
<i>Rhodotorula rubra</i>	49,32	50,68	1,08	7,57
<i>Torula utilis</i>	46,52	53,48	1,07	6,52
<i>Torula cremosis</i>	48,90	51,10	1,15	7,46
<i>Torulopsis utilis</i>	46,82	53,18	1,02	7,50
Drożdże „Ja” 36	48,00	52,00	1,21	7,50

W tab. 5 zestawiono wyniki określające stopień wykorzystania cukrów ekstraktu w procesie biosyntezy białka. Z przedstawionych danych wynika, że średni stopień wykorzystania węglowodanów w zależności od stosowanych szczepów waha się w granicach od 49% (w przypadku

Tabela 5

Wykorzystanie cukrów i alkaloidów ekstraktu łubinowego w produkcji biomasy (w %)

Nazwa szczepu	Ubytek cukrów				Ubytek alkaloidów		
	Doświadczenie			Średnia	Doświadczenie		Średnia
	II	III	IV		II	III	
<i>Rhodotorula rubra</i>	59,0	43,0	65,0	56,0	15,6	9,70	12,7
<i>Torula utilis</i>	59,0	39,0	48,0	49,0	25,0	15,2	20,1
<i>Torula cremosis</i>	59,0	44,0	65,0	56,0	18,7	9,30	14,0
<i>Torulopsis utilis</i>	61,0	69,0	73,0	68,0	18,7	14,9	16,8
Drożdże „Ja” 36	51,0	66,0	53,0	57,0	12,5	11,0	11,7

szczepu *Torula utilis*) do 70% (w przypadku *Torulopsis utilis*). *Torulopsis utilis* charakteryzował się nie tylko wysokim, ale i podobnym we wszystkich doświadczeniach, stopniem wykorzystania cukrów w podłożu. Pozostałe szczepy w zależności od serii doświadczeń wykazywały nawet 20% różnice w ich użyciu.

W tab. 5 przedstawiony został również wpływ drożdży na zawartość alkaloidów w ekstrakcie łubinowym. Rozwój drożdży i produkcja przez nie biomasy – jak widać – prowadzi do obniżenia zawartości alkaloidów od 11 do 20%.

Produkowane w Polsce drożdże paszowe zawierają (11):

białka w suchej masie	–	33,4 – 44,9%
lizyny w 100 g białka	–	5,8 – 8,8%
metioniny w 100 g białka	–	0,9 – 1,9%
współczynnik strawności białka	–	65,8 – 81,4%

Porównywalne wyniki uzyskuje się, jak widać, w procesie biosyntezy białka przez niektóre szczepy drożdży na podłożu ekstraktu łubinowego z nasion *L. angustifolius*, odmiana Mirela uzyskując z 1 dm³ hodowli od 14,4 (dla *Rhodotorula rubra*) do 19,98 g (dla *Torula cremoris*) suchej masy komórek.

Wyniki analiz chemicznych wskazują, że uzyskuje się przy tym preparaty zawierające powyżej 40% białka w suchej masie (np. w przypadku drożdży paszowych *Rhodotorula rubra* i drożdży gorzelniczych „Ja” 36).

Skład aminokwasowy uzyskanego białka jest bardzo korzystny. Na szczególną uwagę zasługuje zawartość lizyny od 6,5% dla *Torula utilis* do ok. 7,5% dla pozostałych szczepów. W uzyskanych preparatach niska była zawartość metioniny. Zawartość tego aminokwasu w białkach pochodzenia mikrobiologicznego jest z reguły niska i waha się (od 0,9 do 1,9%) (10,12). Wykorzystanie cukrów w procesie biosyntezy białka wynosi średnio ok. 60%. Wysokim stopniem wykorzystania cukru charakteryzowały się piony po hodowli *Torulopsis utilis* (68%), najslabiej natomiast wykorzystywał cukry *Torula utilis* (49%). Analiza chemiczna wykazała, że nastąpiło całkowite przereagowanie i hydroliza cukrów rodziny rafinozy. W supernatantach stwierdzono nieznaczny ubytek alkaloidów. Nie stwierdzono natomiast zmian w składzie jakościowym alkaloidów w porównaniu z ekstraktem wyjściowym (dane nie publikowane).

Reasumując, można stwierdzić, że stosowanie ekstraktu łubinowego jako substratu do produkcji biomasy daje wyniki porównywalne z innymi podłożami (13). Szczególnie interesujące – z punktu widzenia wartości biologicznej biomasy – wydają się szczepy drożdży paszowych *Rhodotorula rubra* i *Torula cremoris* oraz drożdże gorzelnicze „Ja” 36. Korzystny dla rozwoju drożdży skład chemiczny ekstraktu oraz łatwość jego uzyskiwania w bardzo dużych ilościach stwarza nowe kierunki aplikacyjne ekstraktu łubinowego w produkcji biomasy mikroorganizmów jako komponentu białkowego w mieszankach pasz treściwych. Warto przy tym zaznaczyć, że w przeciwieństwie do niektórych stosowanych dotychczas podłoży do produkcji biomasy (np. ługi posiarzynowe), ekstrakt łubinowy nie zawiera metali ciężkich i innych substancji toksycznych, co w zasadniczy sposób wpływa na jakość produktu końcowego. Świadczy o tym wysoka strawność uzyskanej biomasy dla badanych szczepów (tab. 3) wahająca się w granicach 81,9 – 83%.

W dalszych badaniach nad pozyskaniem biomasy z ekstraktu łubinowego przewidziane są doświadczenia żywieniowe oraz próby optymalizacji procesu biosyntezy w bioreaktorach.

4. Podsumowanie

Stosując bogaty w cukry z rodziny rafinozy (ok. 50% s.m.) ekstrakt łubinowy jako pożywkę dla 22 szczepów drożdży wykazano duże zróżnicowanie w jego wykorzystaniu w produkcji biomasy. Znaleziono jednocześnie 5 szczepów drożdży: *Rhodotorula rubra*, *Torula utilis*, *Torula*

cremoris, *Torulopsis utilis* i „Ja” 36, dla których ekstrakt jest doskonałą pożywką do produkcji biomasy. Stwierdzono, że biomasa ta odznacza się wysoką zawartością białka, wysokim stopniem strawności białka oraz, z uwagi na bogaty skład aminokwasowy, może znaleźć szerokie zastosowanie jako komponent mieszanek pasz treściwych.

Literatura

1. Klossowski T., (1970), Zarys technologii przemysłu spożywczego, WNT, Warszawa.
2. Achremowicz B., (1979), Rozp. habilit., Wyd. AR, Lublin.
3. Mawson A. J., (1988), Biotech. Letters., 10, 503–508.
4. Michel A., Jacob F., Perrier J., Poneet S., (1987), Biotech. Bioeng., 30, 780–783.
5. Gulewicz K., (1988), Rozp. habilit., Wyd. PAN, Poznań.
6. Gulewicz K., (1989), Biotechnologia–P.I., 3–4, 26–39.
7. Markiewicz M., Kolanowska A., Gulewicz K., (1988), Bull. Acad. Polon., 36, 11–22.
8. Gulewicz K., (1986), Patent P–261005.
9. Wink M., Hartmann T., (1981), Z. Pflanzenphysiol. Biol., 102, 337–344.
10. Gawęcka T., (1988), Ćwiczenia z żywienia zwierząt i paszoznawstwo., Wyd. AR, Poznań.
11. Łabendziński S., (1978), Studium nad uzyskiwaniem wysokobiałkowej biomasy paszowej na drodze drożdżowania melasy i wywaru melasowego, Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż., 29, 7–26.
12. Vananuvat P., Kinsella J. E., (1975), J. Agric. Food. Chem., 102, 595–597.
13. Imbs B., Majchrzak R., Bednarski W., (1976), Rynek białka ze źródeł nietradycyjnych, Wyd. PAN, Warszawa.

Lupin extract as a medium for microbiological production of fodder protein

Summary

Lupin seeds extract with high content of sugars of raphinose family (up to 50% of dry weight) was tested as a medium for a biomass production by 22 yeast strains. Five of them: *Rhodotorula rubra*, *Torula utilis*, *Torula cremoris*, *Torulopsis utilis*, and „Ja” 36, were found to grow very efficiently on this medium to give a biomass with high protein content. A high coefficient of digestibility and wide amino acids composition of these proteins indicate that the resulted biomass can find application as a fodder component.

Adres dla korespondencji:

Krzysztof Gulewicz, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12,
61–704 Poznań.