

SYNTEZA RÓŻNYCH FORM WITAMINY B₆ PRZEZ PLEŚŃ OOSPORA LACTIS

M. DŁUŻEWSKI

Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, SGGW, Warszawa

Kierownik: prof. dr E. Pijanowski

Praca ta jest kontynuacją badań prowadzonych w Zakładzie Technologii Mleczarstwa SGGW nad pleśnią *Oospora lactis* i jej wykorzystaniem do produkcji szybko dojrzewających serów twarogowych o zwiększonej wartości dietetycznej (2, 3, 5, 6, 9, 10).

Pleśń *O. lactis*, jak wynika z dotychczasowych obserwacji (1, 4, 11, 13) syntetyzuje znaczne ilości witamin z grupy B a wśród nich także witaminę B₆.

Witamina B₆ występuje jednak w kilku różnych formach jako pirydoksal, pirydoksyna i pirydoksamina. Poszczególne formy wit. B₆ nie zawsze zachowują się w jednakowy sposób w reakcjach chemicznych, czy próbach biologicznych względnie mikrobiologicznych i stąd ogólne oznaczenie zawartości wit. B₆ np. metodami mikrobiologicznymi przy użyciu *Sacch. carlsbergensis* czy *Neurospora crassa*, obarczone być może znacznymi błędami.

Ponieważ dotychczas nie spotkaliśmy w literaturze doniesień na temat syntezy różnych form witaminy B₆ przez *O. lactis*, dlatego uważaliśmy za celowe podjęcie tego tematu.

Materiały i metody

Do doświadczeń użyto szczepy pleśni *O. lactis* nr 1, 2, 3, 4 i 5 pochodzące z Związkowego Instytutu Mleczarskiego w Liebefeld-Bern (Szwajcaria) oraz nr 6, 12, A, D i I z Zakładu Technologii Mleczarstwa SGGW. Szczepy te przechowywane były na brzeczce z agarem w temp. 4°C i przeszczepiane w odstępach około 1-miesięcznych. Do rozwoju pleśni i badania syntezy przez nią wit. B₆ zastosowano podłoże bezwitaminowe, używane w poprzednich pracach nad syntezą witamin a składające się

z glukozy, asparaginy i soli mineralnych (7). Podłoże to rozlewano do kolbek stożkowych à 100 ml po 20 ml i sterylizowano w 120° C przez 30 min. a następnie po ostudzeniu szczepiono przez dodanie 1 kropli zawiesiny komórek pleśni, otrzymanej w wyniku pobrania 1 kółka tygodniowej kultury *O. lactis* z agaru do 20 ml sterylnego roztworu wodnego 0,9% NaCl. Inkubację pleśni prowadzono w 25° C w ciągu 1 mies.

Ekstrakt do oznaczeń mikrobiologicznych przygotowywano w następujący sposób: Do rozwiniętej w kolbce pleśni (20 ml podłoża) dodawano 70 ml wody destylowanej i 5 ml 1 n HCl a następnie ogrzewano w parze wodnej przez 30 min. Po ostudzeniu zawartość kolbki doprowadzano do pH 4,6, przenoszono do cylindra miarowego à 100 ml, uzupełniano do kreski wodą dest. i sączono.

Przygotowany w ten sposób ekstrakt po odpowiednim rozcieńczeniu badano na zawartość pirydoksalu, pirydoksyny i pirydoksaminy metodą mikrobiologiczną opracowaną przez Rabinowicz i Snella (12) w modyfikacji Gregory (8), przy użyciu szczepów *Sacch. carlsbergensis* 4228, *Str. faecium* 51 i *L. casei* ATTC 7469.

Otrzymane wyniki i dyskusja

Uzyskane z oznaczeń wyniki przedstawiono w tabeli 1. W kolumnach od A do E podano ilości pirydoksalu i pirydoksaminy otrzymane bez-

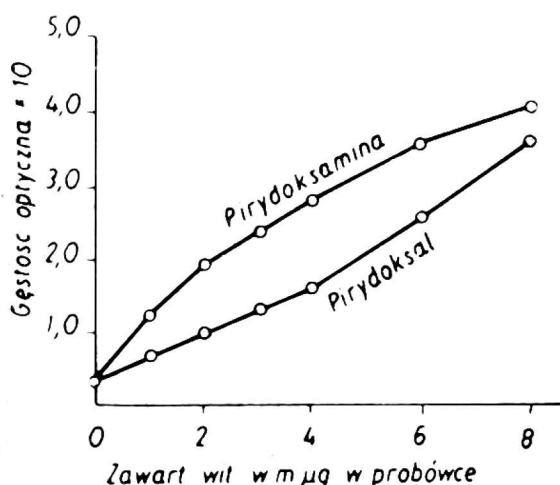
Tabela 1

Synteza różnych form witaminy B₆ przez pleśń *Oospora lactis*
Zawartość witamin wyrażona w milimikrogramach na 1 ml podłoża

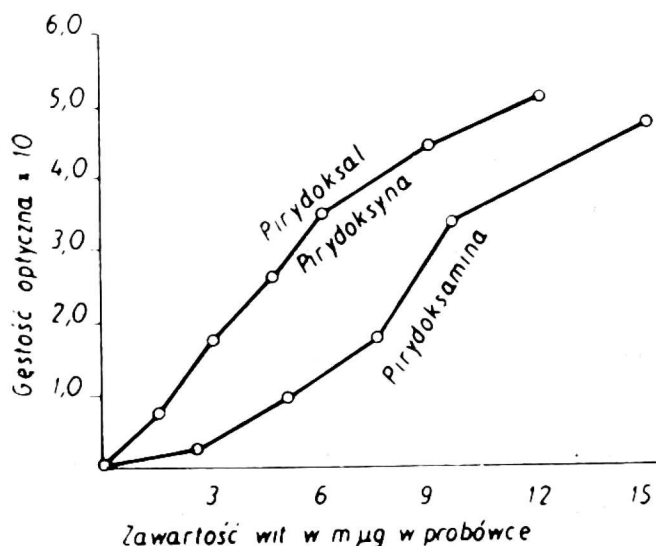
Nr szczepu <i>O. lac- tis</i>	Zawartość witamin otrzymana							
	bezpośrednio z oznaczeń przy użyciu:					po uwzględnieniu poprawek		
	<i>L. casei</i>	<i>Str. faecium</i>		<i>Sacch. carlsberg.</i>				
	i standardu					Piry- doksal (A)	Pirydoks – amina (F)	Piry- doksyna (G)
Piry- doksal (A)	Piry- doksal (B)	Pirydoks – amina (C)	Piry- doksal (D)	Pirydoks – amina (E)				
1	46,5	197	104	165	330	46,5	79	78,8
2	81,0	197	102	368	569	81,0	60	245
3	121,5	159	82	127,5	287	121,5	19	–2,6
4	65,5	126	56	72	205	65,5	27	–2,9
5	36,5	193	91	152	327	36,5	74	81
6	83,0	234	182	345	512	83,0	118	183
12	87,0	221	160	213	315	87,0	97	60
A	101,0	204	117	243	397	101,0	59	106
D	87,5	132	75	95	240	87,5	26	–3,0
I	75,0	152	76	247	335	75,0	39	144

pośrednio przy pomocy 3 różnych mikroorganizmów testowych. Z wartości tych jedynie ilość pirydoksalu oznaczona przy użyciu *L. casei* (kolumna A) odpowiada rzeczywistej zawartości tego związku w badanej próbce, gdyż pozostałe formy wit. B₆ pirydoksyna i pirydoksamina nie mają praktycznie wpływu na wzrost *L. casei*.

Str. faecium reaguje na obecność pirydoksalu i pirydoksaminy a *Sacch. carlsbergensis* na wszystkie trzy formy wit. B₆. W stosunku do *Str. faecium* pirydoksal jest znacznie mniej aktywny od pirydoksaminy (rys. 1), stąd ilość wit. B₆ określona jako pirydoksal (kolumna B) jest daleko wyższa od ilości witaminy oznaczonej jako pirydoksamina (kolumna C). *Sacch. carlsbergensis* prawie w jednakowym stopniu reaguje na obecność pirydoksyny i pirydoksalu, natomiast znacznie słabiej rozwija się na pirydoksaminie (rys. 2) i dlatego zawartość wit. B₆ wy-



Rys. 1. Rozwój *Str. faecium* na podłożu z pirydoksałem i pirydoksaminą



Rys. 2. Rozwój *Sacch. carlsbergensis* na podłożu zawierającym różne formy wit. B₆

rażona jako pirydoksal (kolumna D) jest tu niższa od ilości wit. B₆ podanej jako pirydoksamina (kolumna E).

W celu określenia rzeczywistej ilości poszczególnych form wit. B₆ (kolumna A, F i G) Rabinowitz i Snell oraz Gregory przyjęli dla pirydoksalu wynik otrzymany bezpośrednio przy pomocy *L. casei* (kolumna A) a dla pirydoksyny i pirydoksaminy wartości G i F skorygowane według wzorów:

$$F = C - \frac{C}{B} \cdot A, \quad G = D - \left(A + F \frac{D}{E} \right)$$

gdzie:

A, B i D są to ilości pirydoksalu oznaczone przy pomocy *L. casei*, *Str. faecium* i *Sacch. carlsbergensis*,

C i E — odpowiednie wartości dla pirydoksaminy w próbie z *Str. faecium* i *Sacch. carlsbergensis*.

Zgodnie z opinią samych autorów tej metody wartości otrzymane dla pirydoksyny i pirydoksaminy nawet po dokonaniu tych poprawek obarczone być mogą błędami znacznie większymi od ogólnie przyjętych w oznaczaniu mikrobiologicznym witamin.

Uwzględniając niedokładności stosowanych metod otrzymane wyniki streścić można najogólniej w następujących punktach:

1. Wszystkie badane szczepy *O. lactis* syntetyzowały pirydoksal (w ilości 36,5—121,1 m μ g na 1 ml podłoża) i pirydoksaminę (19—118 m μ g na 1 ml podłoża).

2. Większość badanych szczepów syntetyzowała również pirydoksynę i to w ilościach znacznie przewyższających pozostałe formy wit. B₆ (60—245 m μ g na 1 ml podłoża).

3. U trzech na dziesięć badanych szczepów nie stwierdzono syntezy pirydoksyny.

Obserwacja ostatnia zasługuje na uwagę z tego względu, że zgodnie z dotychczasowymi badaniami (12) w materiale zwierzęcym witamina B₆ występować ma głównie (80%) w postaci pirydoksalu i pirydoksaminy, natomiast w materiale roślinnym oprócz dwóch wymienionych form znajdować się mają również poważne ilości pirydoksyny.

Poszczególne szczepy *O. lactis* zachowują się bardzo niejednolicie pod względem syntezy pirydoksyny. Sprawdzenie, czy te różnice w syntetyzowaniu różnych form wit. B₆ są cechą stałą szczepów, wymaga jednak dalszych badań.

Autor składa serdeczne podziękowanie dr. M. E. Gregory i dr. S. K. Konowi za cenną pomoc w wykonywaniu pracy w Narodowym Instytucie Mleczarskim w Shinfield, Reading.

Streszczenie

Na podłożu bezwitaminowym hodowano 10 szczepów pleśni *Oospora lactis* a następnie oznaczano w kulturach syntezę pirydoksalu, pirydoksyny i pirydoksaminy metodą mikrobiologiczną przy użyciu szczepów *Sacch. carlsbergensis*, *L. casei* i *Str. faecium*. Stwierdzono u wszystkich szczepów syntezę pirydoksalu (36,5—121,5 m μ g na 1 ml podłoża) i pirydoksaminy (19—118 m μ g na 1 ml podłoża). Z wyjątkiem 3 szczepów reszta (7 szczepów) syntetyzowała również pirydoksynę w ilości 60—245 m μ g na 1 ml podłoża.

PIŚMIENNICTWO

1. Burkholder P. R., Collier J. i Moyer D.: Food Res., 1943, t. 8, s. 314.
2. Dłużewski M.: Zeszyty Naukowe SGGW. Techn. Rolno-Spoż. Zeszyt 2, Warszawa, 1962, s. 27.
3. Dłużewski M.: Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. sci. biol. 1963, t. 17, s. 227.
4. Dłużewski M.: Synteza kwasu pantotenowego i nikotynowego przez pleśń *Oospora lactis* w zależności od niektórych parametrów ważnych w technologii serowarstwa, SGGW, Warszawa 1963.
5. Dłużewski M. i Bruderer G.: Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. sci. biol., 1963, t. 11, s. 221.
6. Dłużewski M., Pijanowski E. i Zmarlicki S.: Roczn: Techn. i Chemii Żywn.: 1961, t. 7, s. 127.
7. Dłużewski M. i Ritter W.: Bull. Acad. Polon. Sci., Ser., sci. biol., 1963, t. 11, s. 215.
8. Gregory M. E.: J. Dairy Res., 1959, t. 26, s. 203.
9. Pijanowski E.: Przemysł Spożywczy 1958, t. 12, s. 345.
10. Pijanowski E., Dłużewski M., Pacholczyk Z. i Zmarlicki S.: Przegląd Mleczarski 1961, t. 8, s. 5.
11. Pijanowski E., Wojtowiczowa M., Dłużewski M. i Koper J.: Materiały XI Zjazdu Nauk. Techn. „Przem. spoż. a wyżywienie ludności”. PAN i NOT, Warszawa 1961, s. 228.
12. Rabinowicz J. C. i Snell E. E.: J. biol. chem., 1948, t. 176, s. 1157.
13. Ritter W.: Schweiz. Z. all. Path., 1950, t. 13, s. 547.