

## OBOHATENIE KUKURIČNÉHO VÝLUHU A MELASY AKO ŽIVÍN PRE PRODUKCIU CHLÓRTETRACYKLÍNU (AUREOMYCÍNU) BIOMASOU A PRODUKTMI METABOLIZMU LAKTOBACILOV (I)

E. BĚLÍK, J. ZELINKA

Výskumný ústav antibiotík, Roztoky pri Prahe

Pokusné pracovisko kukuričného výluhu Slovenských škrobární, n. p., Boleráz

Pri výrobe antibiotík dôležitú úlohu okrem špeciálne upravených pôd má predovšetkým kvalita použitých surovín, a to najmä takých, ktoré predtým tvorili odpady v potravinárskom priemysle.

Jednou z dôležitých odpadových surovín je kukuričný výluh (corn-steep liquor). Pri výrobe antibiotík, predovšetkým penicilínu, je kukuričný výluh základnou surovinou a jeho akosť má podstatný vplyv na dosiahnuté výťažky [1, 2, 3, 4].

V predchádzajúcej práci [5] J. Zelinka sledoval vplyv kukuričného výluhu špeciálne upraveného biomasou a produktmi metabolizmu laktobacilov na produkciu penicilínu.

Aj pri ďalších antibiotikách, ktoré sú produkované aktinomycétami (napr. streptomycín, chlórtetracyklín (CTC), oxytetracyklín), používa sa kukuričný výluh, avšak v menších koncentráciách [6, 7]. Podľa niektorých autorov [8, 9, 10] možno kukuričný výluh nahradiť napr. mäsovými výťažkami, rybími múčkami, peptónom a pod., ale za našich podmienok je použitie kvalitného kukuričného výluhu ekonomickejšie. Preto sa zlepšeniu kvality tejto suroviny na Pokusnom pracovisku v Bolerázi venuje zvýšená pozornosť.

Nehomogénnosť jednotlivých šarží kukuričného výluhu spôsobuje kolísanie výťažkov aureomycínu, ktoré sa podľa našich skúseností z laboratórnej fermentácie pohybuje od 800 do 1300  $\gamma$ /ml. Ďalšou odpadovou surovinou je melasa, ktorá sa používa pri príprave fermentačných pôd pre produkciu CTC, zatiaľ čo vo fermentačných pôdach sa pri ostatných antibiotikách táto surovina doteraz nevyužíva. Je zaujímavé, že práve v pôdach pre fermentáciu chlórtetracyklínu pridaním 0,2 % melasy sú podľa van Dycka a de Somera produkčné výsledky viac než o 30 % vyššie, čo predstavuje priemernú produkciu asi 1200  $\gamma$  chlórtetracyklínu na 1 ml. Toto potvrdili aj naše pokusy, avšak s tým rozdielom, že sme používali repnú melasu, zatiaľ čo van Dyck a de Somer použili pravdepodobne trstinovú melasu. Trstinová melasa líši sa od repnej melasy chemickým zložením a obsahom vzrastových látok.

Pretože biologická hodnota jednotlivých šarží pri kukuričnom výluhu a melase môže byť často rôzna, sledovali sme pomocou biologických testov kvalitu týchto surovín bežne vyrobených, ako aj upravených spôsobom opísaným pre produkciu chlórtetracyklínu. Postup úpravy surovín sme volili preto,

lebo sme r. 1954 zistili, že je možné zvýšiť produkciu chlór-tetracyklínu obohatením kukuričného výluhu a melasy biomasou a produktmi metabolizmu laktobacilov z 1100  $\gamma$  na 1400—1500  $\gamma$  CTC/ml.

### Experimentálna časť

1. Na pokusy sa použila obyčajná kukuričná máčacia voda z prevádzky. Jedna časť tejto vody sa za obvyklých prevádzkových podmienok zahustila vo vákuových odparkách (liatinová a z nehrdzavejúcej ocele) pri teplote 60 °C a slúžila ako kontrola, zatiaľ čo druhá časť sa odparila podstatne šetrnejším spôsobom v sklenej vákuovej odparke pri teplote 25—30 °C. Priemerná doba odparovania pri jednotlivých prevádzkových šaržach bola 7 ½ hodiny, kým pri laboratórne zahustených šaržach 3 hodiny. Týmto spôsobom sa pripravili 4 paralelné šarže. Pri všetkých takto vyrobených, ako aj ďalších kukuričných výluhoch sa sušina stanovila podľa Markusona [11].

Biologickú hodnotu týchto vzoriek sme stanovili fermentačným postupom na reciprokej trepačke metódou, ktorú opísal Bělik [12]. Použili sme kmeň *Streptomyces aureofaciens* Bg-16-3. Týmto postupom sme vo všetkých v práci uvedených prípadoch urobili trikrát vyhodnotenie vždy po 6 paralelných bankách; 3 banky sme použili pre stanovenie obsahu CTC na tretí deň a 3 banky na štvrtý deň. Antibiotikum sme titrovali modifikovanou difúznou metódou podľa Hessa [13] a metódou kolorimetrickou.

Tabuľka 1

| šarža kukuričného výluhu | odparka     | priemer $\gamma$ CTC/ml | % rozdielu* |
|--------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| 1                        | prevádzková | 1075                    | +4          |
|                          | sklená      | 1115                    |             |
| 2                        | prevádzková | 1143                    | +3          |
|                          | sklená      | 1181                    |             |
| 3                        | prevádzková | 1138                    | —           |
|                          | sklená      | 1137                    |             |
| 4                        | prevádzková | 1038                    | +4          |
|                          | sklená      | 1085                    |             |

\* Percentuálny rozdiel sa vždy vzťahuje k prevádzkove odparenému kukuričnému výluhu (kontrola).

Dosiahnuté priemerné výsledky uvedených štyroch paralelných šarží sú zhrnuté v tab. 1.

2. Po overení uvedených výsledkov, z ktorých je zrejmé, že kvalita kukuričného výluhu nie je ovplyvnená odparkou z liatiny a z nehrdzavejúcej ocele, bolo možné pokračiť k príprave surovín obohatených biomasou a produktmi metabolizmu laktobacilov v laboratórnom rozsahu.

Obohacovanie sa robilo dofermentovaním, a to dvoma spôsobmi: Jedna časť prevádzkovej kukuričnej máčacej vody bola kultivovaná spontánne bez úpravy pH a bez použitia inokulácie, zatiaľ čo druhá časť bola po úprave pH inokulovaná kultúrou *Lactobacillus Delbrückii* S-54 (LD S-54). Spontánna kultivácia máčacej vody sa robila v sklenej nádobe pri teplote 50 °C. Počas kultivácie sa v 33. a 50. hodine odoberali vzorky,

ktoré sa bežným spôsobom zahustili v sklenej laboratórnej vákuovej odparke. Druhá časť máčacej vody sa 20 minút čiastočne sterilizovala v prúdiacej pare. Po úprave pH pomocou  $\text{CaCO}_3$  sa inokulovala kmeňom *LD S-54* a kultivovala rovnakým spôsobom v sklenej nádobe pri teplote 50 °C.

Inokulum *LD S-54* sa pripravilo na pôde tohto zloženia: 2200 ml máčacej vody, 100 g kukuričného cukru, 5 g melasy, 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 30 g  $\text{CaCO}_3$ ; pH po 45 minútovej sterilizácii pri 115 °C bolo 6,8.

Prípravené inokulum sa použilo v množstve 10 %. Po 50 hodinovej fermentácii pri teplote 50 °C bola máčacia voda v sklenej odparke zahustená. S taktó získanými vzorkami sa fermentoval chlór-tetracyklín, pričom sa dosiahli priemerné produkčné výsledky (tab. 2).

Tabuľka 2

| kukuričný výluh                   | priemerná produkcia<br>γ CTC/ml | % kontroly* |
|-----------------------------------|---------------------------------|-------------|
| pôvodná máčacia voda (kontrola)   | 1230                            | —           |
| spontánne kultivovaná 33 hodín    | 1294                            | 105         |
| spontánne kultivovaná 50 hodín    | 1349                            | 110         |
| po inokulácii kultivovaná 50 hod. | 1353                            | 110         |

\* Percentuálny rozdiel sa vzťahuje na pôvodnú máčaciu vodu.

3. Melasa sa obohacovala podobným postupom ako pri dofermentovaní kukuričného výluhu inokuláciou kmeňom *LD S-54*. Pôvodná melasa o sušine 81 % sa pred inokuláciou za účelom dobrého rastu laktobacilov upravila taktó: 2840 g melasy, 45 g kukuričného výluhu, 18 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 150 g  $\text{CaCO}_3$ , do 18 litrov vody; pH po 45 minútovej sterilizácii pri 115 °C malo hodnotu 6,8.

Po vytemperovaní na kultivačnú teplotu 50 °C sa melasová zápara 60 hodín inokulovala 2200 ml kultúry *LD S-54*. Inokulum sa pripravilo na pôde tohto zloženia: 200 g melasy, 5 g kukuričného výluhu, 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 30 g  $\text{CaCO}_3$ , do 2 litrov vody; pH po 45 minútovej sterilizácii pri 115 °C bolo 6,8.

Fermentovalo sa v sklenej nádobe pri teplote 48—50 °C. Vzorky sa odoberali po 24, 48, 78, 96 a 120 hodinách. Odobrané vzorky sa zahustili v sklenej odparke a po stanovení sušiny sa použili na prípravu fermentačnej pôdy pre CTC. Produkčné výsledky sú uvedené v tab. 3.

Tabuľka 3

| vzorka melasy                 | priemerná produkcia<br>γ CTC/ml | % kontroly |
|-------------------------------|---------------------------------|------------|
| pôvodná melasa (kontrola)     | 1230                            | —          |
| melasa fermentovaná 24 hodín  | 1391                            | 113        |
| melasa fermentovaná 48 hodín  | 1385                            | 113        |
| melasa fermentovaná 78 hodín  | 1458                            | 118        |
| melasa fermentovaná 96 hodín  | 1420                            | 115        |
| melasa fermentovaná 120 hodín | 1350                            | 110        |

4. V ďalšom boli vyrobené šarže obsahujúce prekvaseňú melasu a dofermentovanú kukuričnú máčaciu vodu. Melasa bola fermentovaná 78 hodín, kukuričná máčacia voda 67 hodín. Postup pri inokulácii, ako aj fermentácii bol ten istý, ako sme už uviedli. Pred zahustením boli obidve fermentované kvapaliny zhomogenizované v pomere 2 : 5 a v sklenej vákuovej odparke zahustené. Tento pomer bol zvolený preto, že fermentačná pôda pre produkciu chlór-tetracyklínu obsahuje uvedené suroviny v rovnakom pomere. Po stanovení sušiny sa navážilo do fermentačnej pôdy pre produkciu CTC 0,5; 0,6 a 0,7 % (na 50 % sušinu). Získané produkčné výsledky sú zhrnuté v tab. 4.

Tabuľka 4

| surovina  | priemerná produkcia<br>γ CTC/ml | % kontroly |
|---|---------------------------------|------------|
| pôvodná melasa + pôvodný kukuričný výluh (kontrola) | 1230                            | —          |
| doferm. melasa + doferm. KV (0,5 %)                 | 1613                            | 131        |
| doferm. melasa + doferm. KV (0,6 %)                 | 1619                            | 131        |
| doferm. melasa + doferm. KV (0,7 %)                 | 1669                            | 135        |

Všetky práce boli vykonané v laboratórnom rozsahu. Pri štúdiu vplyvu biomasy a produktov metabolizmu laktobacilov sa v tejto práci použili na pokusy bežné obchodné produkty kukuričného výluhu a melasy. V ďalšom príspevku, ktorý bude nadväzovať na túto prácu, budeme sa venovať dôkladnému analytickému a biochemickému rozboru týchto surovín, ako aj priebehu zmien počas dofermentovania.

### Súhrn

Laboratórnou fermentáciou na reciprokej trepačke sa zistilo, že produkcia chlór-tetracyklínu nie je zásadne ovplyvňovaná doterajším spôsobom prevádzkového zahusťovania kukuričného výluhu, pretože štyri rovnaké šarže máčacej vody, ktoré boli zahustené pri podstatne nižšej teplote a za kratšiu dobu v sklenej vákuovej odparke, nejavili diferencie v produkcii chlór-tetracyklínu.

Pri dofermentovaní kukuričnej máčacej vody spontánne, ako aj inokuláciou kmeňom *Lactobacillus Delbrückii* S-54 vykazujú takto získané suroviny pri fermentácii chlór-tetracyklínu zvýšenú produkciu maximálne o 10 %.

Ak sa pri produkcii chlór-tetracyklínu použije živná pôda obsahujúca fermentovanú melasu, produkcia chlór-tetracyklínu sa zvýši maximálne o 18 %.

Oveľa vyššiu produkciu chlór-tetracyklínu (až 35 %) možno dosiahnuť, ak sa použije dofermentovaná melasa i dofermentovaný kukuričný výluh v pomere 2 : 5 pred spoločným zahustením týchto surovín. Je pravdepodobné, že zvýšenie produkcie chlór-tetracyklínu je spôsobené biomasou a produktmi metabolizmu laktobacilov. Použitím fermentačnej pôdy s obsahom dokvaseného kukuričného výluhu a fermentovanej melasy pohybuje sa produkčné

výsledky chlortetracyklínu od 1600 do 1700  $\gamma$ /ml, zatiaľ čo pôvodné suroviny vykazujú produkciu asi 1200  $\gamma$ /ml.

## ОБОГАЩЕНИЕ КУКУРУЗНОГО ЩЕЛОКА И МЕЛАССЫ КАК ПОЧВЫ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ ХЛОРТЕТРАЦИКЛИНА (АУРЕОМИЦИНА) БИОМАССОЙ И ПРОДУКТАМИ МЕТАБОЛИЗМА ЛАКТОБАЦИЛЛОВ

Э. БЕЛИК, Я. ЗЕЛИНКА

Исследовательский институт антибиотик, Розтоки у Праги

Станция исследования кукурузного щелока Словацких крахмальных заводов н. з.  
в Болеразе

### Выводы

Лабораторной ферментацией на трепательном аппарате было найдено, что продукция хлортетрациклина в основном не находится под влиянием существующего заводского способа сгущивания кукурузного щелока, потому что 4 одинаковые нагрузки намачиваемого вещества, которые были загущены при сравнительно низкой температуре и в течении короткого времени в стеклянной выпарке под вакуумом, не проявились дифференцией в продукции хлортетрациклина. При спонтанной доферментации воды, смачивающей кукурузу, а также и инокуляцией штампом, *Lactobacillus Delbrückii S-54* показывает таким образом полученное сырье при ферментации хлортетрациклина увеличение продукции максимально на 10%.

Если же применить для продукции хлортетрациклина живительную почву, содержащую ферментированную мелассу, продукция хлортетрациклина увеличивается максимально на 18%.

Значительно высшую продукцию хлортетрациклина (даже на 35%) можно получить в том случае, если применить доферментированную мелассу и доферментированный кукурузный щелок в отношении 2:5 перед общим загущением этого сырья. Повидимому увеличение продукции хлортетрациклина по всей вероятности способствовано биомассой и продуктами метаболизма лактобациллов. Применение почвы по ферментации с содержанием сбродившего кукурузного щелока и ферментированной мелассы указывают, что результаты продукции хлортетрациклина находятся в границах от 1600 до 1700  $\gamma$ /ml, между тем как первоначальное сырье указывает продукцию около 1200  $\gamma$ /ml.

Поступило в редакцию 13. IX. 1955 г.

## ANREICHERUNG VON MAISQUELLWASSER (CORN-STEEP LIQUOR) UND MELASSE ALS NÄHRBÖDEN FÜR DIE PRODUKTION VON CHLORTETRACYCLIN (AUREOMYCIN) DURCH BIOMASSE UND PRODUKTE DES METABOLISMUS VON LAKTOBAZILLEN (I)

E. BĚLÍK, J. ZELINKA

Forschungsinstitut für Antibiotika, Roztoky bei Prag

Versuchsarbeitsstelle für Maisquellwasser der Slowakischen Stärkefabriken, National-  
unternehmen in Boleráz

### Zusammenfassung

Durch Laboratoriumsfermentation auf der reziproken Schüttelmaschine wurde festgestellt, dass die Produktion von Chlortetracyclin grundsätzlich nicht durch das bisherige-

Verfahren des betriebsmässigen Eindickens des Maisquellwassers beeinflusst wird, nachdem vier völlig gleiche Chargen von Maisquellwasser, die bei wesentlich niedriger Temperatur und während kürzerer Zeit eingedickt wurden, keinerlei Differenzen in der Produktion von Chlortetracyclin aufwiesen.

Bei der spontan verlaufenden Fermentation des Maisquellwasser, ebenso auch bei der durch Inokulation mit dem Stamm *Lactobacillus Delbrückii S-54* verlaufenden, weisen die solchermaßen erhaltenen Rohstoffe bei der Fermentation des Chlortetracyclins eine erhöhte Produktion um maximal 10 % auf.

Verwendet man bei der Produktion des Chlortetracyclins einen Nährboden, welcher fermentierte Melasse enthält, so wird die Produktion von Chlortetracyclin um maximal 18 % erhöht.

Eine wesentlich höhere Produktion von Chlortetracyclin (bis zu 35 %) zu erzielen ist in jenem Falle möglich, wenn man fermentierte Melasse und fermentierten Maisquellwasser im Verhältnis von 2 : 5 vor dem gemeinsamen Eindicken dieser Rohstoffe verwendet. Es erscheint als wahrscheinlich, dass die erhöhte Produktion von Chlortetracyclin durch die Biomasse und durch Produkte des Metabolismus der Laktobazillen bewirkt wird. Durch Verwendung des Fermentationsbodens mit einem Gehalt an fermentierten Maisquellwasser und fermentierter Melasse bewegen sich die Produktionsergebnisse an Chlortetracyclin um 1600—1700  $\gamma$ /ml, während die ursprünglichen Rohstoffe eine Produktion um 1200  $\gamma$ /ml aufweisen.

In die Redaktion eingelangt den 13. IX. 1955

#### LITERATÚRA

1. Liggett R. W., Koffler H., Bact. Rev. 12, 297—311 (1948). 2. Kanad. patent 499 231. 3. Brit. patent 714 634. 4. USP 2 515 157. 5. Zelinka J., Biológia 9, 437—449 (1954); Čsl. Biol. 4, 55—56 (1955). 6. Thornberry H. H., Shanahan A. J., Arch. Biochem. Bioph. 33, 459—464 (1951). 7. Van Dyck P., de Somer P., Antibiot. Chemother. 4, 184—197 (1952). 8. Oyake, Shina, Japan J. Antibiot. 3, 463—466 (1950). 9. Švajčiar. patent 283 914. 10. Brit. patent 660 203. 11. Smolek K., Průmysl potravin 3, 447—449 (1952). 12. Bělík E., dosiaľ nepublikované. 13. Hess J., dosiaľ nepublikované.

Došlo do redakcie 13. IX. 1955