

Fermentácia riboflavínu za použitia baktericídnych a fungicídnych látok

J. FUSKA, Š. ŠULO

Biotika, n. p., Slovenská Lupča

Z kontaminovaných riboflavínových pôd a z aparatúry používanej pri biosyntéze riboflavínu sa izolovalo 12 kontaminujúcich mikroorganizmov. Difúznym testom sa stanovila citlivosť izolovaných mikroorganizmov na 7 vybraných látkach. Zo skúšaných látok nitrofurány samotné i v kombinácii s penicilínom potláčali rozvoj kontaminantov, pričom boli bez účinku na produkciu riboflavínu.

Úspešnú biosyntézu riboflavínu podmieňuje niekoľko faktorov. Prvoradý význam má zloženie produkčných pôd, najmä vhodné zdroje uhlíka [1, 2] a dusíka [3, 4]. Z technologických faktorov sa pri hĺbkovej fermentácii riboflavínu najvýraznejšie uplatňuje miešanie a vzdušenie počas fermentácie [4] a podmienky sterilizácie pôd [5]. V podmienkach priemyselnej biosyntézy látok je tiež dôležitá otázka kontaminácie pôd nežiadúcou mikroflórou, ktorá ovplyvňuje najmä produkciu žiadanej látky. Pri výrobe antibiotík sa v niektorých prípadoch používa tzv. „chránená fermentácia“, kde sa využívajú antibakteriálne vlastnosti antibiotík [6]. Pre potláčanie kontaminácií v droždiarstve sa s úspechom použil chlórtracyklín [7], zatiaľ čo pri liehovom kvasení sa na potláčanie infekcií osvedčil chloramfenikol [8]. Pri fermentácii riboflavínu sa na potláčanie kontaminácií použil penicilín v koncentráciách 0,5—40 mj/ml [9] a chlórtracyklín [10].

Cieľom našej práce bolo nájsť vhodnú látku alebo zmes látok, ktoré by účinne potláčali rozvoj kontaminujúcich mikroorganizmov, pričom by nevplývali na produkciu riboflavínu.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Produkčný mikroorganizmus

Produkčný kmeň *Eremothecium ashbyi* 165 sa získal postupným výberom zo zbierkového kmeňa, poskytnutého mikrobiologickými zbierkami Karlovej univerzity v Prahe. Kmeň sa uchovával na stuženej pôde Gorodkovej [11].

Príprava inokula

Na prípravu inokula sa použila tekutá pôda Gorodkovej [11], ktorá sa naočkovala jednou 5—7 dňovou kolóniou produkčného kmeňa. Doba kultivácie bola 24 hodín.

Fermentácia

Produkčná pôda mala zloženie: sacharóza 3,5 g, sójový olej 0,5 ml, sójová múka 4 g,

sladový kvet 1 g, vodovodná voda do 100 ml. pH pôdy po sterilizácii bolo 6,5. Na očkovaníe pôdy sa použilo 10 % inokula. Pri overovaní účinku aktívnych látok na produkciu riboflavínu sa tieto látky pridávali do fermentačných pôd v koncentráciách, ako sú uvedené v tab. 3. Antibiotiká sa do pôd pridávali vo forme sterilných roztokov po sterilizácii.

Kultivačné podmienky

Kultivovalo sa v troch 500 ml varných bankách s plochým dnom. Banky sa plnili po 80 ml. Pôda sa sterilizovala 20 minút pri 121 °C. Na kultiváciu sa použila rotačná trepačka, ktorá mala 220 ot./min., pričom polomer kružnice opisovanej výstredníkom bol 5,5 cm. Doba fermentácie bola 140 hodín. Pokus sa opakoval trikrát.

Izolácia kontaminantov

Z kontaminovanej riboflavínovej pôdy sa odobrala vzorka, z ktorej časť sa preočkovala do bujónu (1 : 10). Pri zisťovaní nesterilnosti aparatury sa urobil výter sterilným vatovým tampónom, ktorý sa vypral v sterilnom bujóne. Inkubácia naočkovaných bujónov prebiehala pri 37 °C po dobu 24 hodín. Po skončení kultivácie sme pomnožený kontaminant vyočkovali na krvný agar a v niektorých prípadoch na Wilsonov—Blairov agar. Po makroskopickom odčítaní nasledovalo stanovenie morfológických a taxonomických znakov, obvyklé v bežnej diagnostike [12]. Izolované kmene sa uchovávali na šikmom bujónovom agare pri +5 °C.

Stanovenie citlivosti kontaminantov

Citlivosť sa stanovila difúznou metódou. Ako testovací kmeň sa vždy použil jeden z kontaminantov, ktorý sa pomnožil v bujóne (18 hodín pri 37 °C) a povrchovým spôsobom sa naočkoval na testovacie platne. Na naočkované platne sa uložili sterilné valčeky, ktoré sa potom naplnili sterilnými skúšanými aktívnymi látkami vo forme acetónových roztokov. Každá látka sa použila v troch koncentráciách (1, 20 a 100 µg/ml) a naplnila sa do troch valčekov. Tri valčeky sa naplnili iba 50 % vodným acetónom, v ktorom sa skúšané látky rozpustili. Kultivácia trvala 18 hodín pri 37 °C. Účinnosť sa hodnotila na základe veľkosti vytvorenej inhibičnej zóny, ktorú vytvorila skúšaná látka v koncentrácii 20 µg/ml. Látky, ktoré pri tejto koncentrácii vytvárali zónu do 20 mm, v priemere sme označili +, kým látky, ktoré vytvárali inhibičnú zónu nad 20 mm, sme označili ++.

Použité aktívne látky

Na základe údajov v literatúre o účinnosti látok a ich fyzikálnych vlastnostiach, ďalej podľa druhov vyskytujúcich sa mikroorganizmov a na základe ekonomických kritérií sme vybrali sedem látok uvedených v tab. 2.

Stanovenie riboflavínu

Riboflavín sme stanovili vo fermentačných pôdach polarografickou metódou v atmosfére dusíka po predbežnej kyslej hydrolýze [13].

Výsledky a diskusia

Pri hĺbkovej fermentácii riboflavínu sa pozoroval častý výskyt kontaminácií pôd už v laboratórnom rozsahu, ak sa fermentovalo za podmienok, aké sa bežne používajú pri fermentácii antibiotík. Nebezpečenstvo častých kontami-

nácií sa výrazne prejavilo pri fermentácii riboflavínu v poloprevádzkovom a prevádzkovom meradle. Väčšia zložitost' použíwanej aparatury, nepatrne poruchy v sterilizácii a rozvođe vzduchu, ako aj zložitost' jednotlivých operácií prispievali k zvýšenej možnosti kontaminácií. Z 12 izolovaných kontaminantov (tab. 1), izolovaných prevažne z väčších objemov, najčastejšie sa vyskytli druhy *Streptococcus* a *Lactobacillus*. Izolované mikroorganizmy sme postupne

Tabuľka 1

Mikroorganizmy izolované z kontaminovaných riboflavínových pôd
a z aparatury použíwanej pri fermentácii riboflavínu

Číslo	Názov mikroorganizmu	Izolovaný z
1	<i>Streptococcus lactis</i>	B, POT, OT
2	<i>Streptococcus</i> sp.	B, POT, OT
3	<i>Streptococcus faecalis</i>	B, POT
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	B, POT, OT
5	<i>Spirillum volutans</i>	LFT
6	<i>Proteus vulgaris</i>	POT, OT
7	<i>Pseudomonas</i> sp.	POT, OT
8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LFT, POT, OT
9	<i>Bacillus anthracoides</i>	LFT
10	<i>Escherichia coli</i>	POT, OT
11	<i>Flavobacterium aquatile</i>	POT, OT
12	<i>Zmes Coli — aerogenes</i>	OT

B — banka, objem 2 l,

LFT — laboratórny fermentačný tank, objem 20 l,

POT — predočkovací tank,

OT — očkovací tank.

testovali na citlivosť voči 7 uvedeným látkam (tab. 2). Citlivosť jednotlivých druhov voči jednotlivým látkam bola dosť odlišná. Najlepšie účinky vykazovali nitrofurány, chlór-tetracyklín a penicilín (tab. 2).

Úspešné využitie uvedených látok na potláčanie kontaminácií bolo ďalej podmienené tým, aby látky pri svojom účinku neznižovali produkciu riboflavínu. Z tohto dôvodu sa do kontrolnej pôdy pridávali postupne jednotlivé látky a konečná produkcia riboflavínu sa porovnávala s produkciou získanou na kontrolnej pôde. Všetkých 7 látok sa overilo v jednej až v troch koncentráciách za inak nezmenených podmienok. Výsledky sú v tab. 3. Na produkciu riboflavínu mali veľmi nepriaznivý vplyv 4,5-dibrómsalicylanilid a 3,4,5-tribrómsalicylanilid, ktoré v koncentráciách 20 µg/ml pôdy inhibovali produkciu riboflavínu asi o 50 %. Chlór-tetracyklín prejavil už v nízkych koncentráciách miernu inhibíciu produkcie, a preto aj napriek dobrým účinkom

Tabuľka 2
Účinnosť aktívnych látok voči izolovaným kontaminantom

Číslo	Názov kontaminanta	Aktívna látka č.						
		1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Streptococcus lactis</i>	+	+	+	++	+	++	++
2	<i>Streptococcus sp.</i>	+	+	+	++	+	++	++
3	<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+	++	+
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	—	—	—	—	—	+	++
5	<i>Spirillum volutans</i>	++	++	+	++	++	++	++
6	<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	—	+	+	+	—
7	<i>Pseudomonas sp.</i>	++	++	—	—	—	++	0
8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	+	+	+	—	+
9	<i>Bacillus anthracoides</i>	++	++	—	+	+	++	+
10	<i>Escherichia coli</i>	+	+	—	—	—	+	0
11	<i>Flavobacterium aquatile</i>	—	+	—	++	++	+	—
12	<i>Zmes Coli — aerogenes</i>	+	+	—	—	—	+	—

0 — citlivosť nestanovená,

1 — semikarbazón 5-nitro-2-furalaldehydu,

2 — *N*-(5-nitrofurfurylidén)-1-aminohydantoín,

3 — tetrametyltiouramdisulfid sodný,

4 — 4,5-dibrómsalicylanilid,

5 — 3,4,5-tribrómsalicylanilid,

6 — chlór tetracyklín . HCl,

7 — draselná soľ penicilínu G.

Tabuľka 3
Vplyv použitých aktívnych látok na produkciu riboflavínu

Číslo	Aktívna látka	Koncentrácia μg/ml	Produkcia B ₂ v % oproti kontrola
	Názov		
1	∅	∅	+ 100,0
2	semikarbazón 5-nitro-2-furalaldehydu	20	99,8
3	<i>N</i> -(5-nitrofurfurylidén)-1-aminohydantoín	20	100,2
4	tetrametyltiouramdisulfid sodný	20	94,2
5	4,5-dibrómsalicylanilid	20	46,2
6	3,4,5-tribrómsalicylanilid	20	52,8
7	chlór tetracyklín . HCl	10	90,3
8	chlór tetracyklín . HCl	100	65,2
9	penicilín G, draselná soľ §	20	99,8
10	penicilín G, draselná soľ §	100	100,1
11	penicilín G, draselná soľ §	250	94,6
12	penicilín G, draselná soľ §	100	
	semikarbazón 5-nitro-2-furalaldehydu	10	100,2
13	penicilín G, draselná soľ §	100	
	<i>N</i> -(5-nitrofurfurylidén)-1-aminohydantoín	10	103,2

+ — priemerná produkcia kontroly 1773 μg/ml pôdy,

§ — koncentrácia udávaná v mj/ml.

voči kontaminantom sa ďalej nepoužíval. Bez účinku na produkciu riboflavínu boli 5-nitro-2-furalaldehydsemikarbazón, *N*-(5-nitrofurfurylidén)-1-aminohydantoín a draselná soľ penicilínu G.

Na základe priaznivých výsledkov s nitrofuránmi a penicilínom sa pre ďalšie skúšky zvolila kombinácia obidvoch uvedených látok. Pri použití kombinácie 10 mj/ml penicilínu a 10 μ g/ml niektorého z dvoch uvedených nitrofuránov zvýšila sa aktivita pôd, vyjadrená priemerom inhibičnej zóny, znížila sa tým možnosť vzniku rýchlej rezistencie kontaminantov na jednu látku a produkcia riboflavínu ostala pritom nezmenená (tab. 3).

V poloprevádzkovom meradle sa sledovala aj aktivita produkčnej pôdy v 24 hodinových intervaloch. Zistilo sa, že pri použití kombinácie 100 mj/ml penicilínu a 10 μ g/ml jedného z dvoch nitrofuránov poklesla aktivita pôdy za celú dobu fermentácie (120 hodín) o 50—60 %. Ostávajúca aktivita pôd bola i naďalej dostatočne vysoká na potlačenie väčšiny vyskytujúcich sa kontaminantov. Pridávaním súčasne dvoch aktívnych látok do pôdy klesol počet kontaminácií v prevádzkovom meradle zo 42 % na 2 %.

ФЕРМЕНТАЦИЯ РИБОФЛАВИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ БАКТЕРИЦИДНЫХ И ФУНГИЦИДНЫХ ВЕЩЕСТВ

Я. Фуска, Ш. Шуло

Биотика, и. п., Словенска Люпча

В работе изучалась возможность подавить введением активных веществ в почву развитие коштамигрирующих микроорганизмов при биосинтезе рибофлавина.

Из выферментированной коштамигрированной почвы и из аппаратуры, применяющейся при производстве рибофлавина, было выделено 12 коштамигрирующих веществ. В качестве коштамигрирующих веществ чаще всего встречались виды *Streptococcus* и *Lactobacillus*. Диффузионным проверочным опытом определили чувствительность выделенных микроорганизмов по отношению к 7 избранным активным веществам. Большинство использованных веществ сильно действовали на выделенные микроорганизмы.

В следующей части работы изучалось влияние активных веществ на получение рибофлавина. Трое из выбранных веществ отрицательно влияли на получение рибофлавина.

5-Нитро-2-фуролальдегид семикарбазон, *N*-(5-нитрофурфуриден)-1-аминогидантоин и пенициллин G можно по отдельности и в смеси применять на подавление коштамигрирующей микрофлоры при биосинтезе рибофлавина.

Preložila T. Dillingarová

FERMENTATION VON RIBOFLAVIN BEI ANWENDUNG BAKTERIZIDER
UND FUNGIZIDER STOFFE

J. Fuska, Š. Šulo

Biotika, Nationalunternehmen, Slovenská Lupča

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht, durch Zugabe aktiver Stoffe in den Boden die Entwicklung kontaminierender Mikroorganismen im Verlauf der Biosynthese des Riboflavins zu unterdrücken.

Aus den fermentierten, kontaminierten Böden und aus der bei der Erzeugung von Riboflavin benutzten Apparatur wurden 12 Kontaminanten isoliert. Als Kontaminanten traten am häufigsten die Arten *Streptococcus* und *Lactobacillus* auf. Durch den Diffusionstest wurde die Empfindlichkeit der isolierten Mikroorganismen gegen 7 ausgewählte Stoffe ermittelt. Die Mehrheit der geprüften Stoffe war gegen die isolierten Mikroorganismen hochwirksam.

Im weiteren Teil dieser Arbeit wurde der Einfluß der wirksamen Stoffe auf die Produktion von Riboflavin untersucht. Unter den geprüften Stoffen wiesen drei einen ungünstigen Einfluß auf die Produktion von Riboflavin auf.

5-Nitro-2-furaldehyd-semicarbazon, *N*-(5-nitrofurfuryliden)-1-aminohydantoin und Penizillin G für sich allein oder in Mischung kann man zur Unterdrückung der kontaminierenden Mikroflora bei der Biosynthese des Riboflavins benutzen.

Preložil K. Ullrich

LITERATÚRA

1. Schopfer W. H., Guilloud M., *Schweiz. Z. Path. Bakt.* **8**, 521 (1945).
2. Tabekin B., U. S. pat. 2 493 274 (1950).
3. Stiles H. R., U. S. pat. 2 483 855 (1949).
4. Pfeifer U. F., Tanner F. W., Vojnovich J. Ch., Trauffer J. H., *Ind. Eng. Chem.* **42**, 1776 (1950).
5. De Vleeschauer A., Hendrickx H., *Milchwissenschaft* **13**, 6, 249 (1958).
6. Herold M., Nečásek J., *Adv. Appl. Microbiol.* **1**, 1 (1960).
7. Kocwa E., *Prace Inst. Lab. Badawczych Przemyslu Spozywczego* **11**, 43 (1961).
8. Bárta J., *Kvasný průmysl* **6**, 283 (1960).
9. Distillers Co. Ltd, Brit. pat. 650 600 (1948).
10. Hanus J., Munk V., Roubíček R., *Čs. pat.* 95 503 (1960).
11. Kocková-Kratochvílová A., *Praktikum technické mikrobiologie*, 64. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1954.
12. Sedlák J., Rische H., *Enterobacteriaceae Infektionen*, 452—465. G. Thieme, Leipzig 1961.
13. Knobloch E., *Fysikálně chemické metody stanovení vitamínů*, 178. Nakladatelství ČSAV, Praha 1956.

Do redakcie došlo 31. 10. 1963
V revidovanej podobe 4. 11. 1964

Adresa autorov:

Inž. Ján Fuska, PhMr. Štefan Šulo, Biotika, n. p., Slovenská Lupča.