

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ VITAMINŮ B-KOMPLEXU VE ČTYŘECH VZORCÍCH KUKUŘIČNÝCH EXTRAKTŮ MIKROBNÍMI TESTY

EDUARD BĚLÍK

Výzkumný ústav antibiotik v Roztokách u Prahy

Velmi citlivé mikrobiální testy byly použity v různých modifikacích mnohými autory k stanovení vitaminů a růstových faktorů [1, 2, 3, 4]. Biologické metody a chemické analýzy jsou ve většině případů velmi zdoluhavé a méně přesné. Mikrobiální testy nesmírně pomohly při řešení stěžejních otázek moderní biochemie a pronikají čím dále tím více jako analytické metody do průmyslové i lékařské kontroly a výzkumu.

Mikrobiálních testů pomocí laktobacilů *Lactobacillus arabinosus* CN 1326, *Lactobacillus fermenti* CN 1325 a *Lactobacillus casei* CN 1357 jsme použili ke stanovení kyseliny listové, biotinu, calcium pantothenátu, aneurinu, nikotinamidu a riboflavinu ve čtyřech druzích kukuřičného extraktu (corn-steep).

A. Složení a příprava živných prostředí

Složení pevné půdy: 2 % agaru, 1 % glukosy, 1 % kvasničného extraktu, 0,5 % peptonu a 0,1 % jaterního extraktu na 100 ml živné půdy. pH bylo upraveno na 6,6 pomocí ledové kyseliny octové. Živná půda byla rozlita po 6 ml do bakteriologických zkumavek, které byly uzavřeny patentními Kapsenbergovými uzávěry a sterilisováno 3 krát v Kochově hrnci, vždy po 24 hodinových intervalech půl hodiny.

Složení tekuté základní půdy:

enzymaticky natrávený kasein	400	ml (5 %)
roztok solí C ⁺	20	ml
KH ₂ PO ₄	2,5	g
K ₂ HPO ₄	2,5	g
L-cystin	100	mg
DL-tryptofan	200	mg
asparagin	100	mg
kyselina L-glutamová	50	mg
glukosa	20	g
adenin	10	mg
guanin	10	mg
uracil	10	mg
xanthin	10	mg
aneurin	0,5	mg
pyridoxin	1,0	mg
pyridoxal	0,5	mg
pyridoxamin	0,5	mg
Ca-pantothenát	0,5	mg
nikotinamid	0,5	mg
d-biotin	0,004	mg
kyselina listová	0,002	mg
kyselina p-aminobenzoová	0,5	mg

Na-acetát	20,0	g
chlorid amonný	3,0	g
Na-thioglykolát	0,5	g
doplnit redestilovanou sterilní vodou do	500	ml
a upravit pH na 6,6		

Roztok solí C^+ : $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 10 g, $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ 2 g, NaCl 0,5 g, $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,5 g, doplněno redestilovanou sterilní vodou na celkový objem 250 ml a okyseleno pěti kapkami koncentrované kyseliny solné p. a.

Roztok purinů: adeninsulfátu 0,025 g, guaninu 0,025 g, uracilu 0,025 g a přidá se 0,250 g cystinu. Tyto látky byly kvantitativně převedeny redestilovanou sterilní vodou do 25 ml odměrné nádoby. Úplného rozpuštění bylo dosaženo přidávkem několika kapek koncentrované kyseliny solné a současným zahřátím. Po vytemperování byl upraven objem redestilovanou sterilní vodou.

Roztok vitamínů: vitaminy byly pipetovány do základní tekuté půdy ze zásobních roztoků, které byly uchovávány 2—3 týdny při $+5^\circ C$.

Do sterilních zkumavek (viz B) bylo pipetováno po 5 ml tekutého media a po 5 ml redestilované sterilní vody. Zkumavky uzavřeny Kapsenbergovými patentními uzávěry a sterilisováno 15 minut v Kochově hrnci.

B. Použité nádoby

Odměrné nádoby včetně pipet byly vyčištěny chromsírovou směsí, pečlivě vyprány pětkrát teplou, pětkrát studenou vodovodní vodou a nakonec třikrát vodou destilovanou. Zkumavky používané k získání inokula a k vlastnímu testování byly z jenského skla a vymyty stejným způsobem jako odměrné nádoby. Před použitím bylo všechno sklo sterilisováno suchým teplem při $125^\circ C$. Kapsenbergovy patentní uzávěry byly předem vyvařeny v destilované vodě a vysterilisovány.

C. Příprava kultury pro mikrobiální test

Laktobacily byly přechovávány v pevném mediu výše uvedeného složení a byly každý měsíc vpichem přeočkovány do stejného media. Po každém přeočkování inkubováno 24 hodin při $37^\circ C$, pak udržovány při teplotě $+5^\circ C$.

Do sterilního tekutého media (viz výše) byla kultura přenesena 24 hodin před testováním. Po tuto dobu byly zkumavky se zaočkováním tekutým mediem uchovávány v termostatu při $37^\circ C$. Suspence byla odstředěna za dodržení aseptických podmínek, třikrát promyta fyziologickým roztokem, tímto roztokem zředěna a použita jako inokulum k vlastnímu testování.

Příprava čtyř vzorků corn-steepu (Csl) k testování

Corn-steep, který je důležitou surovinou k výrobě antibiotik, se získává jako odpad po procesu máčení kukuřice ve škrobárnách. Jednotlivé šarže jsou často nehomogenní. Zahuštění Csl se provádí ve vakuových odparkách při teplotě $60^\circ C$. Z těchto důvodů byly zkoušeny 3 vzorky Csl z běžného výrobního procesu, při čemž jeden vzorek je zahraničního původu (II) a jeden (IV) máčecí kukuřičná voda vysušená při nízké teplotě.

Před vlastním testováním byla stanovena jednak vlastní sušina, jednak rozpustné a nerozpustné složky a dosaženo těchto hodnot:

Csl	sušina celková	rozpuštné látky	nerozpuštné látky	extrakt
	%	%	%	%
I	56,45	96,20	2,17	54,28
II	50,91	98,57	0,73	50,18
III	53,86	96,40	1,94	51,92
IV	96,97	88,70	10,96	86,01

Sušiny rozpuštných látek po jednohodinové sterilisaci při 115 °C:

Csl	sušina celková	rozpuštné látky	nerozpuštné látky	extrakt
	%	%	%	%
I	56,45	97,70	1,30	55,15
II	50,91	99,18	0,42	50,49
III	53,86	97,37	1,42	52,44
IV	96,97	89,54	10,15	86,82

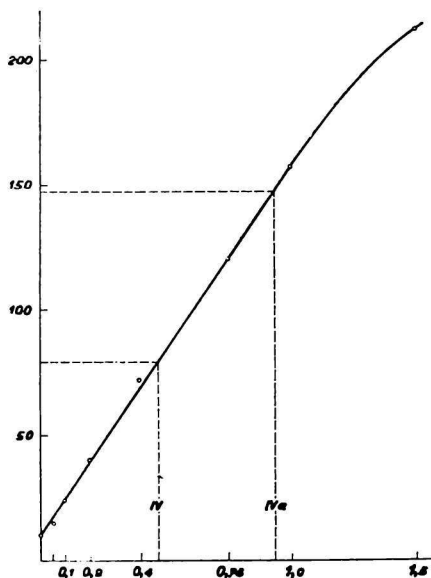
D. Pokusná metodika

K stanovení jednotlivých růstových faktorů byla připravena tekutá základní půda s tou výjimkou, že byl vynechán roztok určovaného vitaminu. 5 ml této půdy bylo pipetováno do zkumavek a k tomuto byl přidán pipetováním roztok určovaného vitaminu a to v stoupajícím množství. Sterilní redestilovanou vodou doplněn objem přesně na 10 ml. Sterilováno 15 minut v Kochově hrnci a po vyteperování na pokojovou teplotu zaočkováno jednou kapkou bakteriální suspence, připravenou sub C. Stejným způsobem bylo postupováno při přípravě tekutého media s Csl, kdy místo vitaminu byl pipetován roztok analyzovaného Csl o známé koncentraci a konstantním pH. Množství, které je k pipetování nejvhodnější, nutno zjistit orientačními pokusy. Kultivováno při 37 °C; inkubační doba ve většině případů nepřesahovala 24 hodin. Jestliže růst při nejvyšší koncentraci vitaminu je slabý a je proto nutno inkubační dobu prodloužit, stává se stanovení méně přesným. Zákal růstu byl měřen na Klett-Summersonově fotokolorimetru. Naměřené hodnoty stanovení byly vyneseny graficky (graf 1). Každé stanovení bylo prováděno současně dvakrát. Zároveň byla prováděna kontrola zpětného růstu (recovery), jejíž výsledky potvrzovaly správnost postupu.

Přehled výsledků analyz podává tab. 1.

Tabulka 1
Obsah vitaminů v μg Csl

Csl	Aneurin	Biotin	Ca-pantothenát	Kyselina listová	Nikotinamid	Riboflavin
I	49	0,37	19	0,6	32	4,7
II	41	0,38	21,5	0,25	34	3,9
III	48,5	0,34	14,5	0,41	40	4,6
IV	51,2	0,6	47,5	0,78	58	3,2



Graf 1. Závislost růstu kmene *Lactobacillus arabinosus* CN 1326 na koncentraci Ca-pantothenátu v mediu. Filtr s maximální propustností při 520 μ , měřeno ve zkumavkách.

Souhrn

Byl stanoven obsah aneurinu, biotinu, Ca-pantothenátu, kyseliny listové, nikotinamidu a riboflavinu ve čtyřech vzorcích kukuřičných extraktů mikrobiálními testy pomocí laktobacilů *Lactobacillus arabinosus* CN 1326 ke stanovení Ca-pantothenátu, *Lactobacillus fermenti* CN 1325 ke stanovení aneurinu, *Lactobacillus casei* CN 1357 ke stanovení biotinu, kyseliny listové, nikotinamidu a riboflavinu.

Bylo zjištěno, že nejvyšší množství vitaminů B-komplexu obsahuje kukuřičná máčecí voda, která byla vakuově při nízké teplotě zahuštěna a to aneurinu 51,2, biotinu 0,6, Ca-pantothenátu 47,5, kyseliny listové 0,78, nikotinamidu 58 a riboflavinu 3,2 μ /g sušiny kukuřičného extraktu. Množství vitaminů B-komplexu ve zbývajících třech vzorcích máčecích kukuřičných vod, které byly běžnou výrobní technikou odpařeny, je následující: aneurin 41—49, biotin 0,34—0,38, Ca-pantothenát 14,5—21,5, kyselina listová 0,26—0,6, nikotinamid 32—40 a riboflavin 3,9—4,7 μ /g sušiny Csl.

Práce byly provedeny na Vysoké škole chemicko-technologické, Katedra kvasné chemie v Praze, přednosta Doc. Dr. A. Kleinzeller.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ Б-КОМПЛЕКСА В ЧЕТЫРЕХ ПРОБАХ КУКУРУЗНЫХ ЭКСТРАКТОВ ПРИ ПОМОЩИ ТЕСТОВ НА МИКРОБАХ

ЭДУАРД БЕЛИК

Научно-исследовательский институт антибиотиков в Розтоках у Праги

Выводы

Определялось содержание анеурина, биотина, пантотената кальция фолевой кислоты, никотинамида и рибофлавина в четырех пробах кукурузного экстракта тестами при помощи лактобацилл: *Lactobacillus arabinosus* CN 1326 для определения пантотената кальция, *Lactobacillus fermenti* CN 1325 для определения анеурина, *Lactobacillus casei* CN 1357 для определения биотина, фолевой кислоты, никотинамида и рибофлавина.

Было найдено, что наивысшее количество Б-комплекса содержит замочная вода с кукурузы, которая была упарена при низкой температуре под вакуумом: анеурина 51,2, биотина 0,6, пантотената кальция 47,5, фолевой кислоты 0,78, никотинамида 58 и рибофлавина 3,2 $\mu\text{г}/\text{г}$., при пересчете на сухое вещество кукурузного экстракта. Количество витамина Б-комплекса в остальных трех пробах замочной воды, которые были упарены при применении обычной техники, было следующее: анеурина 41—49, биотина 0,34—0,38, кальция пантотената 14,5—21,5, фолевой кислоты 0,26—0,6, никотинамида 32—40 а рибофлавина 3,9—4,7 $\mu\text{г}/\text{г}$. при пересчете на сухое вещество.

Поступило в редакцию 24. 2. 1956 г.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER VITAMINE DES VITAMIN-B-KOMPLEXES IN VIER MUSTERN VON MAISEXTRAKTEN MITTELS MIKROBENTESTEN

EDUARD BĚLÍK

Forschungsinstitut für Antibiotika in Roztoky bei Prag

Zusammenfassung

In vier Mustern von Maisextrakten wurde der Gehalt an Aneurin, Biotin, Ca-Pantothemat, Folsäure, Nicotinsäureamid und Riboflavin mittels mikrobieller Teste unter Verwendung von Laktobazillen bestimmt: *Lactobacillus arabinosus* CN 1326 zur Bestimmung von Ca-Pantothemat, *Lactobacillus fermenti* CN 1325 zur Bestimmung von Aneurin, *Lactobacillus casei* CN 1357 zur Bestimmung von Biotin, Folsäure, Nicotinsäureamid und Riboflavin.

Es wurde festgestellt, dass die höchste Menge an Vitamin-B-Komplex in dem Maisleinweichwasser enthalten ist, welches bei niedriger Temperatur im Vakuum eingedickt wurde, u. zw.: Aneurin 51,2, Biotin 0,6, Ca-Pantothemat 47,5, Folsäure 0,78, Nicotinsäureamid 58 und Riboflavin 3,2 γ/g Trockensubstanz des Maisextrakts. Die Menge an Vitamin-B-Komplex in den verbleibenden drei Mustern Maisleinweichwassers, welche nach der üblichen Erzeugungstechnik abgedampft wurden, ist folgende: Aneurin 41—49, Biotin 0,34—0,38, Ca-Pantothemat 14,5—21,5, Folsäure 0,26—0,6, Nicotinsäureamid 32—40 und Riboflavin 3,9—4,7 γ/g Trockensubstanz des Maisextrakts.

In die Redaktion eingelangt den 24. 2. 1956

LITERATURA

1. Kleinzeller A., Künstlingerová M., Chem. Listy 45, 268 (1951).
2. Künstlingerová M., Bělík E., Chem. Listy 46, 117 (1952).
3. Bělík E., Čsl. Biol. 2, 4 (1953).
4. Shorb M. S., Briggs G. M., J. biol. Chem. 176, 1463 (1948).

Došlo do redakcie 24. 2. 1956