

BIOSYNTÉZA VITAMÍNU B₁₂ SO ZAMERANÍM NA VÝROBU KŔMNYCH KONCENTRÁTOV

E. BUNTOVÁ, A. PEŠTUKOVÁ, E. CZAFIKOVÁ

Ústredný výskumný ústav potravinárskeho priemyslu, pobočka v Bratislave

Okrem vitamínov A i D najväčší význam vo výžive hospodárskych zvierat má vitamín B₁₂ [1]. Podľa doterajšieho stavu bádania sa v rastlinných krmovinách vyskytuje iba v stopových množstvách [2]. Pre náhradu živočíšnych bielkovín nutrične menej hodnotnými rastlinnými bielkovinami stačí koncentrácia 20 mg vitamínu B₁₂ na tonu krmiva, aby sa dosiahli významné prírastky na váhe [3].

Veľkým pokrokom bol objav nutričného činiteľa, tzv. „animal protein“ faktora (APF), t. j. živočíšneho bielkovinového faktora, nepostrádateľného pre dobrý vývoj mladého organizmu. Jeho hlavnou súčasťou je práve vitamín B₁₂ okrem iných rastových látok, doteraz bližšie neidentifikovaných, ako aj prekurzorov [2].

Vitamín B₁₂ ako najaktívnejší biologický faktor sa uplatňuje najmä pri obohacovaní krmív pre zvieratá s krátkym tráviacim traktom, pri chove ošipáných (odstavčiat) a hrabavej hydiny. Preparáty vitamínu B₁₂ nevyžadujú prežúvavce (hovädzí dobytok, ovce), ktoré si ho syntetizujú vlastnou mikroflórou bachora.

Vysoká biologická účinnosť vitamínu B₁₂ je podmienená jeho špecifickou funkciou v intermediárnom metabolizme. Participuje na biosyntéze proteínov, na metabolických reakciách syntézy metylskupín, purínových a pyrimidínových báz, nukleových kyselín, sulfhydrylových skupín, pri sacharidovom a tukovom metabolizme [4, 5].

Táto dôležitosť vitamínu B₁₂ podmienila vývoj, ktorý viedol k priemyselnej výrobe technického vitamínu B₁₂.

Biosyntézu vitamínu B₁₂ mikroorganizmami objavil E. L. Rickes a spolupracovníci r. 1948 [6]. Od tohto času sa jeho produkcia technologicky ustavične zdokonaľuje submerznou kultiváciou za aeróbných i anaeróbných podmienok. Používajú sa najmä druhy rodu *Bacterium*, *Bacillus* a *Streptomyces*.

Pre biosyntézu vitamínu B₁₂ v priemyselnom rozsahu sa využívajú produkčné kmene, zaručujúce maximálne výťažky tohto vitamínu. Najmä *Actinomyces olivaceus* [7—10] a *Propionibacterium shermanii* [11, 12] sa úspešne aplikujú vo veľkovýrobe. Tieto kmene sa v podobe vysušenej biomasy používajú ako vitamínový doplnok, pridávaný do krmiva.

Výroba biologicky účinného a netoxického preparátu vitamínu B₁₂ ako vhodného doplnku živočíšnych krmovín spočíva v zahutnení fermentačnej tekutiny po fermentácii *Actinomyces olivaceus*. Potom nasleduje vysušenie bez

predchádzajúcich separačných procesov vlastného vitamínu. Pri použití *Propionibacterium shermanii* sa vitamín B₁₂ získava vysušením odcentrifugovanej biomasy.

V našej práci sa zaoberáme prípravou sušeného koncentráту vitamínu B₁₂. Pri sledovaní dynamiky procesu biosyntézy vitamínu B₁₂ produkčnými kmeňmi *Actinomyces olivaceus* a *Propionibacterium shermanii* sme sa zamerali na využitie rozličných odpadov kvasného priemyslu ako kultivačného média. Sú to najmä výpalky prístupné v dostatočnom množstve, ktoré možno po doplnení niektorými živinami úspešne použiť pre mikrobiálnu fermentáciu. Na produkciu vitamínu B₁₂ sme použili jednak výpalky melasové, zemiakové, pšeničné, jednak výpalky po výrobe biologicky aktívneho droždia (melasa—maltóza) [13]. Vysušením a zomletím biomasy producentov vitamínu B₁₂ sa získa vhodný krmný prípravok v práškovej forme.

Experimentálna časť

Prenesením kľučky spór z vysporulovanej kultúry produkčného kmeňa *Actinomyces olivaceus* zo zemiakového agaru [14] sme pripravili vegetatívne inokulum ako 48—72 hodinovú trepačkovú kultúru. Fermentačný substrát sme upravili tak, aby pomer celkového dusíka ku glycidom bol asi 1 : 10 [15]. Fermentácia prebiehala pri 28—30 °C na reciprokej trepačke v 750 ml bankách so 150 ml plnením alebo v dvojlitrových sklenených fermentoroch s 1500 ml plnením substrátu za nepretržitého miešania a prevzdušňovania. Pre produkciu väčšieho množstva biomasy sme použili 130 litrový fermentor s 50 litrovým plnením takisto za stáleho miešania a prevzdušňovania.

Produkčný kmeň *Propionibacterium shermanii* sme viedli začínajúc skúmvkovou uchovávacou kultúrou cez inokulum až po fermentáciu podľa V. G. Makareviča [16] v malej úprave fermentačného substrátu za prídavku výpalkov. V 250 ml bankách sme fermentovali 150 ml objemy alebo v 500 ml bankách 400 ml objemy za anaeróbných podmienok pri 28—30 °C. V pravidelných časových intervaloch sme upravovali pH a pridávali glukózu do maximálnej koncentrácie 1 %.

Inokulačné i fermentačné substráty (okrem substrátu pre tank, ktorý sa jednorazovým prevarením zbavil vegetatívnych foriem mikroorganizmov) sme sterilizovali v pare po dobu 30 minút 3 dni za sebou. Po sterilizácii sa pH vo všetkých pokusoch upravilo na hodnotu 7,0—7,2.

Ako zdroj uhlíka sa do výpalkov pridávala glukóza.

Pre zvýšenie produkcie sme použili prekurzor chlorid kobaltnatý v množstve 0,5—1 mg %. Pri použití produkčného kmeňa *Propionibacterium shermanii* pridával sa ešte v stopových množstvách 5,6-dimetylbenzimidazol.

Počas fermentácie sme v pravidelných časových intervaloch sledovali potrebné analytické údaje:

Vitamín B₁₂ po spracovaní fermentačnej tekutiny s kyanidom draselným [17, 18] sme stanovovali mikrobiologicky platňovou titráciou za použitia testovacieho organizmu *Escherichia coli* M 113—3. Pri výbere najvhodnejšej metodiky na stanovenie a vyhodnotenie údajov koncentrácie vitamínu B₁₂ sme v niektorých fázach fermentácie zistili látky, ktoré pôsobia inhibične na rast testovacieho organizmu. Po preverení testovacích organizmov *Escherichia coli* M-200 a M 113-3, testovacích pôd podľa S. M. Čajkovskej

a E. Harrisonovej, ako aj výpočtov podľa V. Schuha [19], S. Rosypala [20] a J. Černej [21] sme vybrali taký spôsob vyhodnotenia, pri ktorom sa eliminuje vplyv inhibičných látok a ktorý možno použiť na rozbery fermentačných tekutín. Najlepšie sa nám osvedčil [22] postup podľa E. Harrisonovej [23], avšak za použitia testovacej pôdy spôsob podľa S. M. Čajkovskej [24]. Táto pôda je totiž menej náročná na pridávané ingrediencie. Obsah vitamínu B₁₂ sme vyhodnocovali matematickým postupom podľa J. Černej [21].

Sušinu mycélia sme stanovovali vázkove [25]. Prefiltrované mycélium sme okrem destilovanej vody premývali zriedenou kyselinou solnou, aby sme vylúčili prítomný uhlíčan vápenatý.

Úbytok cukrov sme určovali podľa Bertranda a vyjadrili ako percento glukózy [26]. Kvalitatívne zastúpenie cukrov, ako aj prítomné aminokyseliny vo fermentujúcich tekutinách sme sledovali chromatograficky [27].

Sfermentovanú tekutinu *Actinomyces olivaceus* o konečnej sušine 3,5 % sme infra-lampami sušili v tenkých vrstvách po zahustení v cirkulačnej odparke na ca 35 % sušinu v rozprašovacej sušiarňi. Menšie kvantá odcentrifugovanej biomasy *Propionibacterium shermanii* sme sušili v laboratórnej sušiarňi.

Výsledky a diskusia

Pretože produkčné kmene vyžadujú prítomnosť organického dusíka, sledovali sme i aminokyseliny fermentačných výpalkových substrátov (tab. 1).

Tabuľka 1

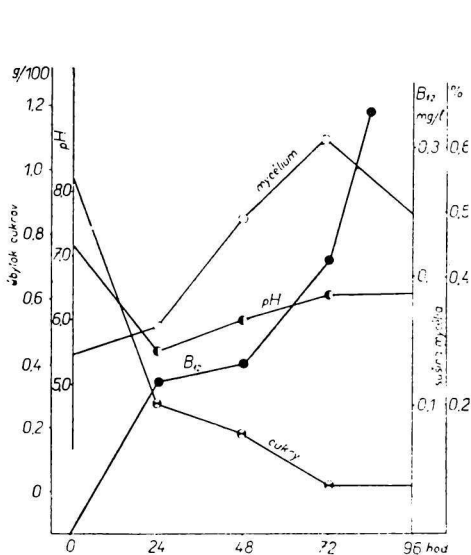
Výpalky		melasové	zemiakové	pšeničné	VBAD**
Aminokyseliny	Asp	+	+	+	+
	Glu	+	+	+	+
	CySH	+	+	+	+
	Ser + Gly	+	+	+	+
	Thr	+	+	+	—
	Ala	+	+	+	+
	Pro	+	+	+	+
	Tyr	+	+	+	+
	γ -NH ₂ -más.	+	+	+	+
	Val + Met	+	+	+	+
	Phe	+	+	—	—
	Ieu + <i>l</i> -Ieu	+	+	+	+
	Asp-NH ₂	—	+	—	—
	Lys	+	+	+	+
	His	+	+	+	—
Arg	+	+	+	+	

** Po výrobe biologicky aktívneho droždia.

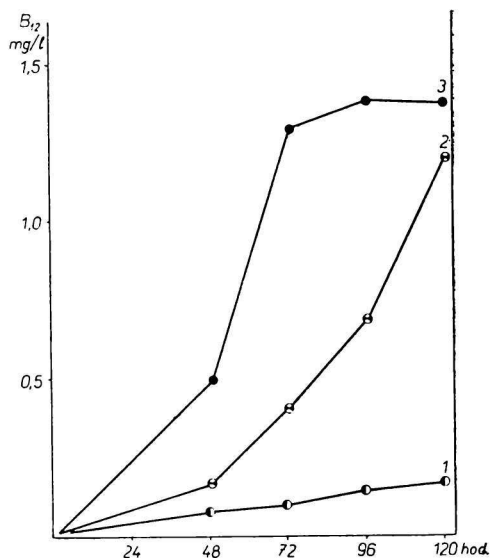
Chromatograficky sme zistili 16 aminokyselín (zemiakové výpalky). V kvalitatívnom zastúpení sa jednotlivé výpalky navzájom veľmi nelíšili. V priebehu fermentácie sa väčšina aminokyselín metabolizovala [28].

Pre naše fermentačné pokusy, ako sme už uviedli, použili sme produkčné kmene *Actinomyces olivaceus* a *Propionibacterium shermanii*, u ktorých je ďalšie spracovanie sfermentovanej tekutiny najekonomickejšie pre pomerne prijateľné výťažky vitamínu B₁₂.

Graf 1 znázorňuje dynamiku produkcie vitamínu B₁₂, skvasovania cukrov, tvorby mycélia a zmien pH počas fermentácie kultúrou *Actinomyces olivaceus* na pšeničných výpalkoch v hliníkovom tanku za prevzdušňovania (ca 4 litre za jednu minútu) a miešania (250 ot./min.). Tieto údaje sú totožné s hodnota-



Graf 1. Priebeh fermentácie vitamínu B₁₂ kmeňom *Actinomyces olivaceus* v tanku (130 l) za použitia pšeničných výpalkov.



Graf 2. Priebeh fermentácie vitamínu B₁₂ kmeňom *Propionibacterium shermanii*.

Krivka 1 — fermentačný substrát výpalkový, krivka 2 — fermentačný substrát výpalkový, obohatený corn-steepom (1 : 1), krivka 3 — fermentačný substrát výpalkový, obohatený corn-steepom a zemiakovou plodovou vodou (1 : 0,5 : 0,5).

mi ostatných fermentácií v pokusoch vykonaných v malých objemoch za upotrebenia už uvedených druhov výpalkov, ako aj výpalkov obohatených ďalším proteínovým alebo glycidovým materiálom.

Biosyntéza vitamínu B₁₂ kultúrou *Propionibacterium shermanii* (graf 2) sa v podstate vyznačuje iným priebehom. Z fermentácie na neprizivených výpal-

koch po výrobe biologicky aktívneho droždia rezultujú nízke výťažky vitamínu B₁₂. Avšak po obohatení týchto výpalkov corn-steepom a zemiakovou plodovou vodou sa obsah vitamínu B₁₂ zvýšil 5—7 násobne.

Na koncentráciu vitamínu B₁₂ vo vyfermentovanej a vysušenej biomase vplývajú rozličné faktory najmä pri zahusťovaní a sušení, ako je napríklad teplota, konštrukčný materiál, pH a skladovanie.

Tabuľka 2

Biomasa kultúry	Koncentrácia B ₁₂ * mcg/g	Literatúra
APF	0,02	K. R. Dietrich [3]
<i>Propionibacterium shermanii</i>	300—350	SSSR [29]
<i>Propionibacterium shermanii</i>	80—300	vlastné pokusy
<i>Bacillus megaterium</i>	20—30	K. R. Dietrich [30]
<i>Streptomyces olivaceus</i> NRRL-B-1125	30	K. R. Dietrich [3]
<i>Streptomyces olivaceus</i> NRRL-B-1125	30	H. H. Hall [9]
<i>Streptomyces olivaceus</i> NRRL-B-1125	35—39 (až 200)	V. F. Pfeifer [8]
<i>Streptomyces olivaceus</i> NRRL-B-1125	20—60	A. S. Hester [7]
<i>Actinomyces olivaceus</i> (bližšie neoznačený)	1—5 (v kombinovaných koncentrátoch)	vlastné pokusy

* Uvedené hodnoty koncentrácie vitamínu B₁₂ treba posudzovať relatívne, keďže ako sme zistili [22], závisia od testovacej techniky (testovací organizmus, testovacia pôda, vlastný výpočet koncentrácie).

V tab. 2 porovnáваме zistené hodnoty koncentrácie vitamínu B₁₂ v 1 g vysušeného vitamínového koncentrátu vlastnej produkcie s údajmi v literatúre.

Hoci najprirodzenejšími zdrojmi vitamínu B₁₂ sú živočíšne bielkoviny, doplnkovými zdrojmi v modernej výžive však zostávajú koncentráty vitamínu B₁₂, vyrobené mikrobiálnou cestou. Táto perspektíva je najekonomickejšia, lebo získanie vitamínu B₁₂ je technologicky únosné a vyrobený vitamín B₁₂ je fyziologicky účinný. Získavanie vitamínu B₁₂ hnilobnými procesmi splaškov mestských čistiacich staníc, resp. zo zvyškov fermentovaných obsahov bacho-

ров прежýвaвцов je колísавéго обсаху а взникаjú факторы витаминó В₁₂ колísавéй ýчинности пре хумáнную а ветерина́рну аплика́цию, алебо вóбeц неýчinné.

Тáто прáца je чáстóу výскумнеј úлоhy „Výскум biochemických концентратóв з odpадóв кваснéго приемыслý“, на рiшéнии кторей са окрем úведенýх авторóв зýчáстникi Š. Barica, M. Čunderlíková, M. Grodovský, P. Hanula, M. Tibenská.

Сýхрн

Opisyje sa прiпрáва концентратóу витаминó В₁₂ пре крмне úчeлы. Fermentačнá текyтина по ферментácii кyльтýроу *Actinomyces olivaceus*, по окыслeнии а стабилизácii витаминó сирiчитаном соднýм са захyстила а высyшила. Зiсканý высyшенý прiправок обсаховал в 1 г 1—5 мeг витаминó В₁₂ в зáвислости од спóсoбу сyшения а мнoжства приданýх сýчáстi (квасничнá биомаса, млáто).

Биомаса *Propionibacterium shermanii* по одцентрифyговани а высyшeнии выказовала в 1 г подстатне вышшю концентрácii витаминó В₁₂ (80—300 мeг), подлá спóсoбу ферментации а подмиенок сyшения.

Fermentačнýми покyсми са зистила мoжность прoдукции витаминó В₁₂ на субстрáтох odpадáвajúчих з потрaвинáрскеј výрoбы, најмá на výпalkoч по výрoбе дрoждia. Jedнoтливé дpyхы výпalkoч неoпвлывнили биосынтéзу витаминó В₁₂ кмeнóм *Actinomyces olivaceus* ани зá прiсáды дáлшeго прoтeинóвeго алебо глицидóвeго здрoя нaтoлкo, абы са тo прeявилo рáдóвýм звышeниé обсаху витаминó. При покyтити кмeнá *Propionibacterium shermanii* са спoмeнутýми прiсáдами звышила прoдукция 5—7 нáсoбнe.

БИОСИНТЕЗ ВИТАМИНА В₁₂ В ОТНОШЕНИИ ПРОИЗВОДСТВА КОРМОВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ

Э. БУНТОВА, А. ПЕШТУКОВА, Э. ЦАФИКОВА

Центральный исследовательский институт пищевой промышленности
в Братиславе

В работе описывается приготовление концентратов витамина В₁₂ для кормовых целей. Ферментационная жидкость по ферментации культурой *Actinomyces olivaceus*, по окислению и стабилизации витамина сернистокислым натрием была загущена и высyшена. Полученный высyшенный препарат содержал в 1 гр. от 1 до 5 мг. витаминó В₁₂ в зависимости от способа сyшения и количества приданных составных частей (дрoжжевая биомасса, жмыхи).

Биомасса *Propionibacterium shermanii* по центрифyгировани и высyшивани показала в 1 гр. значительно высшю концентрацию витаминó В₁₂ а тo от 80 до 300 мг., в зависимости на спoсoбе ферментации и условий высyшивания.

Fermentaционными опытами мы установили возможность прoдукции витаминó В₁₂: на субстрáтах, которые являются отходами пищевой промышленности, главным образом на барде дрoждей. Различные сорта барды не имели влияния на биосынтeзу витаминó В₁₂ штаммом *Actinomyces olivaceus* даже при придаче дáлшeго прoтeинóвoго или глици-

догово источника так, чтобы это проявилось порядковым увеличением содержания витамина. При применении штамма *Propionibacterium shermanii* упомянутыми веществами продукция увеличилась в 5—7 раз.

Поступило в редакцию 15. 4. 1961 г.

BIOSYNTHESE DES VITAMINS B₁₂ IN RICHTUNG DER ERZEUGUNG VON KONZENTRATEN FÜR MASTZWECKE

E. BUNTOVÁ, A. PEŠTUKOVÁ, E. CZAFÍKOVÁ

Zentrales Forschungsinstitut für die Nahrungsmittelindustrie in Bratislava

In der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung eines Vitamin B₁₂-Konzentrates für Mastzwecke beschrieben. Die Fermentationsflüssigkeit wird nach der Fermentation mittels einer Kultur von *Actinomyces olivaceus*, nach dem Ansäuern und der Stabilisierung des Vitamins mit Natriumsulfit, eingedickt und getrocknet. Das erhaltene Trockenpräparat enthielt in 1 g eine Menge von 1 bis 5 mcg Vitamin B₁₂, in Abhängigkeit vom Trocknungsverfahren und der Menge der zugesetzten Bestandteile (Hefe-Biomasse, Treber).

Die Biomasse *Propionibacterium shermanii* wies nach dem Abschleudern und Trocknen in 1 g eine wesentlich höhere Konzentration an Vitamin B₁₂ auf — 80 bis 300 mcg, u. zw. je nach der Art der Fermentation und den Trocknungsbedingungen.

Durch Fermentationsversuche haben die Autoren die Möglichkeit einer Vitamin B₁₂-Produktion auf Substraten festgestellt, die aus der Nahrungsmittelerzeugung abfallen, hauptsächlich auf Schlempe nach der Hefeferzeugung. Die einzelnen Schlempearten beeinflussten die Biosynthese des Vitamins B₁₂ durch den Stamm *Actinomyces olivaceus* auch durch einen Zusatz einer weiteren Protein- oder Glycidquelle nicht derartig, dass dies durch eine stellenmässige Erhöhung des Vitamingehalts zum Ausdruck gelangt wäre. Bei Verwendung des Stamms *Propionibacterium shermanii* mit den erwähnten Zusätzen erhöhte sich die Produktion um das 5—7-fache.

In die Redaktion eingelangt den 15. 4. 1961

LITERATÚRA

1. Nikolajev R. P., Zacharova M. P., Romanova A. F., *Novyje preparaty vitaminov A, D i B₁₂ dla kormovyh celej*, Trudy VI, Vitaminy 1959. — 2. Müller Z., *Vitaminy v živočišnej výrobe*, Bratislava 1960. — 3. Dietrich K. R., *Die biosynthetische Erzeugung von Vitamin B₁₂*, Chem. Ztg. 80, 4 (1956). — 4. Arnstein H. R. V., *The Metabolic Function of Vitamin B₁₂*, IV. International Congress of Biochemistry, Vienna 1958. — 5. Connor Johnson B., *Studies on the Function of Vitamin B₁₂*, III. medzinárodné sympóziium o vitamínoch, Poznaň 1959. — 6. Rickes E. L. a spolupracovníci, *Science* 108, 634 (1948). — 7. Hester A. S., Ward G. E., *Ind. Eng. Chem.* 46, 2 (1954). — 8. Pfeifer V. E., Vojnovich C., Heger E. N., *Ind. Eng. Chem.* 46, 5 (1954). — 9. Hall H. H., Benedict R. G., Wiesen C. F. a spolupracovníci, *Appl. Microbiol.* 1, 124 (1953). — 10. Borensztajn D., *Badania nad witamina B₁₂*, Warszawa 1956.
11. Makarevič V. G., Laznikova T. N., *Voprosy med. chim.*, 2 (1957). — 12. Gončarova V. J., Belova Z. N., Budnickaja P. Z. a spolupracovníci, *Mikrobiologija* 27, 2 (1958). — 13. Stuchlík V., *Výskum výroby biologicky aktívneho droždíá*, Záverečná zpráva VÚPRV, Bratislava 1960. — 14. Krasilnikov N. A., *Aktinomycety, antagonisté*

- a antibiotické látky*, Praha 1953. — 15. Riedel K. U., Drews B., Die Branntweinwirtschaft 8, 195 (1959). — 16. Makarevič V. G., Verchovčeva T. N., Laznikova T. N., Mikrobiologija 27, 1 (1958). — 17. Bukin V. N., Areškina L. G., Kuceva L. S., Biochim. 19, 6 (1954). — 18. Wijmenga H. G. a spolupracovníci, Biochim. Biophys. Acta 6, 229 (1950). — 19. Schuh V., *Dizertačná práca*, Biologický ústav ČSAV, Praha 1952. — 20. Rosypal S., *Práce Brněnské základny Čs. akademie věd*, 1958. — 21. Černá J., Čs. farm. 8, 376 (1959). — 22. Buntová E., Chem. zvesti 15, 346 (1961). — 23. Harrison E. a spolupracovníci, Analyst 76, 696 (1951). — 24. Čajkovskaja S. M., Družinina E. N., Mikrobiologija 26, 5 (1957). — 25. Musílek V., Čs. mikrobiologie 2, 5 (1957). — 26. Grégr V., *Návody k praktickým cvičením z kvasné technologie*, Praha 1958. — 27. Hais I. M., Macek K. a spolupracovníci, *Papírová chromatografie*, Praha 1959. — 28. Tibenská M., *připravené na uverejnenie*. — 29. Súkromné oznámenie. — 30. Dietrich K. R., Die Branntweinwirtschaft 79, 10 (1957).

Do redakcie došlo 15. 4. 1961

Adresa autorov:

*Inž. Ema Buntová, Alena Peštuková, Eva Czafiková, Bratislava, Miletičova 14/b,
Ústredný výskumný ústav potravinárskeho priemyslu.*