

VPLYV INHIBIČNÝCH LÁTOK NA STANOVENIE VITAMÍNU B₁₂

EMA BUNTOVÁ

Ústredný výskumný ústav potravinárskeho priemyslu v Bratislave

Pre kvantitatívne stanovenie vitamínu B₁₂ (5,6-dimetylbenzimidazol-kyanokobalamín, resp. kobalamíny, podľa názvoslovnej komisie IUPAC pre skupinové označenie látok s účinkom vitamínu B₁₂) najlepšie vyhovuje mikrobiologická technika [1]. Fyzikálno-chemické metódy možno použiť pri stanovení dostatočne koncentrovaných a čistých preparátov, pretože zachycujú síce príbuzné, avšak biologicky neúčinné látky [2]. Mikrobiologické metódy stanovenia účinných látok, keďže sa pracuje s premenlivým faktorom — testovacím organizmom — vykazujú oproti chemickým metódam väčší rozptyl. Pri pôvodných metodikách bola chyba stanovenia $\pm 30\%$; dnes za presného dodržania všetkých podmienok možno ju znížiť až na 6% , najmä pri použití štatistického vyhodnocovania.

Princíp mikrobiologického stanovenia vitamínu B₁₂ spočíva v jeho pôsobení ako rastového faktora na niektoré mikroorganizmy. Tento rast, úmerný pridanej koncentrácii vitamínu, môže sa určiť turbidimetricky [3, 4], potencio-metricky [5], titrimetricky [4] a platňovou metódou.

Pri platňovej metóde je veľkosť rastovej zóny za konštantných podmienok úmerná logaritmu koncentrácie vyšetrovanej vzorky. Vyčíslenie obsahu vitamínu B₁₂ samotnou grafickou analýzou už dnes nepostačuje. Výsledky mikrobiologickej titrácie sa spracujú matematicko-štatisticky, pričom sa porovnávajú rastové zóny štandardu a vzorky. Metódu pôvodne vypracovanú pre titráciu antibiotík aplikovala na vitamín B₁₂ E. Harrisonová [6]. U nás túto metódu prepracovali V. Schuh [7] a S. Rosypal [8]. Vyhodnotenie aktivity vitamínu B₁₂ podľa týchto autorov je podmienené paralelným priebehom rastovej priamky vzorky a štandardu. Ak však analyzovaná vzorka obsahuje látky, inhibujúce rast testovacieho organizmu, mení sa sklon rastovej priamky vzorky a štandardu. Preto J. Černá [9] navrhuje spôsob vyhodnocovania za použitia metódy štandardného prídavku.

V súčasnej dobe je najrozšírejšia a podľa údajov literatúry [5—8, 12, 13] najosvedčenejšia platňová metóda za použitia testovacieho organizmu *Escherichia coli*. Jej prednosti čo do jednoduchosti, nenáročnosti na špeciálnu aparatúru, rýchlosti uskutočnenia a možnosti stanovenia vitamínu B₁₂ i v nesterilných vzorkách dokázal D. Borensztajn na 10 000 stanoveniach [5].

V predloženej práci uvádzame difúznou metódou platňovou titráciou porovnávacie štúdie vyčíslenia koncentrácie vitamínu B₁₂ podľa V. Schuha [7], S. Rosypala [8] a J. Černej [9] v závislosti od použitia testovacích organizmov *Escherichia coli* M-200 a *Escherichia coli* M-113-3 a testovacích

pôd podľa S. M. Čajkovskej [14] a E. Harrisonovej [6], náročnejšej na ingrediencie.

K uvedenému rozboru sme prišli na základe našich fermentačných pokusov na produkciu vitamínu B₁₂ kmeňom *Actinomyces olivaceus* na výpalkových fermentačných substrátoch. Stretli sme sa s javom, že v určitých časových úsekoch fermentácie vznikajú v metabolických produktoch uvedeného kmeňa látky inhibujúce pôsobiace na rast testovacieho organizmu. Toto sa v značných odchyľkách prejavilo pri vyčistení koncentrácie vitamínu B₁₂ uvedenými metódami, ako aj pri samotnom hodnotení rastových zón vzoriek, vzoriek so štandardným prídavkom vitamínu B₁₂ a štandardov vitamínu B₁₂ v pokusoch niekoľkokrát opakovaných rôznymi kombináciami testovacích pôd a testovacích organizmov.

Experimentálna časť

Celý pracovný postup od uchovávanía testovacích organizmov, prípravy inokula a testovacích platní sa robil podľa E. Harrisonovej [6].

Ako štandard vitamínu B₁₂ sme použili preparát v ampulkách s obsahom 1000 mcg/ml značky Richter. Potrebné titračné roztoky sme pripravili jeho rozriedením v destilovanej vode o pH 6,5. Pracovali sme s týmito koncentraciami vitamínu B₁₂: 0,01; 0,1; 0,15; 0,2 a 0,25 mcg/ml. Je to oblasť tých koncentrácií vitamínu B₁₂, pri ktorých je v našich pokusoch paralelna priamka vzorky a štandardu najzrejmejšia a na ktorú sme potom upravovali všetky ďalšie vzorky fermentačných tekutín.

Tieto koncentrácie vitamínu B₁₂ sme pripravili aj vo výpalkových substrátoch. Použili sme pšeničné výpalky a výpalky po výrobe biologicky aktívneho droždia [10], označené v tabuľkách ako VBAD. Po päťdňovej fermentácii vitamínu B₁₂ kmeňom *Actinomyces olivaceus* sme v sfermentovaných výpalkoch prítomný vitamín B₁₂ podrobili alkalickéj deštrukcii [5, 11, 17]. Presvedčením sa o negatívnej prítomnosti vitamínu B₁₂ upravili sme pH na 6,5 a použili na rozriedenie vitamínu B₁₂ na vyššie uvedené koncentrácie. Každú jednotlivú takto upravenú vzorku štandardov vitamínu B₁₂ v destilovanej vode, v pšeničných výpalkoch a vo výpalkoch po výrobe biologicky aktívneho droždia sme v ôsmich paralelných pokusoch titrovali na Petriho miske o priemere 10 cm s rovným dnom so stuhnutou testovacou pôdou s vyhlbenými otvormi podľa Harrisonovej a podľa Čajkovskej paralelne s obidvoma testovacími organizmami. Po dvadťohodinovej inkubácii pri 30 °C sme zmerali rastové exhibičné zóny nóniovým meradlom a obsah vitamínu B₁₂ sme vyhodnotili podľa Schuha, Rosypala a Černej.

Pre úplnosť uvádzame, že na testovanie vitamínu B₁₂ možno namiesto Petriho misiek použiť veľké sklené platne v kovovom ráme, ako to navrhuje J. Černá [18]. My sme však od tohto upustili pre nerovnakú hrúbku agarovej vrstvy.

Uvedenými tromi metódami vyhodnotený obsah vitamínu B₁₂ v metabolických výpalkových produktoch *Actinomyces olivaceus* po alkalickéj deštrukcii vitamínu B₁₂ s presne dózovanou koncentraciou vitamínu B₁₂ v závislosti od testovacej pôdy a testovacích organizmov je uvedený v tab. 1 až 4. V tab. 5 až 8 sú podľa jednotlivých autorov uvedené odchyľky v percentách od skutočne pridaného štandardu vitamínu B₁₂ v destilovanej vode i v pšeničných výpalkoch a vo výpalkoch po výrobe biologicky aktívneho droždia a štatisticky sú zhodnotené [15, 16].

Na obr. 1 a 2 sú zachytené na testovacích pôdach podľa Čajkovskej a Harrisonovej rastové zóny s testovacími mutantmi *Escherichia coli* M-113-3 a *Escherichia coli* M-200.

Tabuľka 1
 Koncentrácia vitamínu B₁₂ na Harrisonovej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli* M-200

Vitamín B ₁₂ mcg/ml	Štandardy vitamínu B ₁₂ v destilovanej vode			Štandardy vitamínu B ₁₂ v pšeničných výpalkoch			Štandardy vitamínu B ₁₂ vo výpalkoch po VBAD		
	Zistený obsah vitamínu B ₁₂ podľa:								
	Schuha	Rosypala	Černej	Schuha	Rosypala	Černej	Schuha	Rosypala	Černej
0,01	0,0112 ± 0,0005	0,0113 ± 0,0004	0,0097 ± 0,0005	0,0118 ± 0,00	0,0172 ± 0,0004	0,00895 ± 0,00004	0,0115 ± 0,0042	0,0154 ± 0,0025	0,0096 ± 0,0007
0,1	0,0837 ± 0,0026	0,1025 ± 0,0034	0,1035 ± 0,0053	0,0608 ± 0,0001	0,0846 ± 0,003	0,0948 ± 0,0044	0,0595 ± 0,0009	0,0634 ± 0,0029	0,0868 ± 0,0046
0,15	0,1334 ± 0,0029	0,1470 ± 0,0048	0,1502 ± 0,0080	0,0993 ± 0,0021	0,1383 ± 0,0075	0,1334 ± 0,0053	0,1348 ± 0,0098	0,1628 ± 0,0112	0,1382 ± 0,0129
0,2	0,2068 ± 0,0048	0,2027 ± 0,0067	0,1945 ± 0,0098	0,1662 ± 0,0036	0,1763 ± 0,0091	0,1892 ± 0,0074	0,1583 ± 0,0018	0,1881 ± 0,0012	0,1700 ± 0,0072
0,25	0,2594 ± 0,0056	0,2575 ± 0,0084	0,2567 ± 0,0138	0,1644 ± 0,0033	0,2151 ± 0,0048	0,2270 ± 0,0048	0,2426 ± 0,0026	0,2243 ± 0,0155	0,2058 ± 0,0087

Tabuľka 2

Koncentrácia vitamínu B₁₂ na Harrisonovej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli* M-113-3

Vitamín B ₁₂ mcg/ml	Štandardy vitamínu B ₁₂ v destilovanej vode			Štandardy vitamínu B ₁₂ v pšeničných výpalkoch			Štandardy vitamínu B ₁₂ vo výpalkoch po VBAD		
	Zistený obsah vitamínu B ₁₂ podľa:								
	Schuha	Rosypala	Černej	Schuha	Rosypala	Černej	Schuha	Rosypala	Černej
0,01	0,0101 ± 0,0002	0,0111 ± 0,0005	0,0104 ± 0,00	0,0096 ± 0,0004	0,0118 ± 0,0005	0,0096 ± 0,0007	0,0102 ± 0,0003	0,0094 ± 0,0013	0,0085 ± 0,0005
0,1	0,0920 ± 0,0015	0,1001 ± 0,0044	0,1035 ± 0,0017	0,0782 ± 0,0005	0,0702 ± 0,0022	0,0888 ± 0,0036	0,0964 ± 0,0019	0,1028 ± 0,0033	0,0976 ± 0,0035
0,15	0,1500 ± 0,0032	0,1553 ± 0,0070	0,1575 ± 0,0006	0,1246 ± 0,0008	0,1429 ± 0,0045	0,1551 ± 0,0017	0,1602 ± 0,0036	0,1781 ± 0,0054	0,1336 ± 0,0089
0,2	0,2061 ± 0,0042	0,2158 ± 0,0095	0,2030 ± 0,0050	0,1662 ± 0,0024	0,1781 ± 0,0053	0,1898 ± 0,0038	0,2149 ± 0,0098	0,2689 ± 0,0172	0,1821 ± 0,0135
0,25	0,2469 ± 0,0075	0,2542 ± 0,0115	0,2630 ± 0,0050	0,2099 ± 0,0024	0,1987 ± 0,0064	0,2355 ± 0,0099	0,2232 ± 0,0075	0,2842 ± 0,0181	0,2242 ± 0,0148

Tabuľka 3

Koncentrácia vitamínu B₁₂ na Čajkovskej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli M-200*

Vitamín B ₁₂ mcg/ml	Štandardy vitamínu B ₁₂ v destilovanej vode			Štandardy vitamínu B ₁₂ v pšeničných výpalkoch			Štandardy vitamínu B ₁₂ vo výpalkoch po VBAD		
	Zistený obsah vitamínu B ₁₂ podľa:								
	Schuha	Rosypala	Černej	Schuha	Rosypala	Černej	Schuha	Rosypala	Černej
0,01	0,0103 ± 0,0002	0,0110 ± 0,0003	0,0105 ± 0,0004	0,0075 ± 0,0003	0,0139 ± 0,0003	0,0092 ± 0,0007	0,0111 ± 0,0005	0,0151 ± 0,0003	0,0117 ± 0,0018
0,1	0,1032 ± 0,0046	0,1107 ± 0,0037	0,0974 ± 0,0046	0,0853 ± 0,0051	0,0977 ± 0,0048	0,0949 ± 0,0025	0,0716 ± 0,0040	0,1019 ± 0,0059	0,0841 ± 0,0032
0,15	0,1569 ± 0,0046	0,1484 ± 0,0051	0,1563 ± 0,0077	0,1212 ± 0,0016	0,1684 ± 0,0080	0,1289 ± 0,0070	0,1437 ± 0,0025	0,1718 ± 0,0036	0,1252 ± 0,0084
0,2	0,2104 ± 0,0067	0,2033 ± 0,0110	0,1989 ± 0,0087	0,1601 ± 0,0046	0,1791 ± 0,0043	0,1858 ± 0,0130	0,1575 ± 0,0065	0,1829 ± 0,0087	0,1658 ± 0,0068
0,25	0,2577 ± 0,0037	0,2560 ± 0,0086	0,2467 ± 0,0058	0,2122 ± 0,0076	0,2354 ± 0,0116	0,2315 ± 0,0128	0,2097 ± 0,0081	0,2077 ± 0,0099	0,2019 ± 0,0119

Tabuľka 4

Koncentrácia vitamínu B₁₂ na Čajkovskej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli* M-113-3

Vitamín B ₁₂ mcg/ml	Štandardy vitamínu B ₁₂ v destilovanej vode			Štandardy vitamínu B ₁₂ v pšeničných výpalkoch			Štandardy vitamínu B ₁₂ vo výpalkoch po VBAD		
	Zistený obsah vitamínu B ₁₂ podľa:								
	Schuha	Rosypala	Černej	Schuha	Rosypala	Černej	Schuha	Rosypala	Černej
0,01	0,0102 ± 0,0003	0,01002 ± 0,0004	0,0102 ± 0,0003	0,0077 ± 0,0003	0,0109 ± 0,0003	0,0092 ± 0,0009	0,0093 ± 0,0008	0,0098 ± 0,0007	0,0096 ± 0,0006
0,1	0,1098 ± 0,0019	0,1063 ± 0,0047	0,1059 ± 0,0025	0,0993 ± 0,0006	0,0979 ± 0,0032	0,0918 ± 0,0035	0,1064 ± 0,0022	0,0926 ± 0,0029	0,0918 ± 0,0026
0,15	0,1494 ± 0,0065	0,1555 ± 0,0059	0,1568 ± 0,00	0,1206 ± 0,0039	0,1439 ± 0,0045	0,1363 ± 0,0045	0,1282 ± 0,0009	0,1362 ± 0,0044	0,1624 ± 0,0037
0,2	0,1936 ± 0,0020	0,2053 ± 0,0091	0,1952 ± 0,0047	0,1522 ± 0,0016	0,1791 ± 0,0056	0,1929 ± 0,0082	0,1602 ± 0,0017	0,1695 ± 0,0054	0,1880 ± 0,0183
0,25	0,2603 ± 0,0068	0,2559 ± 0,0113	0,2527 ± 0,0051	0,2375 ± 0,0047	0,2774 ± 0,0088	0,2433 ± 0,0104	0,1768 ± 0,0029	0,2356 ± 0,0075	0,2433 ± 0,0104

Tabuľka 5

Štatistické vyhodnotenie odchýlok vitamínu B₁₂ na Harrisonovej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli* M-200

Vitamín B ₁₂ mcg/ml	Z výpočtu podľa Schuha			Z výpočtu podľa Rosypala			Z výpočtu podľa Černej		
	Odchýlky vitamínu B ₁₂ v %								
	dest. voda	výp. pšeníc.	výp. VBAD	dest. voda	výp. pšeníc.	výp. VBAD	dest. voda	výp. pšeníc.	výp. VBAD
0,01	+ 12,0	+ 18,0	+ 15,0	+ 13,0	+ 72,0	+ 54,0	- 3,0	- 10,5	- 4,0
0,1	- 16,3	- 39,1	- 40,5	+ 2,5	- 15,4	- 36,6	+ 3,5	- 5,2	- 13,2
0,15	- 11,0	- 33,8	- 10,1	- 2,0	- 7,8	+ 8,5	+ 0,1	- 10,1	- 7,8
0,2	+ 3,4	- 16,9	- 20,8	+ 1,3	- 11,8	- 5,9	- 2,75	- 5,4	- 15,0
0,25	+ 3,7	- 34,0	- 2,9	+ 3,0	- 13,9	- 10,2	+ 2,6	- 9,2	- 17,6
F_r	7,4			4,9			0,2		
F_s	4,0			0,02			8,6		

Tabuľka 6

Štatistické vyhodnotenie odchýlok vitamínu B₁₂ na Harrisonovej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli* M-113-3

Vitamín B ₁₂ mcg/ml	Z výpočtu podľa Schuha			Z výpočtu podľa Rosypala			Z výpočtu podľa Černej		
	Odchýlky vitamínu B ₁₂ v %								
	dest. voda	výp. pšenič.	výp. VBAD	dest. voda	výp. pšenič.	výp. VBAD	dest. voda	výp. pšenič.	výp. VBAD
0,01	+ 1,0	— 4,0	+ 2,0	+ 11,0	+ 18,0	— 6,0	+ 4,0	— 4,0	— 15,0
0,1	— 8,0	— 21,8	— 3,6	+ 0,1	— 29,8	+ 2,8	+ 3,5	— 11,2	— 2,4
0,15	0,0	— 16,9	+ 6,8	+ 3,5	— 4,7	+ 18,4	+ 5,0	+ 3,4	— 10,8
0,2	+ 3,0	— 16,9	+ 7,4	+ 7,9	— 10,9	+ 34,4	+ 1,5	— 5,1	— 8,9
0,25	— 1,2	— 16,0	— 10,7	+ 1,6	— 20,5	+ 13,6	+ 5,2	— 5,8	— 10,3
<i>F_r</i>	2,5			0,93			0,34		
<i>F_s</i>	13,8			3,1			10,5		

Tabuľka 7

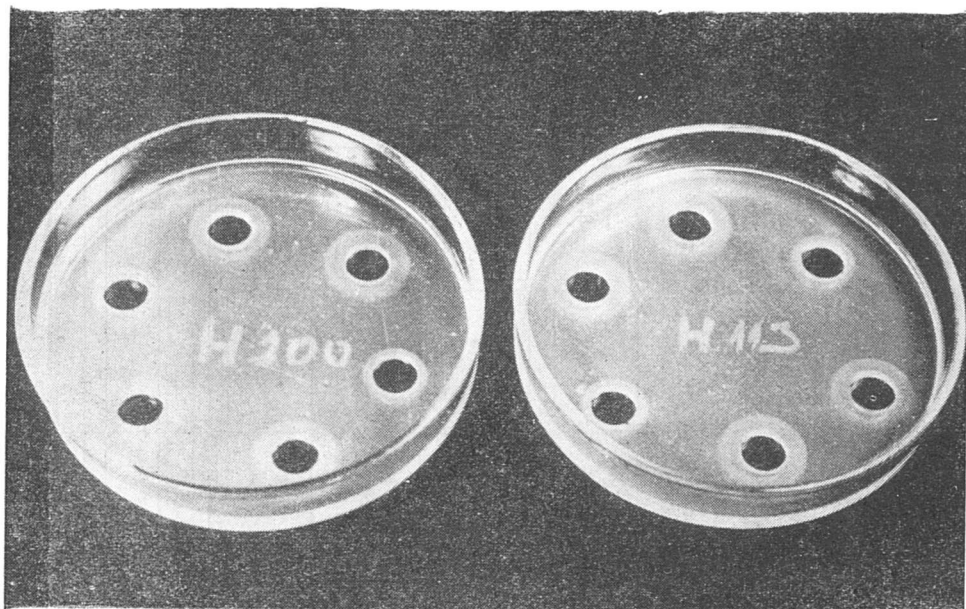
Štatistické vyhodnotenie odchýlok vitamínu B₁₂ na Čajkovskej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli* M-200

Vitamín B ₁₂ mcg/ml	Z výpočtu podľa Schuha			Z výpočtu podľa Rosypala			Z výpočtu podľa Černej		
	Odchýlky vitamínu B ₁₂ v %								
	dest. voda	výp. pšenič.	výp. VBAD	dest. voda	výp. pšenič.	výp. VBAD	dest. voda	výp. pšenič.	výp. VBAD
0,01	+ 3,0	— 24,0	+ 11,0	+ 10,0	+ 39,0	+ 51,0	+ 5,0	— 8,0	+ 17,0
0,1	+ 3,2	— 14,7	— 28,4	+ 10,7	— 2,3	+ 1,9	— 2,6	— 5,1	— 15,9
0,15	+ 4,6	— 19,2	— 4,2	— 1,0	+ 12,2	+ 14,5	+ 4,2	— 14,0	— 16,5
0,2	+ 5,2	— 19,9	— 21,2	+ 1,6	— 10,9	— 8,5	— 0,5	— 7,1	— 17,1
0,25	+ 3,0	— 15,1	— 16,1	+ 2,4	— 5,8	— 16,9	— 1,3	— 7,4	— 19,2
F_r	0,34			1,3			1,3		
F_s	6,05			0,04			2,3		

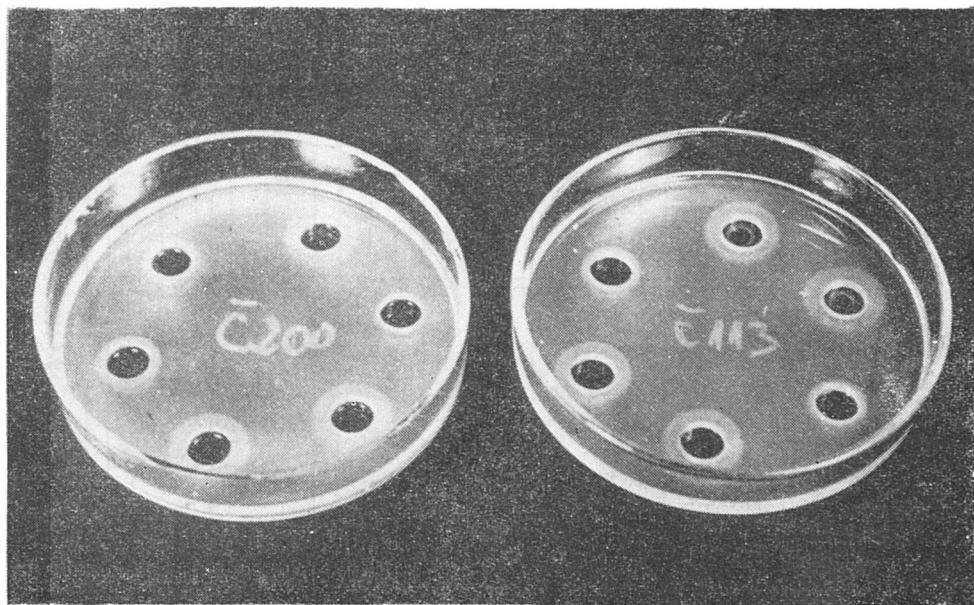
Tabuľka 8

Štatistické vyhodnotenie odchýlok vitamínu B₁₂ na Čajkovskej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli* M-113-3

Vitamín B ₁₂ mcg/ml	Z výpočtu podľa Schuha			Z výpočtu podľa Rosypala			Z výpočtu podľa Černej		
	Odchýlky vitamínu B ₁₂ v %								
	dest. voda	výp. pšenič.	výp. VBAD	dest. voda	výp. pšenič.	výp. VBAD	dest. voda	výp. pšenič.	výp. VBAD
0,01	+ 2,0	— 23,0	— 7,0	+ 0,2	+ 9,0	— 2,0	+ 2,0	— 8,0	— 4,0
0,1	+ 9,8	— 0,7	+ 6,4	+ 6,3	— 2,1	— 7,4	+ 5,9	— 8,2	— 8,2
0,15	— 0,4	— 19,6	— 14,5	+ 3,6	— 4,0	— 9,2	+ 4,5	— 9,1	+ 8,2
0,2	— 3,2	— 23,9	— 19,9	+ 2,6	— 10,4	— 15,2	— 2,4	— 3,5	— 6,0
0,25	+ 4,1	— 5,0	— 29,2	+ 2,3	+ 10,9	— 5,7	+ 1,08	— 2,2	— 2,2
F_r	2,7			1,9			0,6		
F_s	6,4			5,8			3,8		



Obr. 1. Stanovenie vitamínu B₁₂ difúznou metódou platňovou titráciou na Harrisonovej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli* M-200 (označ. H 200) a *Escherichia coli* M-113-3 (označ. H 113).



Obr. 2. Stanovenie vitamínu B₁₂ difúznou metódou platňovou titráciou na Čajkovskej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli* M-200 (označ. Č. 200) a *Escherichia coli* M-113-3 (označ. Č. 113).

Na každej Petriho miske sú vždy udané rastové zóny troch rôznych koncentrácií štandardu, rastové zóny vzorky, zóny vzorky 10 krát zriedenej a vzorky so štandardným prídavkom vitamínu B₁₂.

Diskusia

Pri štúdiu biosyntézy vitamínu B₁₂ kmeňom *Actinomyces olivaceus* vo výpalkových substrátoch sme zistili prítomnosť inhibičných látok voči testovaciemu organizmu v niektorých fázach fermentácie. Vzhľadom na túto okolnosť je pre naše pokusy vyčíslenie koncentrácie vitamínu B₁₂ v metabolických produktoch *Actinomyces olivaceus* vhodné takou metódou, ktorá eliminuje vplyv inhibítorov v prostredí a ktorú možno aplikovať na rozbory fermentačných tekutín.

V práci sú vyhodnotené koncentrácie vitamínu B₁₂ podľa Schuha, Rosypala a Černej vo fermentačných tekutinách pšeničných výpalkov a výpalkov po výrobe biologicky aktívneho droždia voči štandardom v destilovanej vode. Na testovacích pôdach podľa Harrisonovej a Čajkovskej s testovacími mutantmi *Escherichia coli M-200* a *Escherichia coli M-113-3* sa vyjadrili presnosti stanovenia (tab. 1 až 4) a štatisticky sa vyhodnotili odchýlky od pridaného štandardu vitamínu B₁₂ (tab. 5 až 8). Porovnaním hodnôt F zložitou analýzou variancie v tabuľke pri $P = 0,05$ a $N = 8$ (teoretická hodnota F_r pre varianciu medzi riadkami je 3,84, pre F_r medzi stĺpcami je 4,46) sme zistili signifikantné rozdiely medzi odchýlkami, ktoré dokazujú vplyv inhibičných látok (pri znamienkach + sa zdá, ako keby šlo o stimulujúce látky) na testovací organizmus a teda i na aktivitu vitamínu B₁₂ výpočtom podľa Schuha pri všetkých kombináciách testovacích pôd a testovacích organizmov.

Vyhodnotením podľa Rosypala sa nezistil preukazný vplyv inhibičných látok na Harrisonovej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli M-113-3* a na Čajkovskej testovacej pôde s testovacím organizmom *Escherichia coli M-200*.

Porovnaním odchýlok z vyčíslenia koncentrácie vitamínu B₁₂ podľa Černej sa neprejavil preukazný vplyv inhibičných látok na Čajkovskej testovacej pôde s obidvoma testovacími organizmami.

Tieto údaje sú pre nás dôležitým podkladom pre ďalšie fermentačné pokusy, keďže sa ukázalo, že na samotné vyhodnotenie koncentrácie vitamínu B₁₂ vplyva zloženie testovacej pôdy i sám testovací organizmus.

Súhrn

Prítomnosť inhibičných látok vo fermentujúcich tekutinách *Actinomyces olivaceus* ruší stanovenie vitamínu B₁₂. Preto sme v predloženej práci zhodnotili matematické postupy na vyčíslenie koncentrácie vitamínu B₁₂ podľa V. Schuha, S. Rosypala a J. Černej.

V závislosti od testovacieho organizmu a testovacej pôdy sú zhrnuté presnosti stanovenia vitamínu B₁₂ v metabolických produktoch *Actinomyces*

olivaceus pšeničných výpalkov a výpalkov po výrobe biologicky aktívneho drožďia po alkalickéj deštrukcii vitamínu B₁₂ vzhľadom na štandardy v destilovanej vode a štatisticky sú vyhodnotené odchýlky vitamínu B₁₂ od známeho pridaného množstva.

Vyhodnotením koncentrácie vitamínu B₁₂ podľa J. Černej na testovacej pôde podľa S. M. Čajkovskej s testovacími organizmami *Escherichia coli M-200* a *Escherichia coli M-113-3* sa eliminujú rušivé vplyvy inhibičných látok voči testovaciemu organizmu, prítomných vo fermentujúcich substrátoch, a tak najpresnejšie indikujú skutočný obsah vitamínu B₁₂ vo vyšetrovanom materiáli.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИЦИОННЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B₁₂

ЭМА БУНТОВА

Центральный исследовательский институт пищевой промышленности
в Братиславе

Выводы

Присутствие ингибиционных веществ в ферментирующих жидкостях *Actinomyces olivaceus* нарушает определение витамина B₁₂. Мы поэтому оценили в предлагаемой работе математические методы для вычисления концентрации витамина B₁₂ методами В. Шуха, С. Розсыпала и Й. Черной.

В зависимости от тест-организма и питательной среде резюмирована точность определения витамина B₁₂ в метаболических продуктах *Actinomyces olivaceus* пшеничной барды и барды после производства биологически активных дрожжей, после щелочной деструкции витамина B₁₂ по отношению к стандартам в дистиллированной воде и статистически оценены отклонения в содержании витамина B₁₂ от известного приданного количества.

Оценкой концентрации витамина B₁₂ по методу Й. Черной на применяемой среде С. М. Чайковской при помощи штаммов *Escherichia coli M-200* и *M-113-3* элиминируется нарушающее влияние ингибиционных веществ в отношении применяемых организмов, присутствующих в ферментационных субстратах и таким образом указывается очень точно действительное содержание витамина B₁₂ в исследуемом материале.

Поступило в редакцию 28. 7. 1960 г.

EINFLUSS VON INHIBIERENDEN STOFFEN AUF DIE BESTIMMUNG DES VITAMINS B₁₂

EMMA BUNTOVÁ

Zentrales Forschungsinstitut für die Nahrungsmittelindustrie
in Bratislava

Zusammenfassung

Die Anwesenheit inhibierender Stoffe in fermentierenden Nährlösungen des *Actinomyces olivaceus* stört die Bestimmung des Vitamins B₁₂. Deshalb bewertete die Autorin in der

vorliegenden Arbeit die mathematischen Verfahren für die zahlenmässige Festlegung der Vitamin B₁₂-Konzentration nach V. Schuh, S. Rosypal und J. Černá.

In Abhängigkeit vom Testorganismus und vom Testboden werden die Genauigkeiten der Bestimmung des Vitamins B₁₂ in den metabolischen Produkten des *Actinomyces olivaceus* von Weizenschlempe und von Schlemphen nach der Erzeugung biologisch aktiver Hefe zusammengefasst, nach der alkalischen Destruktion des Vitamins B₁₂ im Hinblick auf den Standard in destilliertem Wasser, und die Abweichungen des Vitamin B₁₂-Gehaltes von einer bekannten zugesetzten Menge statistisch ausgewertet.

Durch Auswertung der Vitamin B₁₂-Konzentration nach J. Černá auf einem Testboden nach S. M. Čajkovská mit den Teststämmen *Escherichia coli M-200* und *M-113-3* werden die störenden Einflüsse der inhibierenden Stoffe, welche in den fermentierenden Substraten anwesend sind, gegenüber dem Testorganismus eliminiert, und so indizieren sie aufs genaueste den Vitamin B₁₂-Gehalt im untersuchten Material.

In die Redaktion eingelangt den 28. 7. 1960

LITERATÚRA

1. Mücke D., II. celoštátna pracovná konferencia analytickej chémie 1.—8. septembra, Praha 1959. — 2. Sommer H., *Vitamin B₁₂*, Berlin 1954. — 3. Emery W. B., Lees K. A., Tootil P. R., *The Analyst* 76 (1951). — 4. Mücke D., *Einführung in mikrobiologische Bestimmungsverfahren*, Leipzig 1957. — 5. Borensztajn D., *Badania nad witamina B₁₂*, Warszawa 1956. — 6. Harrison E., Lees K. A., Wood F., *The Analyst* 76 (1951). — 7. Schuh V., *Disertační práce*, Biologický ústav ČSAV, Praha 1952. — 8. Rosypal S., *Práce brněnské základny čs. akademie věd*, 1958. — 9. Černá J., *Českoslov. farm.* 8 (1959). — 10. Stuchlík V., *Výskum výroby biologicky aktívneho droždia*, Záv. zpráva VÚPPV, Bratislava 1960.

11. Bukin V. N., Areškina L. J., Kuceva L. S., *Biochim.* 19, výp. 6 (1954). — 12. Golševa M. G., Rabajeva M. J., *Trudy VI, Vitaminy*, Moskva 1959. — 13. Jerusalimskij N. D., Konova J. V., Neronova N. M., *Mikrobiol.*, výp. 3 (1959). — 14. Čajkovskaja S. M., Družinina E. N., *Mikrobiol.* 26 (1957). — 15. Kocková-Kratochvílová A., *Praktikum technické mikrobiologie*, Praha 1954. — 16. Erna Weber, *Grundriss der biologischen Statistik*, Jena 1956. — 17. Schied H. E., Schweigert B. S., *J. Biol. Chem.* 185, 1 (1950). — 18. Černá J., Houbová V., Hubková J., *Čs. hygiena* 4, 1 (1959).

Do redakcie došlo 28. 7. 1960

Adresa autorok:

Inž. Ema Buntová, Bratislava, Miletičova 14/b, Ústredný výskumný ústav potravinárskeho priemyslu.