

KVASNÁ PŘÍPRAVA RIBOFLAVINU

MILOŠ KULHÁNEK

Biochemický výzkumný ústav Praha, pobočka v Neratovicích

Přehled literatury o biosynthese riboflavinu vyšel před časem v tomto časopisu [1]. Uvádím proto pouze novější práce, pojednávající o tomto tematiku.

Zaleskaja [2] popsala obohacování obilno-bramborových výpalků riboflavinem kultivací plísně *Aspergillus flavus*. Tím způsobem lze získati preparáty, obsahující 30—34% bílkovin a 30—92 γ riboflavinu v 1 g.

Levine a spolupracovníci [3] používali *Candida guilliermondia*, kultivované v syntetickém kvasném mediu se síranem amonným nebo močovinou jako zdrojem dusíku a obsahem železa 40—60 γ v 1 litru. Dosáhli v laboratorním měřítku konečné koncentrace 177 γ riboflavinu v 1 ml zkvašeného roztoku a 118 γ v 1 ml v poloprodučním měřítku. *Candida flaveri* vytvořila prý nejvýše 576 γ riboflavinu v 1 ml živného substrátu v laboratorním měřítku a nejvýše 325 γ v 1 ml v poloprovoze.

Jiný mikroorganismus, jehož použití k biosynthese riboflavinu bylo popsáno, je kvasinkovitá *Ashbya gossypii*. Po prvé v ní našel riboflavin Guilliermond se spolupracovníky [4]. Uvedl, že za podmínek optimálních pro tvorbu riboflavinu u *Eremothecia ashbyii*, vytváří pouze nepatrná množství riboflavinu. Avšak Vickerham a spolupracovníci [5] našli ve sbírce Northern Regional Research Laboratory (Peoria, Illinois) oranžově-žlutou odrůdu *A. gossypii*, označovanou jako kmen *NRRL Y — 1056*, která produkovala po 8 dnech až 381 γ riboflavinu v 1 ml zkvašeného roztoku, aniž bylo nutno upravovati obsah železa v kvasném mediu. Tanner se spolupracovníky [6] studovali dále činitele ovlivňující výtěžky riboflavinu u této odrůdy. Konečně v podstatě opět tatáž pracovní skupina [7] publikovala popis maloprovozního zařízení k výrobě riboflavinových koncentrátů za použití uvedeného kmene. Udávané výtěžky činí prý v příznivém případě 500—848 γ v 1 ml. Uvádím i příslušné patenty [8].

Mikroorganismem, který je podle údajů literatury nejčastěji používán ke kvasné přípravě riboflavinu, je *Eremothecium ashbyii*. Bylo podrobně popsáno Guilliermondem r. 1935 [9]. Již v prvé publikaci se autor zmínil, že vytváří žlutý pigment, později prokázali Guilliermond, Fontaine a Raffy, že tento pigment je totožný s riboflavinem [4]. Raffy a Fontaine [10] uvedli

dále množství riboflavinu produkovaná na Gorodkovově agaru: 85,6 γ v 1 g po 19 dnech kultivace. Isolaci riboflavinu ze substrátů, na nichž bylo kultivováno *E. ashbyii*, provedli poprvé Mirimanoff a Raffy [11]. Teprve později [12] byly popsány kultivační podmínky v tekutém substrátu s výtěžkem až 80 γ riboflavinu v 1 ml. Schopfer nalezl [13], že *E. ashbyii* patří, pokud se týká vyžadovaných růstových látek, k náročným mikroorganismům. Renaud a Lachaux [14] připravili za použití *E. ashbyii* po 24 dnech kultivace až 159 γ riboflavinu v 1 ml zkvašeného roztoku. Hickey [15] uvádí, že výtěžky vyšší než 200 γ v 1 ml nejsou všeobecně uznávány.

Deseive studovala [16] podmínky vysokých výtěžků riboflavinu při kultivaci *E. ashbyii*. Použila po prvé i submersního způsobu kultivace. Nalezla, že pro tvorbu riboflavinu je nutný blíže neurčený, ke zvýšené teplotě málo odolný faktor, který je ničen dlouhou sterilisací živných půd. Vhodné živiny jsou: glukosa (i technická), kvasničná voda, sladina, nevhodné jsou ethanol a glycerin. Optimum pH udává mezi 5,5 až 6,4. Pro vysoký výtěžek riboflavinu je nutné silné větrání substrátu. V experimentální části její publikace udávané koncentrace dosahují 5—6 mg %, v souhrnu udává, že v tekutém podílu zkvašeného roztoku může býti nahromaděno až 50 mg % riboflavinu, zatím co mycelium *E. ashbyii* obsahuje 0,25% riboflavinu. Provedla i pokusy na izolaci riboflavinu adsorbci a elucí. Jako nejvýhodnější adsorbens používala bělicí hlínky. K eluci riboflavinu adsorbovaného na hlínku byla nejvhodnější směs pyridinu, koncentrované kyseliny octové a vody nebo 80% aceton. Biologickými pokusy prokázala po prvé biologickou identitu kvasně připraveného riboflavinu se synteticky připraveným.

Uvádím dále seznam patentů, chránících kvasnou přípravu riboflavinu za použití *E. ashbyii* [17, 21] a publikace, podávající přehled literatury o biochemické přípravě riboflavinu [1, 18].

Produkcí riboflavinu *E. ashbyii* studovali také japonští badatelé [19]. Takata [20] kultivuje *E. ashbyii* na pevných půdách s rýžovými nebo pšeničnými klíčky, umístěných v rotujících provzdušňovaných bubnech. Sušením se získá produkt o 2% riboflavinu.

E. ashbyii zkvašené roztoky obsahují riboflavin vždy z části vázaný na buněčnou hmotu. Jeho uvolnění do roztoku se provede zahříváním k varu asi po 1 hod. po okyselení na pH 5—5,5. [21] okyseluje koncentrovanou kyselinu sírovou na 0,25 n kyselinu a zahřívá po 20 min. na 120° C.

O izolaci riboflavinu ze zkvašených roztoků adsorbci a elucí jsem se již zmínil [11, 16]. Vedle uvedených nejstarších způsobů byla nověji popsána řada jiných method. V práci [22] se sráží riboflavin z roztoků, obsahujících jej v koncentracích 200—333 γ v 1 ml redukcí hydrosiřičitanem sodným, chloridem cinatým, titanitým a pod. Po filtraci extrahuje sraženinu 70% isopropanolem při 80° C a získaným extraktem provádí po filtraci vzduch. Ochlazením se vyloučí krystalky riboflavinu s výtěžkem 70% původního množství. Druhý patent téhož autora [23] navrhuje k vysrážení riboflavinu z roztoku použití redukčního působení různých druhů bakterií, na př. *Streptococcus faecalis* (sráží riboflavin s účinností ca 90%), *S. cremonis* (68%), *S. zymogenes* (81%), *S. liquefaciens* (75%). Pro-

vysrážení riboflavinu působením redukujících bakterií je nutná minimální koncentrace ca 65 γ v 1 ml, obsah riboflavinu ve sraženině je asi 85—90%. Podrobněji popisuje tento způsob izolace Hickey [15]. Sraženina vzniklá redukcí riboflavinu není chemickým individuem, vzniká pouze při určitém redoxpotenciálu, způsobeném chemicky nebo biochemicky. Autor diskutuje i dřívější údaje literatury o podobných redukovanych, ve vodě nerozpustných, chemicky dosud nedefinovaných formách riboflavinu.

Merckovy patenty [24] chrání izolaci riboflavinu z roztoků zkvašených *E. ashbyii* extrakcí acetonem po zahuštění na syrob a krystalisací ze zahuštěného acetonového extraktu. Tímto způsobem se má získat 56% krystalického riboflavinu vztaženo na původní obsah ve zkvašeném roztoku. V práci [25] se navrhuje extrakci leukoriboflavinu (po chemické redukcí riboflavinu) vyššími, s vodou se nemísícími alkoholy. V práci [26] se rozpouští sraženiny získané redukcí roztoku riboflavinu rozpouštědlem, v němž je redukována forma riboflavinu rozpustnější než riboflavin.

Po koncentraci riboflavinu, provedené některou z právě popsaných metod, se provádí konečná rekrystalisace z vody, vodného alkoholu nebo zředěné kyseliny octové [27]. Při způsobu popsaném sovětskými badateli [28] se surový riboflavin rozpustí v teplé, 24% kyselině solné, přidá se malé množství peroxidu vodíku a sfiltruje se. Zředěním vodou vykristaluje riboflavin v jemných hranolech. Odssaje se po 24 hod. stání.

Metodika a výsledky

Ve svých pokusech na biochemické přípravě riboflavinu jsem používal kultury *E. ashbyii* dodané baarnskou sbírkou.

Z pokusů, provedených za použití kultury *Ashbya gossypii* stejného původu, vyplynulo ve shodě s údaji literatury, že běžné kmeny tohoto mikroorganismu vytvářejí riboflavin pouze v měřítku obvyklém i u jiných druhů kvasinek.

V preparativních pokusech za použití *Ermothecium ashbyii* se ukázalo, že rozhodující vliv na výtěžky riboflavinu má složení a pH substrátu a způsob kultivace. Důležité faktory jsou dále způsob sterilisace, t. j. doba, po kterou je substrát vystaven zvýšené teplotě a způsob přípravy a množství zákvasu.

Pokusy na selekci optimálního kvasného media obsáhly všechny předpisy, uvedené do té doby v dostupné literatuře, pokud používaly u nás běžných surovin. V dalších pokusech byla pak podle zkušeností a pozorování složení substrátů vhodným způsobem modifikována. Jako nejvhodnější byla nalezena kaseino-sladová živná půda, jejíž složení popisují v pokusné části. Na této půdě byl za vhodných kultivačních podmínek výtěžek riboflavinu průměrně okolo 350 γ v 1 ml. Maximální dosažený výtěžek činil 440 γ riboflavinu v 1 ml.

Jak již bylo uvedeno, jsou přijímány neobvykle vysoké výtěžky riboflavinu, uváděné v některých patentech různými badateli [15], s nedůvěrou. V souhlase s tím zůstaly výtěžky, dosažené našimi kulturami, za výtěžky udávanými v některých patentech. Naproti tomu se podařilo v našich pokusech výtěžky udávané v nepatentové literatuře vesměs překonat.

Dalším důležitým činitelem při kultivaci *E. ashbyii*, pokud se týká výtěžků riboflavinu, je způsob sterilisace. Ukázalo se totiž, že kultury *E. ashbyii* jsou k infekcím cizími mikroorganismy velmi citlivé. Při tom je však nutno použí-

vati půd bohatých na různé živiny, které představují vhodné substráty pro nejrozličnější druhy mikrobů. Na druhé straně vyžaduje *E. ashbyii* k tvorbě riboflavinu jistý, blíže neidentifikovaný faktor, který je ničen delším zahříváním. Je tedy nutno nalézt vhodný způsob sterilisace, který zaručuje sterilitu používaných živných půd při pokud možno nejkratším působení zvýšené teploty.

Pokud je nutno používatí frakcionované sterilisace proudící parou, sterilisují se 25 ml živné půdy třikrát po jeden a půl hodině v intervalech 24 hod. Mezi jednotlivými sterilisacemi je nutno substráty uložit při ca 25° C. Jsou-li uloženy při nižší teplotě, nevyklíčí mezi jednotlivými sterilisacemi ještě přítomné spory thermoresistentních bakterií a substrát není po 3. sterilisaci sterilní. Při uložení mezi sterilisacemi při vyšší teplotě (na př. při 30° C), zaroste půda během 24 hod. ještě přítomnými thermoresistentními bakteriemi a není použitelná. 200 ml substráty byly sterilisovány třikrát po 2 hod. obdobným způsobem. Při kratší době sterilisace nebyly substráty sterilní. Byly-li substráty sterilisovány třikrát po 4 hod., nebyl růst *E. ashbyii* patrně ovlivněn, avšak tvorba riboflavinu nastala pouze v malé míře. Na půdách, sterilisovaných třikrát 6 hodin v proudící páře, *E. ashbyii* nerostlo. Při větších množstvích substrátu — 3 až 5 l — nutno počítat s tím, že trvá podle našich pokusů nejméně 1 hod., než je toto množství substrátu vyhřáto proudící parou na 100° C. O to je nutno prodloužit dobu sterilisace. V autoklávu byly malé substráty (do 25 ml) sterilisovány 30 min. při 1 atm (121° C), 200 ml substráty 45 min. při tomtéž tlaku. Také delším autoklávováním je snižována tvorba riboflavinu a konečně i potlačen růst *E. ashbyii*.

V provozním měřítku by bylo nejlépe používatí průtokových sterilisátorů [7], v nichž je sterilisován substrát ohřátím na př. na 135° C po dobu 5 min.

Optimum pH je pro růst *E. ashbyii* mezi 4,5—5,0, pro tvorbu riboflavinu mezi 5,5—7,5, optimální teplota 29—32° C.

Růst *E. ashbyii* i tvorba riboflavinu jsou silně závislé na přívodu vzduchu během kvašení. Při nízkých vrstvách substrátu (na př. 25 ml v 200 ml konické baňce), postačí při submersní kultivaci za použití třepání zcela třepání nádobky s vatovou zátkou k dostatečnému zásobení kultury vzduchem. U 200 ml kultur, kultivovaných submersně za použití třepání, je nutno provádět kulturou proud vzduchu.

Vzhledem k rozkladu riboflavinu světlem je nutno uchovávatí kultury ve tmě.

Pokusná část

Pro běžnou kultivaci *E. ashbyii* byla používána peptono-glukosová půda o složení:

- 0,8% Nutrient Broth,
2,5% droždí jako 20% autolysát,
2% sacharosy, příp. techn. monohydrátu glukosy.

Byla používána jako tekuté medium pro stacionární nebo submersní kultivaci nebo jako šikmý agar po přidání 2—3% agar-agaru.

E. ashbyii rostlo dobře i na jiných běžně používaných půdách, na př. na půdách s 5% glukonanu vápenatého a 2,5% droždí tekutých nebo tuhých. Na sladidinových šikmých agarrech byl růst rovněž dobrý, avšak tvorba riboflavinu byla poněkud snížena.

Na všech uvedených půdách vyrostle během 2 dnů při 29° C nažloutlé až žluté mycelium slizovitě-kožnatého vzhledu. Žluté zbarvení se v průběhu dalšího růstu zesiluje. Nejintenzivněji zbarvené mycelium — až sytě oranžové — se tvořilo na půdách, které byly touhou obdobou tekuté kaseinové půdy, na níž bylo při submersní kultivaci dosaženo nejvyšších výtěžků riboflavinu.

Po několikanásobném přeočkování na každé z těchto půd nebyly pozorovány známky degenerace, avšak podle získaných zkušeností je při udržování kultur *E. ashbyii* vhodné střídati tekuté a tuhé půdy.

Při zaočkování tuhé půdy nátěrem tekuté kultury je možno často rozeznati vlastnosti mycelia, vzniklého vegetativním růstem úlomku hyfy, od mycelia vyrostlého ze spory. Zatím co mycelium, vyrostlé klíčením spory, je od začátku růstu žlutě zbarveno, je mycelium vzniklé vegetativním růstem vláknata s počátku bílé. Oba druhy mohou ovšem vyrůst vedle sebe v téže kultuře. V preparačních pokusech je nutno vždy použití žlutého mycelia, vyrostlého ze spory. Jako příklad uvádím výsledek jednoho ze srovnávacích pokusů:

Substráty, zaočkované za stejných podmínek 4 dny starou

- a) bílou kolonií, obsahovaly po 23 dnech stacionární kultivace 85 γ riboflavinu v 1 ml,
- b) žlutou kolonií téže kultury, obsahovaly po 23 dnech stacionární kultivace 250 γ riboflavinu v 1 ml.

Při preparativních pokusech bylo postupováno tímto způsobem:

Příprava kaseinové živné půdy:

1% sušeného kaseinu,

9% vody z vodovodu

se naváží, přidá se 1 ml 26% čpavkové vody na každých 10 g kaseinu, uloží se 3 dny při 50° C, pak se přidá:

1,75% sladového výtěžku o 50—60% sušiny,

0,5 % glukosy (technický monohydrát),

pH se upraví na 6,5—6,9.

Aparatury

1. 200 ml konické baňky, plní se po 25 ml, vatové zátky,

2. 1 l varné baňky s gumovými zátkami dvakrát vrtanými se 2 vatovými filtry, z nichž jeden — pro přívod vzduchu — je opatřen trubičkou sahající ke dnu baňky. Plní se 200 ml substrátu.

Sterilisace

45 min. v autoklávu při 120° C, příp. třikrát po 2 hod. v proudící páře, mezi jednotlivými sterilisacemi se substráty uloží při ca 25° C.

Kontrola sterility půd

Půdy se uloží po sterilisaci nejméně na 2 dny při 28—30° C. Nesmí se potáhnout mázdrou nebo zakalit, po usazení musí být čiré.

Příprava zákvasu

2 dny starou žlutou kolonii, vyrostlou na kaseino-sladidinovém šikmém agaru, se očkuje 25 ml kaseino-sladidinové půdy a třepe se v zatemněné místnosti 2 dny v třepacím stroji o ca 2 kmitech za vt.

Kontrola zákvasu

Zákvas musí být po 2 dnech sytě žluto-hnědě zbarvený se zřetelnou zelenou fluorescencí, obsahovat žluté submersní mycelium; mikroskopicky musí být čistou kulturou *E. ashbyii*. Má vůni připomínající květy střemchy. Srážený kasein, hustý, nevláknitý zákal a zápach po sýru jsou makroskopické znaky infekce cizími mikroorganismy.

Hlavní kvašení

25 ml zákvasu, vyhovujícího uvedeným požadavkům, se za přísně aseptických kautel zaočkuje 200 ml sterilní kaseino-sladinové půdy. Vatovým filtrem se do kvasícího substrátu od začátku vhání vzduch tak, aby substrát nepěnil do výstupního vatového filtru a třepe se ve tmě 6—10 dnů v třepacím stroji o ca 2 kmitech za vt. při 30° C.

Výtěžek

Ca 300—440 γ riboflavinu v 1 ml zkvašeného roztoku. Kultivací delší než 10 dnů obsah riboflavinu zvolna klesá.

Souhrn

Byla shrnuta literatura o kvasné přípravě riboflavinu. Za použití běžné kultury *Eremothecia asbyii* z baarnské sbírky byly zkonfrontovány různé předpisy živných půd uvedené v literatuře pro biosyntezu riboflavinu tímto mikroorganismem. Bylo nalezeno složení substrátů a způsob přípravy zákvasů a vypracovány kultivační podmínky, při nichž je možno v laboratorním měřítku dosahovati výtěžků průměrně 300—400 γ riboflavinu v 1 ml zkvašeného roztoku, nejvyšší dosažený výtěžek činil 440 γ riboflavinu v 1 ml zkvašeného roztoku.

Za použití kultury *Ashbya gossypii* z baarnské sbírky byly potvrzeny údaje literatury, že běžné kmeny tohoto mikroorganismu vytvářejí riboflavin jen v měřítku obvyklém i u jiných druhů kvasinek.

БРОДИЛЬНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ РИБОФЛАВИНА

М. КУЛГАНЕК

Биохимический институт, Прага, филиал Нератовице

Выводы

Собрана литература о бродильном получении рибофлавина. С применением обычной культуры *Eremothecia ashbyi* из баарнского собрания сопоставлены разные рецепты питательных сред для биосинтеза рибофлавина этим микроорганизмом, данные в литературе. Определены состав субстратов и способы получения заторов и составлены условия культивации, в которых можно достигнуть в лаборатории выходы в среднем 300—100 рибофлавина в 1 мл заквашенного раствора; самый большой выход был 440 в 1 мл заквашенного раствора.

С применением культуры *Ashbya gossypii* из баарнской коллекции подтверждены литературные данные о том, что обычные роды этого микроорганизма создают рибофлавин только в масштабе, обычном у других дрожжевых грибов.

Получено в редакции 24-го октября 1952 г

RIBOFLAVINBEREITUNG MITTELS GÄRUNG

Miloš Kulhánek

Biochemisches Forschungsinstitut Prag, Zweigstelle in Neratovice

Zusammenfassung

Es wurde die Literatur über Riboflavinbereitung mittels Gärung zusammengefasst. Bei Anwendung einer normalen Kultur *Eremothecia ashbyii* aus der baarnschen Sammlung wurden verschiedene in der Literatur angeführte Vorschriften über Nährböden für die Biosynthese von Riboflavin durch diesen Mikroorganismus konfrontiert. Es wurde die Zusammensetzung des Substrates, sowie die Zubereitungsart der Anstellhefe gefunden und Kultivierungsbedingungen ausgearbeitet, bei denen im Laboratoriumsmaßstab Ausbeuten von durchschnittlich 300—100 γ Riboflavin vergorener Lösung erzielt werden konnten. Die höchste Ausbeute betrug 440 γ Riboflavin in 1 ml vergorener Lösung.

Bei Anwendung der Kultur *Ashbya gossypii* aus der baarnschen Sammlung wurden die Literaturangaben bestätigt, wonach gangbare Stämme dieses Mikroorganismus in auch bei anderen Hefepilzarten usuellem Maßstab Riboflavin produzieren.

In die Redaktion eingelangt den 24. X. 1952

LITERATURA

1. Vašátko J., Halaša V., Chem. zvesti 3, 354 (1949).
2. Zaleskaja M. J., Mikrobiologija 19, 127 (1950).
3. Levine H. a spolupracovníci, Ind. Eng. Chem. 41, 1665 (1949).
4. Guilliermond A., Fontaine M., Raffy A., C. r. 201, 1077 (1935).
5. Wickerham L. J., Flickinger M. H., Johnston R. M., Arch. Biochem. 9, 95 (1946).
6. Tanner F. W., Vojnovich C., van Lanen J. N., J. Bact. 58, 737 (1949).
7. Pfeifer V. F. a spolupracovníci, Ind. Eng. Chem. 42, 1776 (1950).
8. Tanner F. W., Wickerham L. J., van Lanen J. N., USP 2445 128; B P 640 452; Šv. P. 268 325.
9. Guilliermond A., C. r. 200, I, 1556 (1935); Rev. de Mycologie 1, 115 (1936).
10. Raffy A., Fontaine M., C. r. 1005 (1937).
11. Mirimanoff A., Raffy A., C. r. 206, 1507; Helv. Chim. Acta 21, 1004 (1938); Bull. Soc. Chim. Biol. Paris 20, 1166 (1938).
12. F P 226 791, Pons Nemurs (1943).
13. Schopfer W. H., Helv. Chim. Acta 17, 1017 (1944).
14. Renaud J., Lachaux M., C. r. 221, 187 (1945).
15. Hickey R. J., Arch. Biochem. 11, 259 (1945).
16. Deseive E., Die Milchwissenschaft 3, 141 (1947).
17. USP 2 374 503 (1945) USP 2 473 817 (1949).
F P 913 165 (1946) USP 2 473 818 (1949).
USP 2 400 710 (1946) USP 2 483 855 (1949).
B P 593 027 (1947) USP 2 498 549 (1950).
B P 615 847 (1949) USP 2 543 897 (1951).
18. Dikanskaja, Mikrobiologija 19, 260 (1950).
Annual Review of Microbiology 1 (1947).
19. C. A. 44, 7384.
20. Takata, J. Jap. Biochem. Soc. 20, 130 (1948).
21. USP 2 493 274 (1950).
22. USP 2 367 644 (1945); B P 621 532 (1949).
23. USP 2 387 023 (1945); B P 621 469 (1949).
24. F P 935 079 (1948); B P 621 401 (1949).
25. USP 2 464 243 (1949).
26. B P 621 468 (1949).
27. Rosenberg H. R., *Chemistry and Physiology of the Vitamins*, 1945.
28. Berezovskij V. M., Kurdynkova V. A., Preobraženskij N. A., Ž. Prikl. Chim. 22, 527 (1949); C. A. 44, 2530.

Došlo do redakcie 24. X. 1952