

Využitie repnej melasy pre fermentáciu penicilínu V

J. FUSKA, I. KUHR, A. BENDA, L. IVANOV

Biotika, n. p., Slovenská Lupča

Penicillium chrysogenum môže pre svoj rast využívať rozličné zdroje uhlíka. Na dosiahnutie maximálnej produkcie penicilínu sa dobre hodí laktóza, ktorá pridaná do pôdy na začiatku fermentácie zabezpečuje u jednotlivých kmeňov optimálnu produkciu. Viacerí autori sa usilovali nahradiť laktózu inými, ľahšie dostupnými zdrojmi sacharidov, ako napríklad glukózou, sacharózou, xylózou a škrobom.

Možnosť využitia glukózy pre fermentáciu penicilínu rozpracoval M. J. Johnson [4]. Zistil, že pri použití glukózy možno dosiahnuť rovnakú produkciu penicilínu ako pri použití laktózy. O rok neskôr tento problém rozpracovali ďalej F. V. Soltero a M. J. Johnson [6]. Ako produkčný kmeň použili *Penicillium chrysogenum* Q 176. Glukózu alebo sacharózu pridávali do fermentačnej pôdy v rotačných trepačkách od 24. hodiny v koncentrácii 0,5 % za 12 hodín. Podľa dosiahnutých výsledkov optimálne koncentrácie glukózy boli 0,03 %, pri použití sacharózy 0,036 %. Priaznivé výsledky dosiahli spomenutí autori aj za použitia galaktózy. Produkcia penicilínu závisí pri uvedených zdrojoch uhlíka od použitého kmeňa [7]. Špeciálne selektované kmene metabolizujú sacharózu rôznou rýchlosťou, čím je daná aj rýchlosť a celková výška produkcie penicilínu. Pri použití kmeňov selektovaných pre tieto účely sa pri použití sacharózy dosiahla vyššia produkcia penicilínu než pri použití kmeňov používaných pre fermentácie na laktózových pôdach.

V našich pokusoch sme pre fermentáciu penicilínu V použili ako zdroj uhlíka surovú repnú melasu. V prvej časti pokusov sme porovnávali priebeh metabolizmu cukrov a produkciu penicilínu V u kmeňa *Penicillium chrysogenum* NH na pôde, ktorá obsahovala laktózu, čistú sacharózu alebo sacharózu vo forme repnej melasy. V druhej časti pokusov sme porovnávali produkciu penicilínu V u troch odlišných kmeňov, a to *Penicillium chrysogenum* NH, *Penicillium chrysogenum* NH 60 a *Penicillium chrysogenum* 165/16 na pôde, ktorá obsahovala sacharózu vo forme melasy. Posledné dva kmene dávajú na pôdach s laktózou vyššie výťažky penicilínu V než kmeň NH. Pokusy sme robili v laboratórnych tankoch.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Produkčný mikroorganizmus

Pre biosyntézu penicilínu sme použili geneticky odlišné kmene, a to *Penicillium chrysogenum* NH, NH 60 a 165/16. Kmene sme uchovávali na šikmom sporulačnom agare pri teplote — 30 °C maximálne 30 dní.

Zloženie inokulačnej pôdy

Na prípravu inokula sme použili pôdu o tomto zložení: glukóza 4 g, kukuričný výluh (100 % sušiny) 2 g, uhličitan vápenatý 0,2 g, dusičnan sodný 0,3 g, primárny fosforečnan draselný 0,5 g, síran horečnatý 0,01 g, síran zinočnatý 0,002 g, síran mangánatý 0,0007 g a sójový olej 0,2 ml. pH pôdy pred sterilizáciou bolo 5,7.

Zloženie základnej produkčnej pôdy

Základná produkčná pôda mala toto zloženie: arachidová múka 3 g, kukuričný výluh (100 % sušiny) 1 g, uhličitan vápenatý 0,75 g, síran horečnatý 0,01 g, síran zinočnatý 0,002 g, tiosíran sodný 0,24 g, kyselina fenoxyoctová 0,2 g, sójový olej 0,5 ml, vodovodná voda 100 ml. Do tejto základnej pôdy sme pridávali cukry podľa spôsobu fermentácie. Pri fermentácii na laktóze sme na začiatku pridávali do pôdy 5 g laktózy. Pri tých pôdach, kde sme použili čistú sacharózu alebo sacharózu vo forme melasy, pridali sme na začiatku fermentácie do pôdy 0,8 g laktózy a 0,2 g čistej sacharózy na 100 ml pôdy. Zvyšok cukrov sme pridávali počas fermentácie. Produkčná pôda mala pred sterilizáciou pH 5,4 — 5,7.

Príprava sacharózových roztokov

Melasový roztok sme pripravili takto: 300 g surovej repnej melasy sme vodovodnou vodou doplnili na 1000 ml a pH roztoku sme kyselinou sírovou upravili na 4,5. Do roztoku sme pridali 0,5 % aktívneho uhlia a po 15 minútovom zahrievaní pri teplote 80 °C sme roztok sfiltrovali. Získaný filtrát sme doplnili na pôvodný objem, pridali sme 35 g kukuričného výluhu a pH roztoku sme roztokom líhu sodného upravili na 6,8 — 6,9. Roztok sme 30 minút sterilizovali pri teplote 121 °C. Pred použitím sme sterilným spôsobom upravili pH roztoku kyselinou fosforečnou na 4,5. Pri použití čistej sacharózy sme roztok nečerali, ale len doplnili kukuričným výluhom.

Roztoky sme dávkovali podľa celkovej koncentrácie cukrov v pôde tak, aby sa ich hladina pohybovala v rozmedzí 2—7 mg/ml. Dávkovanie sme uskutočňovali pomocou infúzných fliaš, pripojených k fermentačným tankom, cez počítač kvapiek.

Príprava inokula

Inokulum sme pripravili v laboratórnom tanku, ktorý sme naplnili 10 l pôdy uvedeného zloženia. Sterilizovali sme v autokláve 60 minút pri 121 °C. Po skončenej sterilizácii sme ochladenú pôdu očkovali 100 ml 42 hodinového inokula. Kultivácia prebiehala pri teplote 25 °C 18 hodín.

Fermentácia

Tank sme plnili 10 l produkčnej pôdy uvedeného zloženia. Ochladenú pôdu sme po sterilizácii očkovali inokulum v objeme 10 % na objem pôdy. Kultiváciu sme robili

za ustavičného miešania a prevzdušňovania pri teplote 25 °C. Na odpeňovanie pôdy sme používali surový sójový olej. Pri stúpnutí pH nad 7,4 sme pôdu upravili sterilným roztokom kyseliny fosforečnej. Pri fermentácii na sacharóze sme roztok cukrov pridávali pravidelne od 28. až 30. hodiny.

Aparatúra

Všetky pokusy sme robili v rovnakej aparatúre. Použili sme laboratórne tanky z nehrdzavejúcej ocele o celkovom obsahu 20 litrov. Tanky boli opatrené dvoma miešadlami vo forme otvorených turbín. Prenos kyslíka stanovený sulfitovou metódou [3] bol 2,33 mg O₂ · ml⁻¹ · hod.⁻¹.

Analytické metódy

Cukry sme stanovili modifikovanou metódou podľa Bertranda [5].

Celkový dusík sme stanovili Kjeldahlovou metódou [5].

Penicilín sme stanovili jodometrickou metódou podľa J. F. Alicina [1] a paralelne biologickou difúznou metódou [2] za použitia testovacieho mikroorganizmu *Bacillus subtilis* SDPC 1 : 220. pH sme stanovili elektrónkovým pH-metrom Multoskop LP 23.

Suroviny

Laktóza: Obsah laktózy v tuhom produkte bol 97,8 %.

Sacharóza: Obsah sacharózy stanovený po prechádzajúcej hydrolýze bol 99,6 %.

Melasa: Obsah sacharózy bol 53,2 %, obsah invertu 1 %, obsah celkového dusíka pred čerením 2,3 %, po vyčerení 1,12 %.

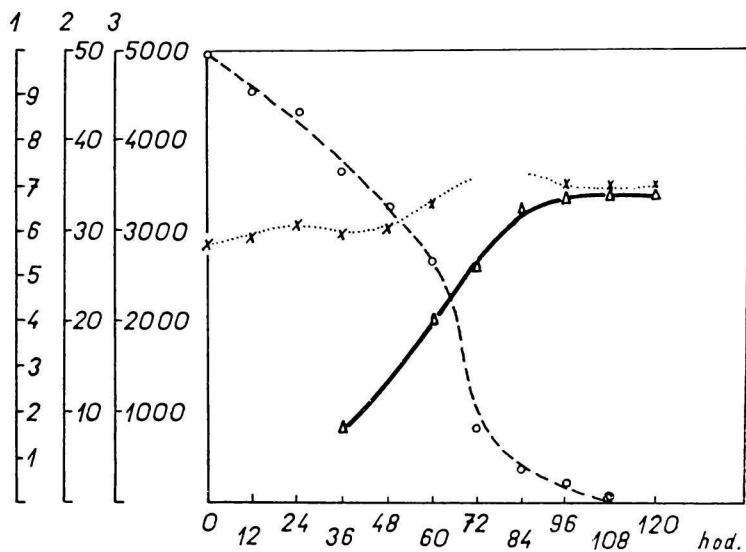
Arachidová múka odtučnená: Obsah dusíka bol 7,28 %.

Kukurličný výluk zahustený: Sušina bola 60 %, celkový dusík 3,8 %.

Ostatné suroviny sa použili vo forme čistých chemikálií.

Výsledky

Pre porovnanie výsledkov dosiahnutých pri použití melasy ako zdroja uhlíka uskutočnili sme s kmeňom *Penicillium chrysogenum* NH niekoľko od seba nezávislých fermentácií. Fermentovalo sa za rovnakých podmienok, na rovnakých základných produkčných pôdach, kde sa ako zdroj uhlíka použila laktóza, čistá sacharóza a sacharóza vo forme surovej repnej melasy. Dosiahnuté výsledky sú zhrnuté na obr. 1, 2 a 3. U kmeňa *Penicillium chrysogenum* NH bol metabolizmus laktózy rýchlejší než metabolizmus sacharózy. Rýchlosť spotreby sacharózy bola rovnaká bez ohľadu na to, či sa pridávala v čistej forme alebo vo forme melasy. Celkove vyššia spotreba cukrov, najmä za použitia čistej sacharózy závisela od dlhšej doby fermentácie. Rýchlosť metabolizmu dusíka nebola pri všetkých použitých cukroch rovnaká. Najrýchlejšiu spotrebu dusíka mal kmeň NH na pôde s melasou, zatiaľ čo rýchlosť spotreby dusíka na pôdach so sacharózou a laktózou sa takmer nelíšila. Rýchlosť produkcie bola najväčšia i najrovnomernejšia pri použití melasy. Rýchlosť pro-



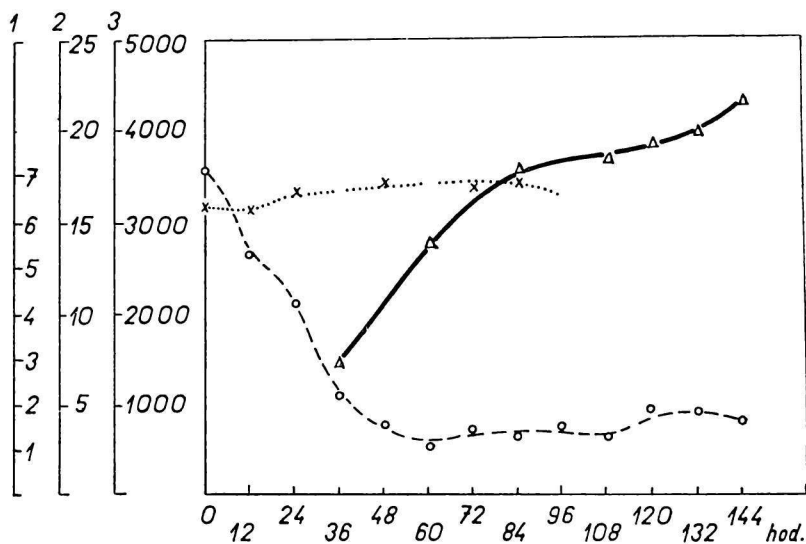
Obr. 1. Produkcia penicilínu V na pôde s laktózou. Použitý kmeň *Penicillium chrysogenum* NH.

1. pH; 2. laktóza mg/ml; 3. penicilín V mj/ml.

× hodnota pH,

○ koncentrácia cukru mg/ml,

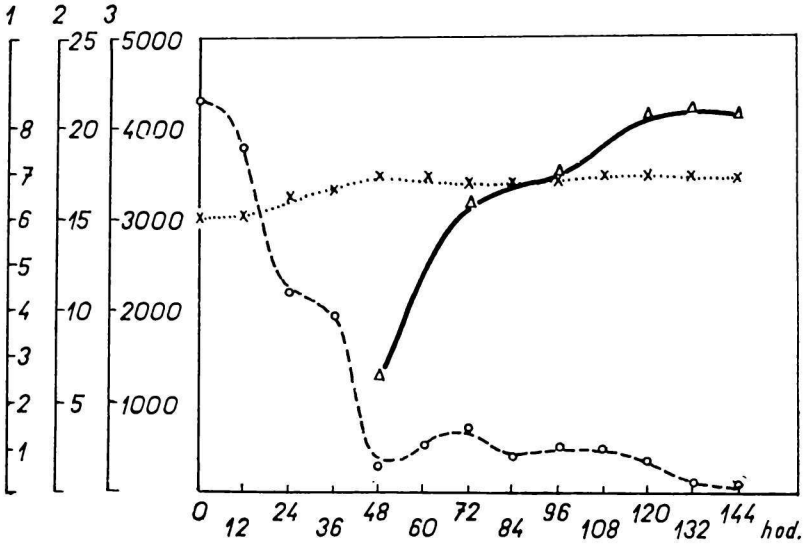
Δ koncentrácia penicilínu V mj/ml.



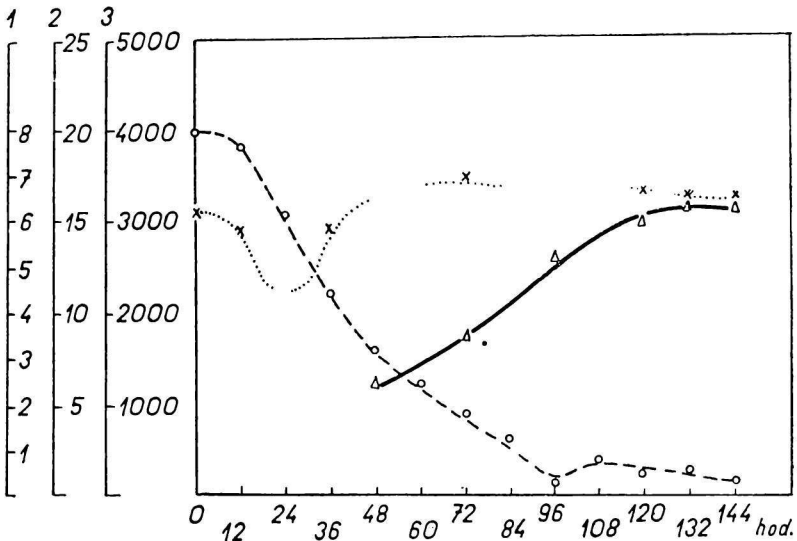
Obr. 2. Produkcia penicilínu V na pôde so sacharózou. Použitý kmeň *Penicillium chrysogenum* NH.

Označenie kriviek ako na obr. 1.

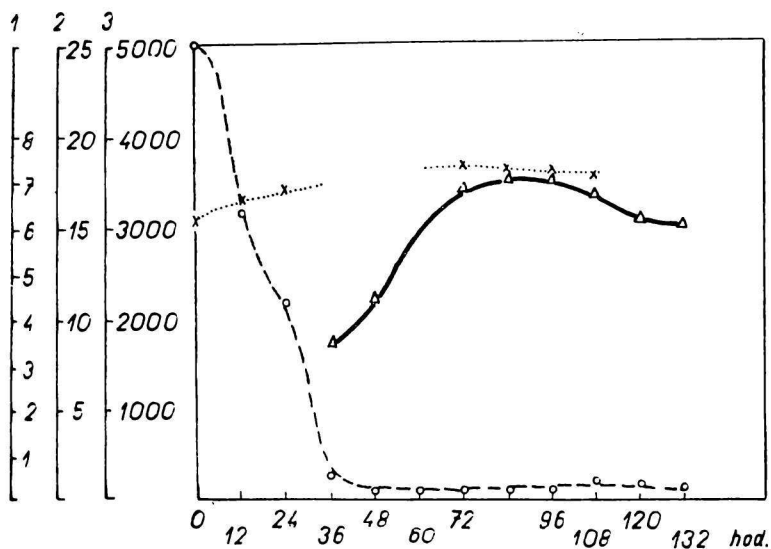
dukcie na sacharóze a laktóze sa takmer nelíšila a celkove vyššia produkcia dosiahnutá na sacharóze závisela od predĺženej doby fermentácie.



Obr. 3. Produkcia penicilínu V na pôde s repnou melasou. Použitý kmeň *Penicillium chrysogenum* NH.
Označenie kriviek ako na obr. 1.



Obr. 4. Produkcia penicilínu V na pôde s repnou melasou. Použitý kmeň *Penicillium chrysogenum* NH 60.
Označenie kriviek ako na obr. 1.



Obr. 5. Produkcia penicilínu V na pôde s repnou melasou. Použitý kmeň *Penicillium chrysogenum* 165/16. Označenie kriviek ako na obr. 1.

Pri porovnávaní vitálneho stavu najlepšiu vitalitu mal kmeň *NH* na pôde s čistou sacharózou, čo umožnilo predĺžiť dobu fermentácie. Pri použití melasy bol kmeň *NH* po morfolologickej stránke mierne pozmenený. Vlákna boli tenšie, na konci hlboko rozoklané, bez typického zhrubnutia, pričom bolo pozorovať slabé vetvenie vlákien.

Pre porovnanie vhodnosti melasy ako zdroja uhlíka aj pre iné kmene uskutočnili sme fermentácie na melasovej pôde za použitia ďalších dvoch geneticky odlišných kmeňov. Priebeh metabolizmu týchto kmeňov je uvedený na obr. 3, 4 a 5. Spotreba cukrov u všetkých troch kmeňov bola od začiatku do konca fermentácie rovnaká. Pri porovnaní rýchlosti spotreby cukrov vidieť, že najrýchlejšiu spotrebu mal kmeň 165/16. Rovnaké závislosti uvedených troch kmeňov sa ukázali aj pri porovnávaní metabolizmu dusíka, kde najrýchlejšiu spotrebu mal takisto kmeň 165/16. Celková produkcia penicilínu V bola u kmeňa *NH* najvyššia, ale najrýchlejšia produkcia v závislosti od času sa zistila u kmeňa 165/16. Tento kmeň mal však dobu fermentácie kratšiu, čo sa prejavilo i na celkovej produkcii penicilínu.

Diskusia

Využitie repnej melasy ako zdroja uhlíka pre fermentáciu penicilínu závisí od niekoľkých faktorov. Predovšetkým je to použitý kmeň. Pri použití vhod-

ného kmeňa možno na pôdach s melasou dosiahnuť rovnakú produkciu penicilínu ako na pôdach s laktózou. Použitie repnej melasy ako zdroja uhlíka sa u niektorých kmeňov prejavuje zrýchlenou spotrebou cukrov, zvýšeným nárastom sušiny a spomalením produkcie penicilínu. V priebehu fermentácie dochádza k morfológickým zmenám kmeňa. Kmene nevhodné pre využívanie cukrov vo forme melasy rýchle plazmolyzujú a tým predčasne ukončujú produkčnú fázu. Značný vplyv na produkciu penicilínu má i rýchlosť pridávania cukrov, ako aj ich celková koncentrácia v pôde. Rýchlosť pridávania cukrov má byť približne 0,5 % za 12 hodín. Pri použití vhodného kmeňa neovplyvňuje vysoký obsah anorganických solí a betaínu celkovú produkciu penicilínu.

Pri porovnávaní celkovej produkčnej schopnosti použitých kmeňov sa ukázalo, že kmeň *NH* s nižšou produkciou na pôdach s laktózou dáva za použitia repnej melasy vyššiu produkciu penicilínu než kmene *NH 60* a *165/16*.

Záver

Overila sa možnosť využitia surovej repnej melasy ako zdroja uhlíka pre fermentáciu penicilínu. Vhodné využitie tejto suroviny závisí od použitého kmeňa, od rýchlosti pridávania cukrov a od ich celkovej koncentrácie pôdy. Pri použití vhodného kmeňa dosiahnu sa na pôdach s repnou melasou vyššie produkcie penicilínu než na pôdach s laktózou. Vysoký obsah anorganických solí a betaínu, ktoré sú prítomné v melase, má nepriaznivý vplyv len na niektoré produkčné kmene.

Súhrn

V laboratórnych pokusoch v 20 l tankoch sme porovnávali produkciu penicilínu V u kmeňa *Penicillium chrysogenum NH* na pôdach s laktózou, so sacharózou a s repnou melasou. Použili sme metódu postupného pridávania roztokov cukrov alebo melasy počas fermentácie.

Výsledky ukázali, že na pôdach so sacharózou a melasou možno dosiahnuť vyššie výťažky než na pôdach s laktózou. Toto sa dá vysvetľovať predĺžením produkčnej fázy fermentácie.

Kmene *Penicillium chrysogenum NH 60* a *165/16*, ktoré na pôdach s laktózou dávajú vyššiu produkciu penicilínu V než kmeň *NH*, boli v porovnaní s týmto kmeňom na pôde s melasou menej produktívne.

Produkcia penicilínu V závisí od použitého kmeňa, od koncentrácie cukrov v pôde a od rýchlosti pridávania cukrov počas fermentácie. Prídavok má byť približne 0,5 % každých 12 hodín.

Nepriaznivý vplyv vysokej koncentrácie anorganických solí a betaínu v melase sa neprejavuje u všetkých kmeňov.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СВЕКЛОВИЧНОЙ ПАТОКИ ДЛЯ ФЕРМЕНТАЦИИ ПЕНИЦИЛЛИНА V

Я. Фуска, И. Кур, А. Бенда, Л. Иванов

Биотика, н. п., Словенска Лупча

В лабораторных экспериментах в цистернах емкостью 20 л сопоставлялись выходы пенициллина V у штамма *Penicillium chrysogenum NH* на питательной среде с лактозой, сахарозой и свекловичной патокой. Мы применили метод последовательного прибавления растворов сахаров или патоки в течении ферментации.

Результаты показали, что на питательных средах с сахарозой и патоки можно достичь более высоких выходов, чем на средах с лактозой. Это объясняется с удлинением производительного фазиса ферментации.

Штаммы *Penicillium chrysogenum NH 60* и *165/16*, которые производят больше пенициллина V на питательных средах с лактозой чем штамм *NH*, оказались в сравнении с последним штаммом в случае патоки менее производительными.

Производство пенициллина V зависит от примененного штамма, от концентрации сахаров в питательной среде и от скорости прибавливания сахаров в течении ферментации. Это должно составлять приблизительно 0,5 % в течении 12 часов.

Высокая концентрация неорганических солей и бетаина в патоке не мешает у всех штаммов.

NUTZBARMACHUNG DER RÜBENMELASSE FÜR DIE FERMENTATION VON PENICILLIN V

J. Fуска, I. Kuhr, A. Benda, L. Ivanov

Biotika, Nationalunternehmen, Slovenská Lupča

In Laboratoriumsversuchen haben die Autoren in 20 l Tanks die Produktion von Penicillin V beim Stamm *Penicillium chrysogenum NH* auf Böden mit Lactose, mit Saccharose, und mit Rübenmelasse verglichen. Dazu benutzten sie die Methode eines fortschreitenden Zusetzens der Lösungen der Zucker oder der Melasse während der Fermentation.

Die Ergebnisse erwiesen, dass es auf Böden mit Saccharose und Melasse möglich ist, höhere Ausbeuten als auf Böden mit Lactose zu erzielen. Dies lässt sich durch eine Verlängerung der Produktionsphase der Fermentation erklären.

Die Stämme *Penicillium chrysogenum NH 60* und *165/16*, die auf Böden mit Lactose eine höhere Produktion von Penicillin V ergeben als der Stamm *NH*, waren im Vergleich mit diesem Stamm auf einem Boden mit Melasse weniger produktiv.

Die Produktion von Penicillin V hängt von dem verwendeten Stamm, von der Konzentration der Zucker im Boden, und von der Geschwindigkeit des Zusetzens der Zucker während der Fermentation ab. Diese soll annähernd 0,5 % für jede 12 Std. sein.

Der ungünstige Einfluss einer hohen Konzentration von anorganischen Salzen und Betain kommt nicht bei allen Stämmen zum Ausdruck.

LITERATÚRA

1. Alicino J. F., *Ind. Eng. Chem.* **18**, 617 (1946).
2. Balan J., Betina V., *Biológia* **14**, 513 (1959).
3. Cooper C. M., Fernstrom G. A., Miller S. A., *Ind. Eng. Chem.* **36**, 504 (1944).
4. Johnson M. J., *Bull. World Health. Org.* **6**, 99 (1952).
5. Kocková-Kratochvílová A., *Praktikum technické mikrobiologie*, 242, 245. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1954.
6. Soltero F. V., Johnson M. J., *Appl. Microbiol.* **1**, 52 (1953).
7. Soltero F. V., Johnson M. J., *Appl. Microbiol.* **2**, 41 (1954).

Do redakcie došlo 28. 4. 1963

Adresa autorov:

Inž. Ján Fúška, prom. chemik Ivo Kuhr, inž. Antonín Benda, Leonid Ivanov, Biotika, n. p., Slovenská Lupča.