

Příspěvek ke stanovení biologické účinnosti syntetického desthiobiotinu

577.164.18

Ing. M. RUT - Ing. A. PROŠKOVÁ, Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, oddělení mikrobiálních výrob, Praha

Po vyřešení některých problémů při syntéze desthiobiotinu, přistoupila Lachema, n. p. k pokusné výrobě prvních šarží tohoto preparátu. Cena syntetického desthiobiotinu bude pravděpodobně taková, že preparát se bude využívat při výrobě pekařského droždí [1]. V současné době probíhají v některých našich droždárkách provozní zkoušky.

Ke stanovení účinnosti biotinu a jeho analogů existuje řada metod [2]. V této práci jsme použili mikrobiologického testu s mikroorganismem, pro který bude desthiobiotin průmyslově aplikován. Tímto způsobem se vyhneme možným diferencím, které způsobují druhotné a kmenové zvláštnosti. Stanovení jsme zaměřili tak, aby je mohla provádět kterákoliv provozní laboratoř. Principem stanovení je kvasná zkouška, při které se stanoví vliv množství zkoušeného preparátu na přírůstek kvasničné sušiny. Aby bylo možno nějak vyjádřit účinnost preparátu, provede se paralelně test se standardním preparátem biotinu. Účinnost se posuzuje podle dávky preparátu, která se vyrovná dávce standardu potřebné pro maximální nárůst biomasy.

Pro stanovení používáme sbírkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* (VÚKPS č. 56). Lze použít i jinou čistou droždářskou kulturu, je však nutno vyvarovat se kontaminace jinými kvasinkami, které obvykle nebývají citlivé na biotin. Jako měřítko vhodnosti kultury kvasinek pro toto stanovení slouží podmínka, že kvasinky po dostatečném pasážování na syntetické půdě bez biotinu musí vykazovat méně než 25 % nárůstu vzhledem k půdě plně saturevané biotinem. Kmen se ve sbírce uchovává obvykle na sladidlovém agaru, ze kterého si přináší určité množství zásobního biotinu. Proto je nutno kmen pasážovat na syntetické půdě bez biotinu. Pro pasážování jsme používali půdy pro stanovení pyridoxinu [3] s tím rozdílem, že místo biotinu byl přidáván pyridoxin (1 mg/1 liter). Část půdy byla ztužena 2 % agaru a pasážovalo se na tuhé i tekuté půdě. Jako testovací půdy bylo použito syntetického média podle Olsona a Johnsona [4], ale se zvýšeným obsahem glukózy. Melascová půda ani s minimálním množstvím biotinu se neosvědčila, protože dávala vysoké slepé pokusy, takže přesnost stanovení byla nedostačující.

Stanovení účinnosti desthiobiotinu

Použité půdy

Jako půda pro pasážování se používá půda pro stanovení pyridoxinu [3], ale místo biotinu se přidává 1 mg pyridoxinu na 1 liter půdy. Jako testovací půda se používá Olson-Johnsonovo syntetické médium [4] se 2 % glukózy.

Použitý kmen a jeho příprava

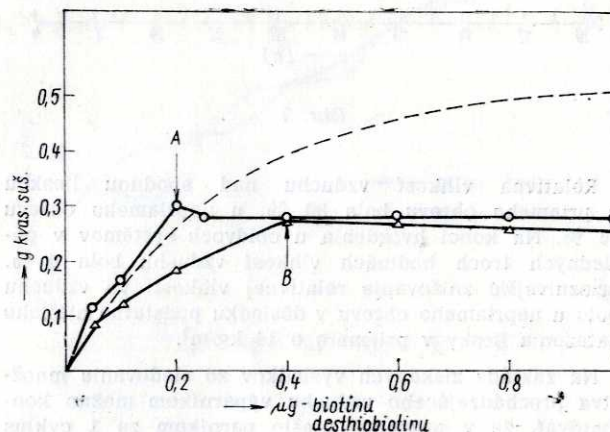
Kmen se přeočkuje ze sladidlového agaru na šikmý agar pro pasážování, nebo na tekutou půdu pro pasážování. Inkubuje se 1 až 2 dny při 30 °C. Pasážování se opakuje tak dlouho, až je nárůst velmi slabý. Takovéto inokulum dává nárůst na testovací půdě bez přidaného biotinu menší než 25 % vzhledem k nárůstu v testovací půdě plně saturevané biotinem. K zaočkování se používá 1 šikmý agar smytý 100 ml sterilní vody. Očkuje se 1 ml na 1 baňku.

Koztok standardu a zkoušeného preparátu

Navází se 10 mg preparátu nebo standardu (biotin Lachema) a spláchne se destilovanou vodou do odměrky na 1 liter, zalkalizuje se několika kapkami louhu a po rozpuštění se doplní po značku. Rozpuštění je možno urychlit zahřátím. Získané zásobní roztoky je možno uchovávat 1 až 2 týdny v chladničce a pracovní roztoky se z nich připravují ředěním 200krát (0,05 µg/ml).

Mikrobiologický test

Ke 100 ml testovací půdy v 500 ml baňkách se přidá pracovní roztok biotinu nebo desthiobiotinu (0,5 1,0 1,5 2,0 3,0 4,0 5,0 8,0 10,0 ml na baňku), inokulum (1 ml) a voda na celkový objem 111 ml. Kultivuje se nejméně 40 hodin při 30 °C na třepačce. Kvasničná sušina se stanoví po odstředění co největšího množství půdy po fermentaci a po promytí vodou. Výsledek se přepočte na celý objem baňky. Každá koncentrace biotinu a desthiobiotinu má minimálně dvě paralelní stanovení, která se nesmí lišit více než o 10 % rel. Pro grafické vyjádření se bere průměr paralelních stanovení a odečte se od něho průměrná hodnota nárůstu kvasničné sušiny v baňkách, do kterých nebyl přidán biotin ani desthiobiotin.



Obr. 1

Závislost růstu na množství biotinu a desthiobiotinu se vyjádří graficky a vyhledá se hodnota desthiobiotinu, při které bylo dosaženo maximálního nárůstu [B]. Stejná hodnota se vyhledá pro biotin [A]. Aktivita zkoušeného preparátu se vypočítá podle vztahu

$$\text{biol. účinnost} = \frac{A \cdot 100}{B}$$

Touto metodou byl analyzován preparát desthiobiotinu, který se v současné době zkouší v některých našich droždárkách. Výsledek je uveden na obrázku 1. Pro biotin je $A = 0,2 \mu\text{g}$, pro desthiobiotin $B = 0,4 \mu\text{g}$. Biologická účinnost preparátu je tudíž 50 %. Na obrázku je uvedena též obdobná závislost Whita a Munnse [5] na-

měřená ve fermentoru o účinném objemu 1,1 litru, přepočtená na stejnou koncentraci uhlíkatého zdroje s naším měřením (šrafovaná křivka). Rozdíly v nárůstu (po připočtení nárůstu ve slepém pokusu) odpovídají rozdílům ve výtěžnosti, jaké se obvykle naměří při fermentaci na třepačce a v době větraném fermentoru.

Rut, M. - Prošková, A.: Příspěvek ke stanovení biologické účinnosti syntetického desthiobiotinu. Kvas. prům. 19, 1973, č. 3, s. 60.

Pro stanovení účinnosti syntetického desthiobiotinu určeného k použití při výrobě pekařského droždí byla vypracována mikrobiologická metoda. Bylo použito drožďařského kmene kvasinek na syntetické půdě a bylo zjištěno, že syntetický desthiobiotin je účinným prekursorem biotinu. V porovnání s biotinem vykazuje 50 % aktivity.

Рут, М. — Прошкова, А.: К вопросу оценки биологической эффективности синтетического дестхиобiotина. Квасны прумысл 19, 1973, № 3, 60.

В статье описывается микробиологический метод, разработанный для определения эффективности синтетического дестхиобiotина, применяемого в производстве хлебопекарных дрожжей. При культивировании бактерий в синтетической питательной среде было установлено, что синтетический дестхиобiotин является весьма производительным провитамином биотина. Его эффективность достигает 50 % эффективности биотина.

Rut, M. - Prošková, A.: Beitrag zur Bestimmung des biologischen Wirkungsgrades des synthetischen Desthiobiotins. Kvas. prům. 19, 1973, No. 3. 60

Für die Ermittlung des Wirkungsgrades des synthetischen, zur Anwendung bei der Erzeugung von Backhefe bestimmten Desthiobiotins wurde eine mikrobiologische Methode ausgearbeitet. Es wurde ein Backhefestamm benützt und es wurde festgestellt, dass das synthetische Desthiobiotin ein wirksamer Precursor des Biotins ist. Das Desthiobiotin weist im Vergleich mit Biotin eine 50 % Aktivität auf.

Rut, M. - Prošková, A.: Determination of Biologic Efficiency of Synthetic Desthiobiotin. Kvasný průmysl 19, 1973. No. 3 60

The article deals with a microbiologic method which has been developed for the evaluation of the efficiency of synthetic desthiobiotin used for making baker's yeast. Experiments have been carried out with baker's yeast in synthetic medium and it has been found that synthetic desthiobiotin is a very good precursor of biotin. Its efficiency as compared with biotin is as high as 50 %.

Literatura

- [1] BERAN, K. - HOSPODKA, J. - HAUBA, J.: Použití prekursorů biotinu pro zvýšení výtěžku při výrobě pekařského droždí, ZN 35A/1980, OR lihovarů a konserváren
- [2] FRÄGNER, J. aj.: Vitaminy, jejich chemie a biochemie, Nakladatelství CSAV, Praha 1961, str. 325
- [3] JAM pro stanovení vitaminů, II. Stanovení pyridoxinu, STI PP, 1964, VII., č. 2, řada A, pořadí 2
- [4] OLSON, B. H. - JOHNSON, M. J.: J. Bact. 57, 1959, 235
- [5] WHITE, J. - MUNNS, D. J.: J. Inst. Brew, 66, 1950, 141