

2

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY PATENTU TYMCZASOWEGO

76481

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Kl. 30h, 2/20

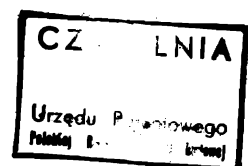
Zgłoszono: 18.02.1971 (P. 146317)

Pierwszeństwo: _____

MKP C12d 5/04

Zgłoszenie ogłoszono: 30.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 10.03.1975



Twórcy wynalazku: Tadeusz Szczęśniak, Leonard Karabin, Maria Szczepankowska,
Krystyna Wituch, Bogdan Rakowski, Halina Wośko,
Jerzy Meller, Zofia Olińska

Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania ryboflawiny metodą biosyntezy

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania ryboflawiny (witaminy B₂) metodą biosyntezy w podpowierzchniowej hodowli grzyba *Ashbya gossypii*.

Znane jest z opisu patentowego brytyjskiego nr 760072 wytwarzanie ryboflawiny w podpowierzchniowej hodowli grzyba *Ashbya gossypii* na pożywkach zawierających jako źródło węgla olej smalcowy, olej kukurydziany i olej sojowy. Uzyskiwane tą metodą wydajności ryboflawiny wynosiły 2280 (μg)ml płynu fermentacyjnego.

Postępem w tej dziedzinie był sposób ujawniony w opisie patentowym nr 59792, który polegał na wytwarzaniu ryboflawiny metodą biosyntezy w podpowierzchniowej hodowli grzyba *Ashbya gossypii* na pożywkach zawierających jako źródło węgla tłuszcz pożelatynowy w ilości 0,1–10% objętościowych. Uzyskiwane tą metodą wydajności wynosiły 3781 (μg)ml.

Metody podane w opisie patentowym nr 64983 oraz w opisie patentu dodatkowego nr 66611 stanowiły postęp w zwiększeniu wydajności produkcyjnej ryboflawiny. Według sposobu opisanego w patencie nr 64983 metoda wytwarzania ryboflawiny na drodze biosyntezy w podpowierzchniowej hodowli grzyba *Ashbya gossypii* na pożywkach zawierających jako źródło węgla tłuszcz pożelatynowy w ilości 0,1–10% wagowych, polegała na wstępnym pasażowaniu grzyba *Ashbya gossypii* przez odpowiednio dobrane pożywki stałe i płynne, a następnie hodowli w płynnej pożywce produkcyjnej zawierającej jako źródło azotu klej skórnny i/lub klej kostny. Uzyskiwane tą metodą wydajności ryboflawiny wynosiły 5910 (μg)ml.

Sposób z opisu patentowego nr 66611 polegał na wytwarzaniu ryboflawiny metodą biosyntezy w podpowierzchniowej hodowli grzyba *Ashbya gossypii* na pożywkach zawierających klej skórnny i/lub klej kostny jako źródło azotu i tłuszcz kostny lub skórnny jako źródło węgla. Uzyskiwane tą metodą wydajności ryboflawiny wynosiły 6420 (μg)ml.

Obecnie stwierdzono, że jeżeli jako źródło węgla w pożywkach zastosuje się tłuszcz utylizacyjny i/lub techniczny tran dorszowy uzyskuje się znaczne podwyższenie wydajności ryboflawiny tj. rzędu do 6930 (μg)ml i 7200 (μg)ml.

Tłuszcz utylizacyjny jest to mieszanina tłuszczów, uzyskanych w zakładach utylizacyjnych w wyniku przetopienia w tapialni różnych odpadowych tłuszczów pochodzenia zwierzęcego.

Surowcami do uzyskania tłuszczu utylizacyjnego mogą być tłuszcze: tłuszcz rzeźniany twardy - tłuszcze surowe bydlęce i baranie, tłuszcz rzeźniany miękki - tłuszcze surowe wieprzowe i końskie, surowy tłuszcz pogarbarski uzyskiwany w garbarni i surowy tłuszcz kanałowy.

Techniczny tran dorszowy jest produktem odpadowym przy produkcji mączki rybnej i innych przetworów rybnych.

Ilościowy i jakościowy skład kwasów tłuszczowych w tłuszczu utylizacyjnym i technicznym tranie dorszowym podano w tablicy I.

Sposób według wynalazku polega na stosowaniu wymienionych wyżej tłuszczów, utylizacyjnego i/lub technicznego tranu dorszowego, do pożywek bezpośrednio przed ich sterylizacją i podczas hodowli grzyba *Ashbya gossypii*.

Do płynnych pożywek produkcyjnych, będących roztworem lub zawiesiną nieorganicznych i organicznych składników pożywki, wprowadza się tłuszcz utylizacyjny i/lub techniczny tran dorszowy przed wyjałowieniem pożywki, w ilości od 0,1 do 6,0%, w stosunku do objętości pożywki, koryguje pH do wartości 6,6-7,2 i wyjaławia. Schłodzone pożywki posiewa się zawiesiną grzybni *Ashbya gossypii*. Podczas hodowli odpowiedni tłuszcz wprowadza się w sposób jałowy do pożywek, przygotowanych metodą wyżej opisaną, pomiędzy 0 i 120 godziną hodowli, w ilości od 0,1% do 5,0% wagowych w stosunku do objętości pożywki.

Zastosowanie tłuszczu utylizacyjnego i/lub technicznego tranu dorszowego do pożywek w podpowierzchniowej hodowli *Ashbya gossypii* prowadzi do zwiększenia wydajności produktów biosyntezy i zmniejszenia stopnia pienienia się pożywek.

Ponadto w wyniku zastosowania tłuszczu utylizacyjnego i technicznego tranu dorszowego, które są bardzo tanimi tłuszczami odpadowymi, jak i w wyniku uzyskania z tymi tłuszczami większych wydajności, obniżono koszt wytwarzania ryboflawiny.

Zwiększona wydajność ryboflawiny w pożywkach zawierających tłuszcz utylizacyjny jest spowodowana mechanizmem działania pewnych kwasów tłuszczowych występujących w tym tłuszczu, a nie występujących w tłuszczach takich, jak tłuszcz poželatynowy, tłuszcz kostny i tłuszcz skórny.

Kwasy tłuszczowe obniżają napięcie powierzchniowe między membranami komórkowymi i pożywką. W następstwie tego zmienia się przepuszczalność ściany komórkowej i tym samym zwiększa się przenikanie składników pożywki do wnętrza komórki oraz zwiększa się także wydzielenie z komórki do środowiska zewnętrznego ryboflawiny. Kwasy tłuszczowe są również bezpośrednio zużywane jako źródło węgla w wyniku procesu betaoksydacji.

Zwiększona wydajność ryboflawiny w pożywkach zawierających techniczny tran dorszowy jest spowodowana zarówno mechanizmem działania kwasów tłuszczowych występujących w tym tłuszczu a nie występujących w innych tłuszczach, ich zużywaniem jako źródło węgla jak i działaniem witamin, które znajdują się w tym tłuszczu w stosunkowo dużej ilości, mianowicie witamina A około 300 j.m./g, witamina D około 100 j.m./g, w mniejszych ilościach witaminy z zespołu B oraz śladowych ilościach witamina E.

Jak zostanie wykazane największą wydajność ryboflawiny otrzymuje się w pożywce, do której dodawany jest techniczny tran dorszowy dwukrotnie w 72 i 120 godzinie hodowli.

W przykładzie I wykazano, że sposobem według wynalazku można otrzymać wysokie wydajności ryboflawiny stosując płynne pożywki zawierające tłuszcz utylizacyjny i/lub techniczny tran dorszowy.

Wytworzoną ryboflawinę znajdującą się w płynach hodowlanych izoluje się jedną ze znanych metod chemicznych.

Sposób prowadzenia hodowli *Ashbya gossypii* i wydajności ryboflawiny w płynnej pożywce produkcyjnej zawierającej tłuszcz utylizacyjny i/lub techniczny tran dorszowy przedstawia szczegółowo przykład, w którym procenty oznaczają procenty wagowe o ile nie zaznaczono inaczej.

P r z y k ł a d. Przygotowano płynną pożywkę do otrzymania askospor grzyba *Ashbya gossypii* o składzie:

Glukoza czysta 1,0%

Tiamina HCl 0,1%

Woda drożdżowa (0,5% suchej masy) do 100,0% objętościowych.

Wartość pH pożywki nastawiono na pH = 6,8 roztworem wodorotlenku potasowego. Tak przygotowaną pożywkę rozlewano po 10 ml do probówek i wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut.

Probówki z pożywką szczepiono 5 dniową kolonią grzyba wyhodowaną na pożywce stałej.

Przygotowano pożywkę stałą do otrzymywania kolonii grzyba o następującym składzie:

Glukoza czysta (100,0% suchej masy) 2,0%

Agar 2,0%

Woda drożdżowa (0,5% suchej masy) do 100,0% objętościowych.

Wartość pH pożywki nastawiono roztworem wodorotlenku potasowego do 7,2 i wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut.

Pożywkę rozlewano do płytek Petri'ego po 20 ml. Pożywkę stałą szczepiono zawiesiną askospor wyhodowaną na pożywce płynnej. Inkubację przeprowadzano w temperaturze 28°C w ciągu 5 dni.

Otrzymane w ten sposób kolonie grzyba stosowano do szczepienia płynnej pożywki posiewowej I.

Przygotowano płynną pożywkę posiewową I do otrzymywania zawiesiny grzybni o składzie:

Glukoza czysta (100,0% suchej masy)	1,0%
Laktoza czysta (100,0% suchej masy)	0,3%
Pepton	0,5%
Ekstrakt drożdżowy	0,3%

Woda wodociągowa do 100,0% objętościowych.

Wartość pH pożywki nastawiono na 6,5 roztworem wodorotlenku potasowego, rozlewano po 50 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut.

Każdą kolbę z płynną pożywką posiewową I stałym szczepiono 5 dniową kolonią grzyba wyhodowaną na pożywce stałej.

Hodowlę prowadzono w zaciemnionym pomieszczeniu, na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach/minutę i mimośrodzie 25 mm w temperaturze 28° w ciągu 24 godzin.

Otrzymaną w ten sposób zawiesinę grzybni stosowano do szczepienia płynnej pożywki posiewowej II.

Przygotowaną płynną pożywkę posiewową o składzie:

Drożdże paszowe	2,0%
Tłuszcz utylizacyjny i/lub techniczny tran dorszowy	1,5%
Wyciąg namkowy kukurydzy (50,0% suchej masy)	3,0%
Woda wodociągowa do 100,0% objętościowych.	

Wartość pH pożywki nastawiono na 7,2, rozlewano po 50 ml do kolb Erlenmeyer'a 500 ml i wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut.

Każdą kolbę z płynną pożywką posiewową II szczepiono 1 ml zawiesiny grzybni z płynnej pożywki posiewowej I.

Otrzymaną w ten sposób zawiesinę grzybni szczepiono płynną pożywkę produkcyjną.

Przygotowano płynną pożywkę produkcyjną o składzie:

Klej skórny	3,0%
Wyciąg namkowy kukurydzy (50,0% suchej masy)	6,0%
Glicyna	0,15%
KH ₂ PO ₄	0,15%
Mg ⁺⁺	1 (μg)ml
Co ⁺⁺	2 (μg)ml
Mn ⁺⁺	5 (μg)ml
Zn ⁺⁺	10 (μg)ml

Woda wodociągowa do 100,0% objętościowych.

Wartość pH pożywki nastawiono na 6,8 roztworem wodorotlenku potasowego. Pożywkę rozlewano po 30 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i do każdej kolby dodawano tłuszcz utylizacyjny i/lub techniczny tran dorszowy w ilości 3,5% objętościowych. Pożywki wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 3 godzin.

Każdą kolbę z pożywką szczepiono 1 ml zawiesiny grzybni z płynnej pożywki posiewowej II.

Hodowlę prowadzono w zaciemnionym pomieszczeniu, na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach/min. i mimośrodzie 25 mm, w temperaturze 28°C, w ciągu 192 godzin.

Do każdej kolby z określonej partii pożywki produkcyjnej zawierającej tłuszcz utylizacyjny i/lub techniczny tran dorszowy w ilości 3,5% objętościowych dodawano taki sam tłuszcz w ilości 2,0% o objętościowych w 72, 96, 120 oraz 72 i 120 godzinie hodowli Ashbya gossypii.

Zawartość ryboflawiny po 192 godzinach hodowli w pożywkach do których dodawano tłuszcz utylizacyjny w różnych godzinach hodowli przedstawione są w tablicy 2.

Jak wykazano powyżej największą wydajność ryboflawiny otrzymano w pożywce, do której dodano tłuszcz utylizacyjny dwukrotnie w 72, i 120 godzinie hodowli.

Zawartość ryboflawiny po 192 godzinach hodowli Ashbya gossypii w pożywkach, do których dodawano techniczny tran dorszowy w różnych godzinach hodowli przedstawione są w tablicy 3.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania ryboflawiny metodą biosyntezy w podpowierzchniowej hodowli grzyba *Ashbya gossypii* przez wstępne pasażowanie grzyba *Ashbya gossypii* przy zastosowaniu pożywek, zawierających tłuszcze pochodzenia zwierzęcego jako źródło węgla w ilości 0,1–10% objętościowych, **znamienny tym**, że w płynnej pożywce posiewowej, a następnie w płynnej pożywce produkcyjnej jako źródło węgla stosuje się tłuszcz utylizacyjny i/lub techniczny tran dorszowy w ilości od 0,1% do 6,0% objętościowych, a podczas hodowli *Ashbya gossypii* w ilości od 0,1% do 5,0% objętościowych.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że tłuszcz utylizacyjny i/lub techniczny tran dorszowy wprowadza się do pożywki produkcyjnej podczas hodowli *Ashbya gossypii* pomiędzy 0–120 godziną hodowli.

Tablica 1

Ilość i jakość kwasów tłuszczowych w różnych tłuszczach odpadowych

Wzór sumaryczny kwasu tłuszczowego	Tłuszcz poželatynowy	Zawartość kwasów tłuszczowych w procentach			
		Tłuszcz kostny	Tłuszcz skórny	Tłuszcz utylizacyjny	Techniczny tran dorszowy
$C_{14}H_{26}O_2$	—	0,4	0,2	2,4– 0,3	—
$C_{14}H_{28}O_2$	1,4	1,5	1,2	0,6– 3,6	3,3
$C_{15}H_{30}O_2$	—	0,4	0,3	0,5– 3,2	0,5
$C_{16}H_{32}O_2$	23,5	24,3	25,2	15,0–25,5	16,9
$C_{16}H_{30}O_2$	4,0	3,1	2,0	3,0–12,5	13,6
$C_{16}H_{28}O_2$	0,5	—	—	1,2– 2,2	—
$C_{16}H_{26}O_2$	0,5	—	—	1,3– 2,5	—
$C_{17}H_{34}O_2$	—	1,1	0,9	0,8– 1,7	0,6
$C_{18}H_{36}O_2$	10,3	15,9	16,4	15,5–20,5	3,3
$C_{18}H_{34}O_2$	55,0	47,4	40,2	38,6–50,0	32,0
$C_{18}H_{32}O_2$	3,3	3,2	3,2	1,4– 2,9	5,4
$C_{18}H_{30}O_2$	—	—	—	—	3,0
$C_{20}H_{40}O_2$	—	0,4	0,3	1,1– 1,9	3,4
$C_{20}H_{38}O_2$	1,5	1,3	1,1	1,8– 3,2	1,6
$C_{20}H_{36}O_2$	—	—	—	—	1,1
$C_{20}H_{32}O_2$	—	—	—	—	1,4
$C_{22}H_{44}O_2$	—	—	—	—	1,1
$C_{22}H_{42}O_2$	—	—	—	—	12,6

Tablica 2

Czas dodawania tłuszczu utylizacyjnego			
72 godzina $\mu\text{g/ml}$	96 godzina $\mu\text{g/ml}$	120 godzina $\mu\text{g/ml}$	72 i 120 godzina $\mu\text{g/ml}$
3640	3690	3420	6930

Tablica 3

Czas dodawania technicznego tranu dorszowego			
72 godzina $\mu\text{g/ml}$	96 godzina $\mu\text{g/ml}$	120 godzina $\mu\text{g/ml}$	72 i 120 godzina $\mu\text{g/ml}$
3940	3970	3680	7200

