

C/2d 5/06.



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 46190

Kl. 30 h, 2/20

**Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polsa”
Przedsiębiorstwo Państwowe**

Warszawa, Polska

**Sposób otrzymywania z wysoką wydajnością witaminy B₁₂
lub kwasu propionowego**

Patent trwa od dnia 7 lipca 1961 r.

W procesie biosyntezy witaminy B₁₂ za pomocą bakterii propionowych otrzymuje się ubocznie jako produkt metabolizmu bakterii kwas propionowy w różnych, na ogół nieopisywanych w literaturze ilościach. W znanych sposobach wydajność witaminy B₁₂ starano się podwyższać stosując różne pożywki oraz pH brzożki fermentacyjnej albo również, jak podaje patent brytyjski nr 829232, natlenianie brzożki w końcowej fazie fermentacyjnej. Dzięki zmianom tych parametrów uzyskiwano różne wydajności witaminy B₁₂, które np. według patentu polskiego nr 42378 wynosiły przy 20-tu dniowej fermentacji 9-10 mg/litr brzożki fermentacyjnej, według patentu USA

nr 2816856 przy 4-ro dniowej fermentacji — 4,6 mg/litr, według Bernhauera (Congress of Microbiology in Stockholm August 1958) przy 8-mio dniowej fermentacji — 12 mg/litr, a według wspomnianego wyżej patentu brytyjskiego nr 829232 przy 5-6 dniowej fermentacji — 21-24 mg/litr.

Kwas propionowy otrzymywany przy produkcji witaminy B₁₂ nie stanowił dotychczas wartościowego produktu ubocznego zarówno ze względu na małą zawartość jego w brzożce, jak i trudności przy jego izolowaniu. Wiadomo jednak, że kwas propionowy jest cennym surowcem przy biosyntezie erytromycyny.

Celem wynalazku było znalezienie sposobu, za pomocą którego można byłoby uzyskać wysoką wydajność witaminy B₁₂, lub też, jak stwierdzono następnie, pogromadzić kwas w kierunku otrzymywania głównie kwasu propionowego.

x) Właściciel patentu oświadczył, że współtwórcami wynalazku są mgr Zygmunt Gmej, prof. dr Józef Janicki, mgr Ludomir Kotela, dr Jerzy Luba, dr Franciszek Będziwiłk i mgr Danuta Sikora.

Sposób według wynalazku polega na ścisłym regulowaniu stężenia czynników wzrostowych w brzeczce przez stosowanie inhibitorów lub przez blokowanie chemicznie (unieczynnianie) grup czynnych w przypadku pożywki zbyt bogatej w czynniki wzrostowe albo przez stosowanie stymulatorów wzrostu w przypadku pożywki zbyt ubogiej w czynniki wzrostowe. Sposobem według wynalazku można w stosunkowo krótkim czasie uzyskać wysoką wydajność witaminy B₁₂ albo kwasu propionowego.

Okazało się, że przy stężeniu czynników wzrostowych w ilości 5-12 mg w 1 litrze brzeczki uzyskuje się w czasie fermentacji trwającej około 100 godzin, na typowych pożywkach i przy wartości pH około 7 — około 25 mg witaminy B₁₂, natomiast przy stężeniu czynników wzrostowych w ilości około 50 mg na 1 litr w tych samych warunkach fermentacji uzyskuje się około 110 g kwasu propionowego w 1 litrze brzeczki.

Poniżej podaje się opracowaną na podstawie wynalazku tabelę, określającą zależność między stężeniem czynników wzrostowych a biosyntezą witaminy B₁₂ i kwasu propionowego:

Stężenie czynników wzrostowych w mg/l brzeczki	Wydajność witaminy B ₁₂ w mg/l brzeczki	Wydajność kwasu propionowego w g/l brzeczki	pH brzeczki	t°C fermentacji
5	25	30	7	30
10	24,5	48	7	30
15	22	55	7	30
20	19	65	7	30
25	16,5	70	7	30
30	14	75	7	30
35	11	85	7	30
40	8	95	7	30
45	5	100	7	30
50	3	100	7	30

Jak z tabeli wynika, stężenie czynników wzrostowych najkorzystniej utrzymywać jest przy biosyntezie witaminy B₁₂ w granicach 5-10 mg/litr brzeczki, natomiast przy biosyntezie kwasu propionowego — w granicach 45-50 mg/litr.

Tabela obejmuje najkorzystniejsze graniczne stężenia czynników wzrostowych. Przy zmniejszeniu ilości czynników wzrostowych poniżej 5 mg/litr brzeczki znacznie wzrasta, jak

stwierdzono, czas biosyntezy witaminy B₁₂, zaś przy zwiększeniu jego ilości ponad 50 mg/litr nie zwiększa się istotnie ilość otrzymywanego kwasu propionowego.

Przykład I. Do pożywki o składzie:

hydrolizat kazeiny	35 g
glikoza	100 g
MgCl ₂	0,4 g
H ₃ PO ₄	1 g
CoSO ₄	0,012 g
woda uzupełniona do	1000 ml

dodano czynników wzrostowych w ilości 5 mg (mieszanina biotyny i kwasu pantotenowego w stosunku 1:10). Pożywkę zaszczerpiono za pomocą 20% inoculum bakterii propionowych i inkubowano w temperaturze 30° C. Hodowlę prowadzono przez 4 doby utrzymując odczyn podłoża w granicach wartości pH = 6,8-7,2. W tak prowadzonej hodowli stężenie kwasu propionowego wynosiło 30 g/litr, a stężenie witaminy B₁₂ — 25 mg w 1 litrze brzeczki fermentacyjnej.

Przykład II. Do pożywki o składzie jak w przykładzie I dodano czynników wzrostowych w ilości 50 mg. Po czterodobowej hodowli prowadzonej według parametrów jak w przykładzie I uzyskano stężenie kwasu propionowego 100 g w 1 litrze brzeczki a witaminy B₁₂ — 3 mg/litr.

Przykład III. Pożywka o składzie:

wodny namok kukurydzy	86 g
glikoza	100 g
MgCl ₂	0,4 g
H ₃ PO ₄	1,0 g
CoSO ₄	0,012 g
woda uzupełniona do	1000 ml

po wyjałowieniu przy wartości pH = 7,5 zawiera czynniki wzrostowe w ilości około 5 mg/litr. Po 4-dobowej hodowli prowadzonej jak w przykładzie I uzyskano stężenie kwasu propionowego 40 g, a witaminy B₁₂ — 25 mg w 1 litrze brzeczki fermentacyjnej.

Przykład IV. Pożywka o składzie jak w przykładzie III wyjałowiona przy wartości pH = 4,5 — 5,8 zawiera w 1 litrze około 50 mg czynników wzrostowych. Po czterodobowej hodowli prowadzonej jak w przykładzie I uzyskano w 1 litrze brzeczki fermentacyjnej 105 g kwasu propionowego i 3,5 mg witaminy B₁₂.

Przykład V. Do pożywki o składzie jak w przykładzie III wyjałowionej przy wartości pH około 4,5 dodano 0,1 g benzoesu sodu (inhibitor). Po 4-dobowej hodowli prowadzonej jak w przykładzie I uzyskano w 1 litrze brzezki 23 mg witaminy B₁₂ i 50 g kwasu propionowego.

Przykład VI. Do pożywki o składzie jak w przykładzie III wyjałowionej przy wartości pH około 4,5 dodano 0,15 g Na₂S₂O₅ (0,1 g SO₂) działającego jako inhibitor. Po 4-dobowej hodowli jak w przykładzie I uzyskano w 1 litrze brzezki 24,5 mg witaminy B₁₂ oraz 48 g kwasu propionowego.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania z wysoką wydajnością witaminy B₁₂ lub kwasu propionowego przy

użyciu bakterii propionowych oraz przy wartości pH brzezki fermentacyjnej około 7, zamienny tym, że stężenie czynników wzrostowych w brzezce fermentacyjnej reguluje się przez stosowanie inhibitorów lub przez blokowanie chemicznie (unieczynnianie) grup czynnych albo przez stosowanie stymulatorów wzrostu tak, aby przy otrzymywaniu witaminy B₁₂ wynosiło 5-12 mg na 1 litr brzezki, natomiast przy otrzymywaniu kwasu propionowego około 50 mg/l.

Tarchomińskie Zakłady
Farmaceutyczne „Polfa“
Przedsiębiorstwo Państwowe

Zastępca: mgr inż. Antoni Sentek
rzecznik patentowy