



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900617919
Data Deposito	12/08/1997
Data Pubblicazione	12/02/1999

Priorità	96202254.7
Nazione Priorità	EP
Data Deposito Priorità	

Priorità	97200054.1
Nazione Priorità	EP
Data Deposito Priorità	

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	P		

Titolo

PRODUZIONE ED UTILIZZO DI COMPOSIZIONI COMPRENDENTI ALTE CONCENTRAZIONI DI ATTIVITA' DI VITAMINA B12.

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"Produzione ed utilizzo di composizioni comprendenti alte concentrazioni di attività di vitamina B12"

Di: GIST-BROCADES B. V., nazionalità olandese, Wateringseweg
1, PB Box 1, 2600 MA Delft, Olanda

Inventore designato: Hendrik Louis BIJL

Depositata il: 12 agosto 1997

TO 97A 000738

* * *

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce alla produzione di composizioni comprendenti vitamina B12 naturale.

Sfondo dell'invenzione

La vitamina B12 è un'importante vitamina per esseri umani ed animali. Essa è utilizzata per trattare l'anemia perniciosa, e la neurite periferica, ed è utilizzata come integratore dietetico. La vitamina B12 è anche un importante integratore alimentare per animali quale stimolatore della crescita.

Il termine vitamina B12 è utilizzato per descrivere composti della famiglia di corrinoidi di cobalto, in particolare quelli del gruppo della cobalamina. Il composto più utilizzato di questo gruppo è la cianocobalamina e come tale il termine vitamina B12 è qualche volta utilizzato per riferirsi alla cianocobalamina. In questa descrizione al

termine vitamina B12 dovrebbe essere attribuito il suo ambito più ampio di significato, così da comprendere tutti i corrianoidi di cobalto del gruppo della cobalamina, che comprendono in particolare cianocobalamina, idrossicobalamina, metilcobalamina e 5'desossiadenosilcobalamina, caratterizzati rispettivamente da un radicale ciano, idrossile, metile o 5'desossiadenosile. E' noto che i composti metilcobalamina e 5'desossiadenosilcobalamina sono instabili alla luce in forma isolata e sono facilmente trasformati in idrossicobalamina in soluzione acquosa. Per questa ragione, quasi tutte le preparazioni commerciali di vitamina B12 consistono della stabile cianocobalamina che, come tale, non è la forma chimica in cui si può trovare la vitamina B12 in natura. In questa descrizione il termine vitamina B12 naturale è definita in modo da comprendere tutte le forme chimiche della vitamina B12 naturalmente presenti in natura, la cianocobalamina essendo così esclusa.

La vitamina 12 è prodotta industrialmente mediante fermentazione microbica, utilizzando quasi esclusivamente le specie *Pseudomonas denitrificans* e *Propionibacterium*, poi convertendo la vitamina B12 naturale nella forma di cianocobalamina mediante procedimenti chimici comprendenti la cianurazione seguiti da estrazione e fasi di purificazione che utilizzano solventi organici (come riassunto da Spalla et al, 1989 "Microbial production of vitamin B12", in: Biotechnology



of vitamins, pigments and growth factors, E.J. Vandamme ed., Elsevier, London, New York, pagg. 257-284). La fase di conversione chimica ed ogni successiva fase di purificazione fanno sì che questo procedimento di produzione sia costoso, insicuro per gli operatori e pericoloso per l'ambiente.

A seguito dell'ingestione, animali ed esseri umani convertono la cianocobalamina in una delle forme naturali della vitamina B12, quali la metilcobalamina o la 5'-desossiadenosilcobalamina, che si richiede funzionino come un coenzima per parecchie conversioni biologiche (Ellenbogen, L., in: Handbook of vitamins. Nutritional, biochemical and clinical aspects; ed; L. J. Machlin, Marcel Dekker Inc., New York e Basilea). Inoltre un'efficace crescita degli animali richiede la presenza di un sufficiente quantitativo di vitamina B12 nell'alimentazione dell'animale. Le preparazioni di vitamina B12 sono frequentemente vendute come integratori alimentari come tali o come parte di una premiscela contenente addizionali vitamine ed altri additivi alimentari.

E' pertanto chiaro che una fornitura diretta di 5'-desossiadenosilcobalamina o metilcobalamina invece di cianocobalamina, sarebbe benefica. In vista dell'instabilità di questi due composti essi non sono prodotti in forma isolata, ma sono prodotti in formulazioni secche insieme con la biomassa dell'organismo in cui esse sono prodotti. Tali formulazioni sono ben adatte per l'uso come integratore alimentare per

animali. Per la produzione di metilcobalamina e di 5'-desossia-
denosilcobalamina, sono più preferiti batteri del genere
Propionibacterium, perché a differenza del P.denitrificans, i
batteri di questo genere hanno ottenuto la qualificazione di
GRAS (Generalmente riconosciuto come sicuro) dalla Food and
Drug Administration degli Stati Uniti e non sono noti come
produttori di tossine. Le specie di Propionibacterium sono
batteri Gram-positivi, aerotolleranti, non mobili, non
sporulanti, caratterizzati ulteriormente dalla produzione di
grandi quantità di acido propionico da carboidrati, acido
lattico ed alcool poli-idrossilici. Il genere Propionibacterium
ricade nella suddivisione elevata "GC" dei batteri Gram posi-
tivi (T.D. Brock, M.T. Madigan, J.M. Martinko e J. Parker in:
The Biology of Microorganisms, 7ª Ed., Prentice-Hall Interna-
tional Inc., 1994).

La domanda di brevetto RU 2001953 (Istituto Tecnico di
Ricerca di Enzimi Antibiotici) si riferisce ad un procedimento
di essiccamento a spruzzo per Propionibacterium shermanii che
è stato utilizzato per produrre 5'-desossiadenosilcobalamina
contenente biomassa. Metilcobalamina in biomassa da batteri
metanogenici è commercialmente disponibile dalla società
Gedeon Richter. Tuttavia, il contenuto di vitamina B12 in
queste preparazioni è limitato ad un livello in cui la
vitamina B12 è prodotta durante la fermentazione e, come
conseguenza, il contenuto di vitamina B12 in queste prepara-

zioni non eccede lo 0,1% (peso/peso). La concentrazione di vitamina B12 in una composizione è di solito misurata come il peso secco di vitamina B12 quale percentuale del peso secco della composizione.

Prodotti concentrati di cianocobalamina (cioè > 0.1% peso/peso) sono commercialmente disponibili. Tuttavia, macchine alimentatrici e preparatori di premiscele non possono utilizzare questo materiale perché, come conseguenza delle sue proprietà elettrostatiche, la cianocobalamina si segrega dal suo supporto con il trattamento in macchine alimentatrici e produttrici di premiscele, quando formulata a concentrazioni superiori allo 0,1% peso/peso. La segregazione è un particolare problema durante la setacciatura, vagliatura o quando si lascia riposare la composizione per un prolungato periodo di tempo.

La presente invenzione descrive un procedimento mediante il quale diventa possibile produrre una composizione che ha una concentrazione relativamente alta (> 0,1% peso/peso) di vitamina B12 naturale. Questi nuovi prodotti concentrati possono essere utilizzati ad esempio nell'alimentazione animale, per l'uomo o come ingredienti in cosmetici. Questi nuovi prodotti concentrati possono essere più convenientemente utilizzati e trasportati consentendo così una riduzione nei costi. Essi possono essere vantaggiosamente utilizzati da macchine alimentatrici e produttori di premiscele poiché essi

possono presentare una ridotta segregazione della vitamina B12 sul sopporto durante il trattamento. Il procedimento può essere facilmente effettuato su scala industriale ed è relativamente sicuro per l'ambiente poiché non vi è necessità di utilizzare solventi organici o cianurazione.

Descrizione dell'invenzione

La presente invenzione fornisce un procedimento per la preparazione di una composizione comprendente vitamina B12 naturale che ha una concentrazione di vitamina B12 sulla materia secca superiore allo 0,1% (peso/peso). Detto procedimento comprende le fasi di a) ottenere cellule microbiche contenenti vitamina B12 naturale, b) provocare l'apertura delle cellule microbiche in maniera tale che almeno parte del contenuto solubile delle cellule comprendenti vitamina B12 sia rilasciato in un liquido in cui le cellule sono contenute, c) separare le cellule aperte ed il liquido comprendente la vitamina B12, ed eventualmente d) preparare una miscela della vitamina B12 e di almeno una parte delle cellule aperte.

Le cellule microbiche contenenti vitamina B12 sono preferibilmente ottenute in un procedimento di fermentazione industriale utilizzando un microorganismo noto per produrre la vitamina B12. Questi includono batteri appartenenti ai generi di Acetobacterium, Aerobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Azotobacter, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Escherichia, Eubacterium, Flavobacterium, Methanobacil-

lus, Methanosarcina, Mycobacterium, Propionibacterium, Proteus, Pseudomonas, Rhizobium, Rhodopseudomonas, Salmonella, Serratia, Streptococcus, Streptomyces e Xanthomonas. Preferibilmente il batterio da utilizzare nel procedimento dell'invenzione è sicuro per il consumo da parte di essere umani e/o animali e non produce endotossine o esotossine. Più preferibilmente il batterio ha ottenuto la qualifica GRAS (generalmente riconosciuto come sicuro) da parte della Food & Drug Administration degli Stati Uniti. Il batterio più preferito per l'uso nel procedimento dell'invenzione è del genere Propionibacterium, le cui specie preferite sono P.freundenreichii o P.shermanii.

E' ben noto a persone esperte nel settore che la produzione industriale di vitamina B12, come quella di molti altri metaboliti microbici, è effettuata utilizzando ceppi che risultano da programmi destinati a migliorare le qualità desiderate di un particolare ceppo. Questi programmi consistono essenzialmente nel trattamento del ceppo di produzione con un agente mutagenico e nella selezione di mutanti che presentano una produttività migliorata od altri vantaggi. Sono state descritte parecchie tecniche per la selezione razionale di microorganismi mutanti che producono una sovraquantità di vitamina B12 (Spalla, C., Grein, A., Garofalo, L. e Ferni, G. Microbial production of vitamin B12 in: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors pagg. 257-284 (E.J.

Vandamme, ed.) Elsevier, London/NY, 1989). Tali ceppi mutanti sono utilizzati in procedimenti preferiti dell'invenzione e sono in grado di accrescere ulteriormente la concentrazione di vitamina B12 nelle composizioni ottenute.

Nell'invenzione il termine "vitamina B12 naturale" è definito in modo tale da comprendere tutte le forme chimiche della vitamina B12 presenti naturalmente in natura, la forma cianocobalamina della vitamina B12 essendo esclusa. Nei procedimenti e composizioni preferiti dell'invenzione la vitamina B12 naturale comprende 5'-desossiadenosilcobalamina e/o metilcobalamina.

Nel procedimento dell'invenzione le cellule microbiche contenenti vitamina B12 sono trattate in modo tale da causare la lisi od un'altra distruzione della membrana cellulare. Lisi descrive l'apertura delle cellule microbiche in modo tale che (almeno in parte) il contenuto solubile delle cellule comprendenti la vitamina B12 sia rilasciato in un liquido in cui sono contenute le cellule. Trattamenti preferiti per aprire le cellule sono trattamenti termici comprendenti la pastorizzazione od il riscaldamento in un'autoclave; trattamento con enzimi batteriolitici quali lisozima; distruzione meccanica delle cellule comprendente la macinazione o l'utilizzo di forze di taglio; trattamento con sostanze chimiche che causano una lisi cellulare quali detergenti o solventi organici; nonché combinazioni di questi trattamenti. La lisi od un'altra

distruzione delle membrana produce un lisato che può essere separato in fasi solida e liquida.

In un procedimento preferito dell'invenzione almeno parte della fase solida (cellule aperte) è addizionata alla fase liquida contenente la vitamina B12 naturale in modo tale che si ottiene una composizione che è una miscela comprendente biomassa, cioè cellule microbiche preferibilmente aperte, e vitamina B12 naturale. Il contenuto o concentrazione di vitamina B12 di questa composizione è espresso come percentuale in peso di vitamina B12 sulla base del contenuto di materia secca della composizione.

Il procedimento dell'invenzione produce composizioni aventi una concentrazione di vitamina B12 superiore a 0,1% (peso/peso) sulla materia secca. In procedimenti preferiti la composizione ha una concentrazione di vitamina B12 naturale superiore allo 0,2% in peso (peso/peso), più preferibilmente superiore allo 0,4% (peso/peso), ancor più preferibilmente superiore allo 0,6%, ancora più preferibilmente superiore allo 0,8% (peso/peso), e più preferibilmente superiore all'1,0% (peso/peso). E' preferibile che le concentrazioni di vitamina B12 delle composizioni dell'invenzione non superino il 10% (peso/peso), più preferibilmente le concentrazioni di vitamina B12 non superano il 5%.

Nel procedimento dell'invenzione la fase solida del lisato comprendente i residui cellulari che risultano dall'a-

pertura delle cellule è separata dal liquido contenente la vitamina B12 rilasciata. Alla persona esperta è disponibile una quantità di differenti tecniche di separazione solido-liquido per effettuare questa separazione, comprendendo le tecniche di centrifugazione e filtrazione. Un procedimento preferito per separare i residui cellulari solidi dal liquido contenente la vitamina B12 è l'ultrafiltrazione.

In un procedimento preferito dell'invenzione le cellule microbiche aperte sono lavate ed i liquidi di lavaggio sono combinati con la vitamina B12 ottenuta dopo separazione delle cellule ed il liquido contenente la vitamina B12. Preferibilmente il lavaggio è effettuato mediante diafiltrazione, acqua deionizzata essendo preferibilmente utilizzata per lavare le cellule aperte. Il diafiltrato contenente vitamina B12 è poi combinato con la fase liquido contenente vitamina B12.

In un procedimento preferito dell'invenzione, la fase liquido contenente vitamina B12 naturale è ulteriormente sottoposta ad un trattamento di essiccamento. Si può utilizzare un qualunque conveniente mezzo di essiccamento, quale ad esempio essiccamento a spruzzo, essiccamento a letto fluido, liofilizzazione, od essiccamento sotto vuoto.

In un procedimento preferito dell'invenzione, le cellule microbiche contenenti vitamina B12 sono lavate prima di essere sottoposte a lisi, così da accrescere ulteriormente la concentrazione di vitamina B12 sulla materia secca rimuovendo i

componenti del mezzo. Preferibilmente si effettua detto lavaggio utilizzando diafiltrazione in cui si utilizza preferibilmente acqua deionizzata.

In un ulteriore aspetto l'invenzione provvede composizioni comprendenti vitamina B12, che sono ottenibili in un procedimento dell'invenzione. Preferibilmente la maggioranza dell'attività della vitamina B12 in queste composizioni è nella forma di vitamina B12 naturale. Composizioni dell'invenzione sono caratterizzate dal fatto che la vitamina B12 è presente in una concentrazione sulla base della materia secca superiore allo 0,1% (peso/peso). In una composizione preferita dell'invenzione la concentrazione di vitamina B12 è superiore allo 0,2% (peso/peso), preferibilmente superiore allo 0,4% (peso/peso), più preferibilmente superiore allo 0,6%, ancora più preferibilmente superiore allo 0,8% (peso/peso), e più preferibilmente superiore all'1,0% (peso/peso). Tuttavia, preferibilmente le concentrazioni di vitamina B12 delle composizioni dell'invenzione non superano il 10% (peso/peso), più preferibilmente le concentrazioni di vitamina B12 non superano il 5%. Le composizioni dell'invenzione comprendono vitamina B12 ed un supporto che preferibilmente comprende biomassa ad esempio cellule intere e/o residui cellulari. La biomassa compresa in queste composizioni è preferibilmente derivata da un microorganismo in grado di produrre vitamina B12, quali i batteri sopra menzionati, di cui le specie

Propionibacterium sono le più preferite.

Le composizioni dell'invenzione sono preferibilmente composizioni secche, in cui secco è definito come avente un contenuto di acqua inferiore al 15% in peso, più preferibilmente inferiore al 10%, più preferibilmente inferiore al 5%.

In composizioni secche preferite dell'invenzione l'attività di vitamina B12 è distribuita sostanzialmente omogeneamente in tutta la polvere o polvere granulare contenente il supporto e la vitamina B12. Come risulta, l'attività di vitamina B12 in queste composizioni non si segrega in grande misura dagli altri costituenti nella composizione, in particolare quando esposta a forza gravitazionali, setacciatura, vagliatura o forze elettrostatiche durante il trattamento delle composizioni, anche quando utilizzata a concentrazioni superiori allo 0,1% (peso/peso). Il trattamento è qui inteso come comprendere il trattamento delle composizioni dell'invenzione per ottenere alimentazione e premiscele di alimentazione.

In un ulteriore aspetto dell'invenzione, la composizione dell'invenzione è utilizzata come o nella produzione di integratori alimentari promotori della crescita per animali. A questo fine le composizioni contenenti vitamina B12 sono addizionate ad altri componenti di alimentazione, sia direttamente o nella forma di una premiscela che contiene anche altre vitamine, minerali e/o ingredienti bioattivi. Come illustrato nell'esempio specifico, alimentare un animale con una dieta

comprendente una composizione dell'invenzione stimola la sua crescita.

In ancora un ulteriore aspetto dell'invenzione, le composizioni comprendenti vitamina B12 sono utilizzate come o nella produzione di un integratore alimentare per esseri umani e/o sono incorporate in preparazioni cosmetiche, quali shampoo, o lozioni per il corpo.

Esempi

Sperimentazione

Saggio della vitamina B12

L'attività della vitamina B12 è stata saggiata utilizzando il biosaggio torbidometrico basato sulla risposta alla crescita di *Lactobacillus Leichmanii* ATCC 7830 come descritto in dettaglio in: The United States Pharmacopoeia, The National Formulary, 1995, pagg. 1710-1721, United States Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville MD.

Concentrazioni di plasma B12

Il plasma B12 è stato misurato utilizzando un corredo di radiosaggio commercialmente disponibile (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel Hempstead, UK). Il campione di plasma è combinato con vitamina B₁₂ (⁵⁷Co) in una soluzione contenente ditiotreitolo e cianuro. La miscela è bollita per 30 minuti per disattivare proteine di legame endogene e per convertire le varie forme di vitamina B12 a cianocobalamina. La miscela è raffreddata e poi combinata con fattore intrinseco porcino purificato per

affinità, immobilizzato (legato a perle polimeriche). Questo regola e tampona il pH della miscela di reazione a 9,35. La miscela di reazione è poi incubata per 60 minuti a temperatura ambiente. Durante l'incubazione, le vitamine endogene e marcate competono per il limitato numero di siti di legame sulla base delle loro concentrazioni relative. La miscela di reazione è poi centrifugata a 1500g per 10 minuti. Le vitamine marcate e non marcate legate alle proteine di legame immobilizzate sono concentrate al fondo della provetta nella forma di un granulo e le vitamine non legate restano nel supernatante. Il supernatante è aspirato via e la radioattività associata con il granulo è misurata. Si preparano curve standard utilizzando standard di vitamina B12 in una base di albumina di siero umano. La concentrazione di vitamina B12 nel campione di plasma è determinato dalle curve standard. Le curve standard sono riportate graficamente e le incognite determinate utilizzando il calcolatore di saggio universale AssayZap, versione 2.32 (Biosoft, Cambridge, UK).

I campioni di plasma hanno richiesto di essere diluiti 10-50 volte per essere portati nel campo più sensibile del saggio.

Esempio comparativo 1

E' stata effettuata una fermentazione con *Propionibacterium freudenreichii* utilizzando un procedimento noto ai tecnici del ramo (si veda ad esempio Spalla et al, 1989

"Microbial production of vitamin B12", in: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, E.J. Vandamme ed., Elsevier, London, New York, pagg. 257-284). Un conveniente ceppo di *P. freudenreichii* è disponibile dall'American Type Culture Collection con il numero di riferimento ATCC 76207. E' stato ottenuto al termine della fermentazione un brodo che aveva una potenza di 5'-desossiadenosilcobalamina di 10 mg/l e con un contenuto di materia secca del 7,5%. L'essiccamento a spruzzo di questo brodo è risultato in un prodotto con una concentrazione di vitamina B12 dello 0,01%.

Al fine di ottenere una concentrazione più elevata di vitamina B12, è stata tentata una separazione solido-liquido del brodo. La vitamina B12 è intracellulare in *P. freudenreichii*, per la quale ragione la rimozione di componenti di mezzo (extracellulare) ed il successivo essiccamento a spruzzo della biomassa dovrebbero risultare in un prodotto essiccato a spruzzo con una più elevata concentrazione di vitamina B12.

Su scala di laboratorio è stata effettuata una fase di centrifugazione ad una gravità massima di 5000-6000*g. Questa forza g è comparabile con le forze centrifughe di centrifughe che sono utilizzate su scala industriale. Aliquote di 1000 ml di brodo sono state centrifugate in una centrifuga Beckmann JM/6E per 10 minuti a 5000 rpm. Tuttavia, non è stata ottenuta separazione di biomassa e brodo in queste condizioni.

Poiché forze centrifughe maggiori sono meno attraenti su

scala industriale per ragioni economiche, abbiamo saggiato se fosse possibile separare il liquido ed i solidi nel bordo utilizzando ultrafiltrazione.

2000 ml di brodo con una concentrazione iniziale di 4,5 mg di vitamina B12 per litro (vitamina B12 sulla materia secca pari allo 0,02%) sono stati ultrafiltranti mediante un modulo avvolto a spirale AMICON di 30 kD (0,09 m²) con una pressione di alimentazione di 1 bar. In queste condizioni è stato possibile concentrare il campione di vitamina B12 cinque volte. Il flusso medio di permeato era di 30 l/m² ora. La concentrazione di vitamina B12 nel concentrato era di 20 mg/l, mentre nel permeato sono stati rivelati meno di 0,2mg/l di vitamina B12. La concentrazione di vitamina B12 nel concentrato, quando espressa in termine di contenuto di materia secca, è stata dello 0,05%, confrontata con 0,02% prima dell'ultrafiltrazione.

Per ulteriormente accrescere il titolo della vitamina B12 sulla materia secca, abbiamo successivamente provato la diafiltrazione della biomassa.

Il concentrato di ultrafiltrazione come ottenuto nell'esperimento sopra descritto è stato lavato 6 volte con acqua deionizzata, il che è risultato in una potenza di vitamina B12 nel concentrato di 20 mg/l. Nel diafiltrato non è stata rivelata attività di vitamina B12. Il successivo essiccamento a spruzzo del concentrato è risultato in un

prodotto essiccato a spruzzo con una concentrazione di vitamina B12 dello 0,06%.

Concludiamo dagli esperimenti sopra riportati che non è possibile ottenere un prodotto con una concentrazione di vitamina B12 superiore allo 0,06% sulla base della materia secca, partendo da un brodo con un titolo di vitamina B12 di 5-10 mg/l.

Esempio 2

Al fine di prevenire la presenza di organismi di produzione vitali, cioè cellule vive, nel prodotto essiccato, è stata effettuata una fase di pastorizzazione a 65°C per 30 minuti su di un brodo che è stato ottenuto come descritto nell'esempio 1. Il brodo trattato è stato ultrafiltrato come sopra descritto.

E' stato osservato un permeato colorato di rosa con una concentrazione di vitamina B12 (sulla materia secca) dello 0,2-04%. Si pensa che la pastorizzazione causi la lisi (almeno in parte) delle cellule di *P. freudenreichii* ed il rilascio della vitamina B12 intracellulare nel mezzo. Questo può consentire di ottenere prodotti essiccati comprendenti concentrazioni di vitamina B12 variabili dallo 0,06% allo 0,3% (sulla base della materia secca), combinando il permeato ed il brodo pastorizzato prima dell'essiccamento a spruzzo.

Più in dettaglio 350 ml del brodo trattato a caldo sono stati ultrafiltrati nelle condizioni sopra descritte nell'e-

sempio 1. Il concentrato è stato diafiltrato con 2500 ml di acqua deionizzata. Il permeato trasparente colorato in rosa ed il diafiltrato sono stati combinati e mescolati con 750 ml di concentrato pastorizzato di ultrafiltrazione. La miscela è stata essiccata a spruzzo in un essiccatore a spruzzo di laboratorio Büchi, in cui la temperatura di entrata era regolata a 180°C e la temperatura di uscita era regolata a 104°C. La concentrazione di vitamina B12 del prodotto essiccato a spruzzo così ottenuto era dello 0,13%.

Esempio 3

Sono stati ottenuti 1200 l di brodo con una concentrazione di vitamina B12 di 8 mg/l in un impianto pilota di fermentazione di *P. freudenreichii* e sono stati ultrafiltrati in un modulo M37 di ultrafiltrazione DDS utilizzando membrane di 20 kD ed un flusso d'acqua iniziale di 38 l/m²h. La temperatura durante l'ultrafiltrazione è stata quella ambiente. Il flusso di circolazione era di circa 15 m³/g. La pressione di alimentazione è stata regolata a circa 7 bar. Il brodo è stato concentrato 11,5 volte (flusso medio di 23 l/m²h). Il concentrato è stato lavato con 500 l di acqua deionizzata a temperatura ambiente finché è stata raggiunta una conduttività di circa 3 mS/cm.

Il concentrato risultante è stato trattato a 90°C per sei ore. Parte del concentrato trattato a caldo è stato diafiltrato, risultando in un permeato contenente circa 300 l

di vitamina B12. Il trattenuto è stato conservato a 4°C.

Il permeato è stato concentrato su scala pilota su di un evaporatore di vetro a 40°C sotto vuoto, risultando in circa 6 l di concentrato.

Combinando e mescolando un appropriato quantitativo di trattenuto con il permeato concentrato, abbiamo composto una miscela che è stata essiccata a spruzzo in un essiccatore a spruzzo NIRO. La temperatura dell'aria all'entrata era regolata a 160°C e la temperatura di uscita era regolata a circa 90-95°C. In 5 ore di tempo di funzionamento sono stati essiccati a spruzzo circa 45 l della miscela (circa 9 kg/h). Questo è risultato in 1307 g di materiale essiccato a spruzzo con un'attività di vitamina B12 di 1100 mg/kg, cioè 0,11%.

Esempio 4

In un esperimento simile a quello descritto nell'esempio 3 è stata effettuata una fermentazione utilizzando il ceppo migliorato di *P. freudenreichii* CBS 929.97. La concentrazione risultante di vitamina B12 nel brodo di fermentazione era di 40 mg/l. L'ultrafiltrazione e la diafiltrazione sono state essenzialmente effettuate come descritto nell'esempio 3.

Utilizzando ultrafiltrazione, 100 l del brodo a 40 mg/l sono stati concentrati a 40 l. Utilizzando diafiltrazione, il concentrato è stato lavato con 200 l di acqua deionizzata. Il concentrato lavato risultante aveva un'attività di vitamina B12 di 96,5 mg/kg ed il 6,72% di materia secca (l'essiccamento

a spruzzo di questo concentrato lavato avrebbe dato un'attività di vitamina B12 dello 0,14%).

Il concentrato lavato è stato successivamente lisato a 90°C per 5 minuti, il che è stato seguito da una separazione dei residui cellulari nel liquido mediante ultrafiltrazione. La concentrazione di vitamina B12 potenziale del permeato ha raggiunto lo 0,87% sulla materia secca (calcolata da un'attività di vitamina B12 di 52,1 mg/kg e da un contenuto di materia secca dello 0,6%). Dopo preconcentrazione del permeato sotto vuoto a 55°C, differenti quantitativi di permeato e concentrato sono stati combinati ed essiccati. Le potenze di vitamina B12 dei prodotti essiccati ottenuti sono come sotto riportato:

concentrato:permeato	attività di vitamina B12 sulla materia secca
1:1	0,5%
3:7	0,65%
2:8	0,72%
8:2	0,29%

P.freudenreichii CBS 929.97 è stato depositato il 10 luglio 1997 al Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Paesi Bassi.

Esempio 5

Applicazione di vitamina B12 naturale in alimentazione animale

E' stata effettuata una prova con polli per confrontare

l'efficacia della vitamina B12 naturale con cianocobalamina. Un giorno vecchi polli maschi sono stati casualmente assegnati a gabbie. Sono stati tenuti otto animali per gabbia. Le gabbie sono state collocate in un pollaio artificiale riscaldato, ventilato ed illuminato. Gli animali sono stati vaccinati contro la malattia di New Castle al tempo di 1 e 14 giorni. Gli animali ricevevano le diete sperimentali a piacere dal giorno 1, i primi 10 giorni nella forma di briciole, successivamente nella forma di granuli. L'acqua era liberamente disponibile. L'esperimento è durato 28 giorni. Al 28° giorno gli animali sono stati pesati, è stato determinato il consumo di cibo e sono stati presi campioni di sangue. I campioni di sangue sono stati presi da 4 polli scelti a caso per gabbia. Il sangue è stato raccolto in provette eparinizzate. Le provette sono state centrifugate ed il plasma è stato congelato (-18°C), finché è stata effettuata l'analisi della vitamina B12. L'analisi è stata effettuata come sopra descritto sotto Sperimentazione (concentrazioni di plasma B12).

Sono stati compresi tre trattamenti in questo esperimento:

- I. Dieta basale senza aggiunta di vitamina B12.
- II. Dieta basale con aggiunta di cianocobalamina (30 parti per miliardo di sostanza attiva)
- III. Dieta basale con aggiunta di vitamina B12 naturale (30 parti per miliardo di sostanza attiva).

Ogni trattamento è stato replicato per 5 volte.

La composizione della dieta basale è presentata nella tavola 1, i risultati nella tavola 2.

Tavola 1. Composizione della dieta basale (in %)

Mais	55
Tapioca	1
Cibo di semi di soia	30
Semi di soia trattati a caldo	5
Piume	1
Olio di soia	2
Grasso animale	3
Vitamine*, minerali, amminoacidi	3

Contenuti calcolati:

Energia metabolica	13,3 MJ/kg
Proteine grezze	22,0%
Lisina (totale)	1,27%
Metionina+cisteina (totale)	0,95%

*: Senza vitamina B12

Tavola 2. Effetto di cianocobalamina e vitamina B12 naturale sulla crescita media, assunzione di cibo e rapporto di conversione di cibo fra i giorni 1 e 28 di età e sui contenuti di vitamina B12 del plasma del sangue al giorno 28.

	Crescita (g)	Assunzione cibo (g)	Rapporto di conversione di cibo.	Vit. B12 del plasma del sangue (ng/l)
Dieta di base	1139	1738	1.53	14
+ Cianocobalamina	1264	1782	1.41	32
+ Vitamina B12 naturale	1261	1771	1.40	41

Esempio 6

Segregazione di attività di vitamina B12 da un soporto

La segregazione del composto attivo dal soporto può essere causata dalla forma di particelle, densità e densità apparente, scorrevolezza, proprietà adesive ed elettrostatiche, contenuto di umidità ed igroscopicità. Questi procedimenti di segregazione possono avere luogo durante la produzione di premiscele e composti alimentari e durante il successivo trasporto e stoccaggio.

Questa segregazione è particolarmente critica nel caso di premiscele che comprendono microcomponenti quali vitamine ed elementi in traccia, macrocomponenti, quali minerali e sopporti.

Le proprietà di demiscelazione di esistenti preparazioni commerciali di cianocobalamina (ottenute da Rhône Poulenc sotto il nome commerciale Microvit® B12) sono state comparate con una preparazione di vitamina B12 naturale preparata come

descritta nell'esempio 4.

Il calcare è stato utilizzato come supporto per le esistenti preparazioni commerciali di cianocobalamina.

Le sostanze in prova sono state prelevate da un serbatoio di stoccaggio mediante un canale vibrante per formare un mucchio come mostrato nella figura 1.

Tre campioni sono stati presi dal centro e mescolati. La procedura è stata ripetuta con campioni dalla base del mucchio. I campioni sono stati analizzati per l'attività di vitamina B12 come sopra descritto e comparati con la miscela omogenea originale. Le deviazioni nei campioni dalla miscela omogenea originale sono calcolate con segue:

Deviazione alla base (%) = $\{(\text{concentrazione alla base} - \text{miscela a concentrazione originale}) / \text{miscela a concentrazione originale}\} * 100$

Deviazione al centro (%) = $\{(\text{concentrazione al centro} - \text{miscela a concentrazione originale}) / \text{miscela a concentrazione originale}\} * 100.$

Il confronto delle deviazioni alla base del mucchio ed al centro del mucchio delle composizioni di cianocobalamina e di vitamina B12 naturale dell'invenzione è mostrato nella tabella 3.

Tabella 3

Sostanza di prova	Test di separazione (%) Base del mucchio	Test di separazione (%) Centro del mucchio
Cianocobalamina 0.1%	< +10	< -10
Cianocobalamina 1%	+56	-78
Vitamina B12 naturale (0.9%)	+8	-12

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per preparare vitamina B12 naturale, il procedimento comprendendo:

(a) coltivare cellule microbiche in condizioni tali che esse producono intracellularmente vitamina B12 naturale; e

(b) lisare o distruggere in altro modo la membrana esterna delle cellule microbiche che hanno prodotto vitamina B12 naturale così da rilasciare la vitamina B12.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1 in cui la lisi produce un lisato e le fasi liquide e solide del lisato sono separate, la fase liquida contenendo la vitamina naturale B12.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 2 che ulteriormente comprende il lavare la fase solida del lisato e combinare liquidi di lavaggio con la fase liquida del lisato.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui il lavaggio della fase solida del lisato è effettuato mediante diafiltrazione.

5. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni da 2 a 4 che ulteriormente comprende aggiungere almeno parte della fase solida del lisato alla fase liquida contenente la vitamina B12 naturale.

6. Procedimento secondo una qualunque delle precedenti rivendicazioni, che ulteriormente comprende lavare le cellule microbiche prima della lisi.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 6, in cui il

lavaggio delle cellule microbiche prima della lisi è effettuato mediante diafiltrazione.

8. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni da 2 a 7 che ulteriormente comprende essiccare la fase liquida contenente la vitamina B12 naturale.

9. Procedimento secondo una qualunque delle precedenti rivendicazioni in cui le cellule microbiche sono cellule da uno o più dei generi batterici *Acetobacterium*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Flavobacterium*, *Methanobacillus*, *Methanosarcina*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Streptomyces* e *Xanthomonas*.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9 in cui le cellule microbiche sono cellule del genere batterico *Propionibacterium*.

11. Procedimento secondo una qualunque delle precedenti rivendicazioni in cui la lisi è effettuata mediante trattamento termico, pastorizzazione, trattamento con enzimi batteriolitici, distruzione meccanica o trattamento chimico, sia singolarmente che in combinazione l'uno con l'altro.

12. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni da 2 ad 11, in cui la separazione delle fasi solida e liquida del lisato è effettuata mediante ultrafiltrazione o microfil-

trazione.

13. Procedimento secondo una qualunque delle precedenti rivendicazioni in cui la vitamina B12 naturale è 5'-desossia-denosilcobalamina o metilcobalamina.

14. Composizione comprendente vitamina B12 naturale in un quantitativo maggiore dello 0,1% in peso sulla base del contenuto di materia secca della composizione.

15. Composizione secondo la rivendicazione 13 che è ottenibile mediante il procedimento definito in una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 13.

16. Composizione secondo la rivendicazione 14 o 15 che è una composizione secca in cui la vitamina B12 naturale è distribuita sostanzialmente omogeneamente per tutta la composizione ed in cui la vitamina B12 non si segrega dagli altri componenti quando sottoposta a setacciatura, vagliatura, forze gravitazionali o forze elettrostatiche.

17. Composizione secondo una qualunque delle rivendicazioni da 14 a 16, che comprende biomassa.

18. Composizione secondo la rivendicazione 16, in cui la biomassa è derivata da batteri dei generi Acetobacterium, Acetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Azotobacter, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Escherichia, Eubacterium, Flavobacterium, Methanobacillus, Methanosarcina, Mycobacterium, Propionibacterium, Proteus, Pseudomonas, Rhizobium, Rhodopseudomonas, Salmonella, Serratia,

Streptococcus, Streptomyces e Xanthomonas sia singolarmente che in combinazioni di due o più.

19. Composizione secondo la rivendicazione 18 in cui il genere è Propionibacterium.

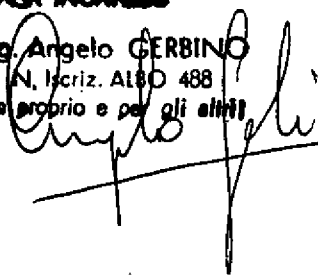
20. Composizione secondo una qualunque delle rivendicazioni da 14 a 19 in cui la vitamina B12 naturale è 5-desossiadenosilcobalamina o metilcobalamina.

21. Utilizzo di una composizione secondo una qualunque delle rivendicazioni da 14 a 20 nella produzione di un integratore alimentare.

22. Utilizzo di una composizione secondo una qualunque delle rivendicazioni da 14 a 20 nella produzione di una preparazione cosmetica.

PER INCARICO

Ing. Angelo GERBINO
N. Iscriz. ALBO 488
(la proprio e per gli altri)



LABBAGGI & PERANI S.p.A.

TEST DI SEPARAZIONE

