

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) 185 652

A bejelentés napja: (22) 81. 09. 04.

(21) 2562/81

A bejelentés elsőbbsége:

(33)

SU

(32)

80. 09. 04.

(31)

(298 14 23)

A közzététel napja: (41) (42) 84. 01. 28.

Megjelent: (45) 87. 11. 25.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO;
C 12 P 17/12;
C 12 R 1/125

Feltaláló(k): (72)

KUKANOVA Anna Jakovlevna, fiziológus,
ZSDANOV Viktor Grigorjevics, agronómus,
SZTEPANOV Anatolij Ivanovics, gyógyszerész

Szabadalmas: (73)

Vszeszojuznij Naucsno—Issledovatyelszkij Insztitut Genetiki
i Szelekci Promislennih Mikroorganizmov — VNII Genetiki
Moszkva, SU

(54)

ELJÁRÁS RIBOFLAVIN MIKROBIOLÓGIAI ÚTON TÖRTÉNŐ ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya mikrobiológiai eljárás riboflavin előállítására a *Bacillus subtilis* faj riboflavin termelésére képes mikroorganizmusának levegő jelenlétében végzett szubmerz tenyésztésével szén- és nitrogénforrást, a szükséges ásványi sókat és a növekedést elősegítő anyagokat tartalmazó tápközegben. A találmány szerinti eljárást úgy végzik, hogy a *Bacillus subtilis* faj riboflavin termelésére képes mikroorganizmusaként a WNIIGenetika—304, CMJM B—2116 szám alatt letétbehelyezett vagy a WNIIGenetika—304a, CMJM B—2117 száma alatt letétbehelyezett törzsét alkalmazzák.

A találmány tárgya eljárás riboflavin mikrobiológiai úton történő előállítására.

A riboflavint (B_2 -vitamint) széles körben alkalmazzák a mezőgazdaságban, a gyógyszer- és az élelmiszeriparban. A mezőgazdaságban főként állati takarmányadalékként használják fel.

Ismert olyan eljárás riboflavin előállítására, amelynek során az *Eremothecium ashbyi* gombát szubmerz körülmények között tenyésztik. A 389 132 és a 368 302 számú szovjet szerzői tanúsítványok szerint az *E. ashbyi* gomba 96 órán keresztül hidrolt (keményítő előállításánál keletkező hulladék, glükóztartalma mintegy 50%) és kukoricafehérjét tartalmazó szója-tápközegben történő tenyésztés során 2000 mg/l mennyiségig terjedő mennyiségű riboflavint termel.

Ismert, hogy a növényi olajban, zsírsavakban, glicerinnel vagy lecitinnel gazdag tápközegekben a gombatörzsek termelékenysége megnő. Az 1 767 260 számú Német Szövetségi Köztársaság-beli szabadalmi leírás szerint a 3%-nál nagyobb mennyiségű glükózt, linolsavat, vajsavat vagy glicerint, ammónium-glutamatot, vitaminokat tartalmazó tápközegben tenyésztett *E. ashbyi* kultúrák 3800 mg/l riboflavint termelnek. A 2 028 355 számú Német Szövetségi Köztársaság-beli szabadalmi leírás szerint az *E. ashbyi* gombát olyan tápközegben tenyésztik, amely 1–5% glükózt, növényi olajat, 5% kollagént, 0,5–5% lecitint, kukoricafehérjét tartalmaz. Ilyen körülmények között 4500–5000 mg/l riboflavin termelődik.

Az *E. ashbyi* kultúrával mikrobiológiai úton történő riboflavin előállításának a legnagyobb előnye a nagy bioszintetikus aktivitás. Ezzel szemben a riboflavin termelésére képes gombatörzsek nemkívánat tulajdonságokkal rendelkeznek. Ilyenek a hosszú növekedési periódus, amely a fermentáció idejét megnöveli, valamint az idegen mikroflóra szennyeződésekkel szembeni érzékenység és a tápközeg összetételével kapcsolatos megszorítások, amely szerint sok drága és nehezen hozzáférhető komponens szükséges. Annak elkerülése céljából, hogy az *E. ashbyi* kultúrában ne keletkezzenek idegen mikroflórák, a fermentációs tápközegbe antibiotikumokat visznek be, ezek azonban lényegesen megnövelik a fermentáció költségeit. Az *E. ashbyi* gomba tenyésztésénél a fermentációs tápközegben alkalmazott komponensek, mint például a különböző zsírok, glicerinnel, zsírsavak, lecitinnel nehezen hozzáférhetőek és drágák.

Másik ismert eljárás szerint (3 900 368 számú amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírás) a riboflavint a *Bacillus subtilis* faj szubmerz körülmények közötti tenyésztésével állítják elő. Ebben az eljárásban a FERM—P 1657 és FERM—P 2292 számú *B. subtilis* indukált mutánsait, különösen a nagy mennyiségben jelen lévő purinnal és purinanalógokkal szemben ellenálló vagy a purinokkal szemben auxotróf mutánsokat alkalmazzák. Ezeket a mutánsokat 8% glükózt, ásványi savat, növekedést elősegítő komponenseként élesztő kivonatot, peptont, glutaminsavat, RNS(ribo-

nukleinsav)-preparátumot, purint vagy purinanalógokat tartalmazó tápközegben tenyésztik. A 44 órás fermentáció alatt 560 mg/l riboflavint termelődik a tenyészfolyadékban. Ennek az eljárásnak az előnye a baktériumok gyors növekedési sebessége és ezzel együtt a fermentációs idő csökkenése. Az eljárásban alkalmazott *Bacillus subtilis* mutáns törzsek aktivitása azonban alacsony. Az eljárás hátránya ezen kívül, hogy a tápközegben alkalmazott komponensek, mint például az RNS-preparátumok, a purin, a purinanalógok nehezen hozzáférhetőek és ennek következtében az eljárás ipari méretekben nehezen alkalmazható.

Találmányunk célja olyan mikrobiológiai eljárás kifejlesztése riboflavin előállítására, amellyel a fermentáció ideje lerövidíthető és ezzel költsége csökkenthető, anélkül, hogy a termék hozama csökkenne.

A találmány feladata a *Bacillus subtilis* fajba tartozó riboflavin termelésére alkalmas új törzs kifejlesztése, amelynek nagy a flavinogén-aktivitása.

A fentieknek megfelelően találmányunk tárgya eljárás riboflavin előállítására a *B. subtilis* fajba tartozó riboflavin termelésére alkalmas mikroorganizmusok levegő jelenlétében végzett szubmerz tenyésztésével olyan tápközegben, amely szén- és nitrogénforrásokat, valamint a szükséges ásványi sókat tartalmazza. A találmány szerint riboflavint termelő mikroorganizmusként a *B. subtilis* WNIIGenetika—304, CMJM P—2116 szám alatt letétbehelyezett, vagy a WNIIGenetikai—304a, CMJM B—2117 szám alatt letétbehelyezett törzseit alkalmazzuk.

Az említett törzseket 1980. július 22-én helyeztük letétbe a „WNIIGenetika” Intézet Ipari Mikroorganizmusok Központi Múzeumában. A törzsek nevében szereplő „WNIIGenetika” megjelölés az „Ipari Mikroorganizmusok Genetikájával és Szelekciójával Foglalkozó Össz nemzeti Kutatóintézet” rövidítése.

A „CMJM” megjelölés az „Ipari Mikroorganizmusok Központi Múzeuma”-nak rövidítése.

Az említett termelő törzsek kiindulási tenyészetét az ismert *B. subtilis* SHWG törzs szolgál, amelyből egymástól független mutánsokat kapunk, amelyekkel a riboflavin szintetizálható: ros^R — roseflavinnal szembeni ellenállóképesség, rib^C — a szabályozó génben végbemenő mutáció, AGR — 8-azaguaninnal szembeni ellenállóképesség. Ezt követően genetikai módszerekkel előállítjuk a ros^R — rib^C — AGR háromszoros mutáns, amelyet ezután nitrozo-guanidinnal, nitrozo-metil-karbamiddal kezelünk, ultraibolya sugárzással sugárzunk be, majd az aktív variánsokat szelektáljuk. Így kapjuk a két törzset.

A WNIIGenetika—304 törzs prototróf, a WNIIGenetika—304a törzs auxotróf mikroorganizmus, növekedési szükségletük nincs meghatározva. Mindkét törzs oligo-spóráképző. A spórák száma a kiindulási tenyészethez viszonyítva 3–4 nagyságrenddel alacsonyabb. A riboflavin termelésére képes WNIIGenetika—304 és WNIIGenetika—304a törzsek tenyésztési-morfológiai tulajdonságait a táblázat tartalmazza.

Táblázat

Jellemző	WNII Genetika—304 törzs	WNII Genetika—304a törzs
Mikroszkóp alatti morfológia	2—3 µm hosszú spóráképző gram-pozitív bacillus	
Morfológia különböző tápközegekben	28—37 °C hőmérsékleten a növekedés 1—2 napján 3—4 mm átmérőjű csillagszerű tenyészeteket képez, ezeknek széle nem sima, felülete sima, fényes, sárgás színű	
Hús-pepton-agar (FPA)	a szag alapján mérsékelt növekedés, főleg a táptalaj felületén	
Hús-pepton-bouillon (FPB)	a növekedés rázás nélkül a folyadék felületén film formájában történik	
Szűrt tenyészet minimál táptalajon, glükózzal	a növekedés 2. napján 2—3 mm átmérőjű a minimál táptalajon növekedés nincsen tenyészeteket képez, világossárga színű, ultraibolya sugárzás hatására sárgán fluoreszkál, a tenyészetek kerek, szélek sima, fényesek	
Fiziológia tulajdonságok	20—42 °C hőmérsékleten (optimum 37 °C) növekszik, a pH-érték 5,0—9,0 (optimum 7,0—8,0) szénforrások: jól hasznosítja a glükózt, szacharózt, keményítőt alkoholok: az etanolt és a szorbitot hasznosítja nitrogénforrások: jól asszimilálja az ammóniumsókat, karbamidot, nitrátot a zselatint elfolyósítja	

A találmány szerinti eljárást általánosságban a következők szerint hajtjuk végre.

A WNII Genetika—304 és WNII Genetika—304a törzseket az oltóanyag előállítás céljából 1—2 napig agarizált Hottinger-tápközegben (Birger M. O.: Szpravocnyik po mikrobiologicseskim i viruszologicseskim metodam isledovanyija, Moszkva, Medicina, 1973) vagy hús-pepton-agaron (FPA) tenyésztjük 28—37 °C hőmérsékleten. A sejtszuszpenziót ezután melaszt, a takarmányélesztő száraz biomasszáját és ásványi sókat tartalmazó tápközegbe vagy tisztított burgonyadarabokat vagy hús-pepton-bouillont tartalmazó, lombikban elhelyezett tápközegbe visszük. Az oltóanyagot 200 ford/perc sebességű rázóasztalon tenyésztjük 17—24 órán keresztül. Az oltóanyag 5—10%-át ezután a főfermentációs tápközegbe visszük. A fermentációt Erlenmeyer lombikban rázóasztalon végezzük 46—50 órán keresztül, 37 °C hőmérsékleten, 6,5—7,5 pH-érték (a fermentáció kezdetén) mellett. Az alkalmazott tápközeg szénforrásokat — például glükózt, szacharózt, nyers cukrot, melaszt, keményítőt — ásványi nitrogénforrásokat — például ammóniumsókat, karbamidot, nitrátot —, foszforsókat — például kálium-foszfátot, ammónium-foszfátot és egyéb sókat —, mangánsókat — például mangán-dikloridot, mangán-szulfátot —, valamint növekedést elősegítő anyagokat, például a takarmányélesztő biomasszáját, takarmányélesztőhidrolizátumot és -autolizátumot, étkezési élesztőt, élesztőkivonatot, kukorica- és szójaszisztet, kukoricalekvárt, kazeinhidrolizátumot, peptont tartalmaz. 46—50 órás fermentáció után a tenyészfolyadékban 700—1000 mg/l riboflavin található.

A riboflavin előállítására szolgáló találmány szerinti eljárásban a megadott törzsek alkalmazásával 46—50 óra alatt szintetikus vagy komplex tápközegben lombikban való tenyésztés során a tenyészfolyadékban 1000 mg/l mennyiségű riboflavin keletkezik, amely 40%-kal nagyobb aktivitást jelent, mint a

3 900 368 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás szerint alkalmazott B. subtilis tenyészet aktivitása. A találmány szerinti törzsek ezen felül egyszerű, nem drága komponenseket tartalmazó tápközegben jól tenyésztethetők.

A találmány szerinti eljárást összehasonlítva azzal az eljárással, amelyben a riboflavin előállításához termelőként az E. ashbyi gombát alkalmazzák, megállapíthatjuk, hogy a fermentáció meggyorsulása következtében a találmány szerinti eljárás 1,5—2-szer gazdaságosabb, mivel a baktérium-tenyészetek gyorsabban nőnek, mint a gombatenyészetek. Nem lebecsülendő az sem, hogy a B. subtilis tenyészet érzékenysége az idegen mikroflórakkal szemben — összehasonlítva gombák érzékenységeivel — kisebb, ami különösen azért fontos, mert így nem szükséges a fermentációs tápközeghez antibiotikumot adni, és ez az ipari méretekben végrehajtott eljárást lényegesen olcsóbbá teszi.

Találmányunkat a következőkben példákkal mutatjuk be.

1. példa

Ferde hús-pepton-agaron (FPA) tenyésztett 24 órás B. subtilis WNII Genetika—304 tenyészetet 6% melaszt, 1% takarmányélesztő száraz biomasszáját és a következőkben megadott ásványi sókat tartalmazó folyékony oltó tápközegbe oltunk be. (Az oltó tápközeg a főfermentációs tápközeg steril vízzel kétszeresre történő hígításával nyerjük. A főfermentációs tápközeg összetételét a következőkben adjuk meg.) Az oltóanyagot 750 ml-es Erlenmeyer lombikban (a közege térfogata 25—100 ml) 200 ford/perc sebességű rázóasztalon 17 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten tenyésztjük. A kapott oltóanyagot 5% mennyiségben a következő összetételű főfermentációs tápközeghez adjuk:

melasz	12	súly%
takarmányélesztő száraz biomassa	2	súly%
ammónium-szulfát $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0,2	súly%
kálium-dihidrogén-foszfát (KH_2PO_4)	0,6	súly%
kálium-hidrogén-foszfát (K_2HPO_4)	1,4	súly%
magnézium-szulfát (MgSO_4)	0,01	súly%
nátrium-citrát $(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$	0,1	súly%
pH = 7,0—7,2		

A fermentációt 200 ford/perc sebességű rázóasztalon 750 ml-es Erlenmeyer lombikban (a közeg térfogata 25 ml) 37 °C hőmérsékleten végezzük. A fermentációt a megadott körülmények között 48 órán keresztül végezzük, így a tenyészfolyadék 800 mg/l riboflavint tartalmaz.

2. példa

A fermentációt az 1. példában leírtak szerint végezzük, azzal az eltéréssel, hogy a WNIIGenetika—304a törzset használjuk. 48 óra fermentálás után a tenyészfolyadék 1000 mg/l riboflavint tartalmaz.

3. példa

A főfermentációs tápközeg és a fermentáció körülményei az 1. példa szerintiék, termelőként a WNIIGenetika—304 törzset használjuk. Az 1. példában leírtakhoz viszonyítva a különbség az oltó tápközeg összetételében van. Az oltó tápközeget a következők szerint készítjük. Burgonyának a héját lehámozzuk, a burgonyát darabokra vágjuk, kis mennyiségű vízzel leöntjük, majd $0,8 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^5$ Pa nyomáson sterilizáljuk. Az oltó tápközeget hús-pepton-agar (FPA) ferde tenyésztetről oltjuk és a tenyészetet 750 ml-es Erlenmeyer lombikban (a közeg térfogata 50—100 ml rázóasztalon 20 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten növesztjük. A főfermentációs tápközeget 10% oltóanyaggal oltjuk be és fermentációt az 1. példában leírtak szerint végezzük. 48 órás fermentálás után a tenyészfolyadék 900 mg/l riboflavint tartalmaz.

4. példa

A tenyésztést a 3. példában leírtakkal azonos módon végezzük, azzal az eltéréssel, hogy a B. subtilis WNIIGenetika—304a törzset alkalmazzuk. 48 óra fermentálás után a tenyészfolyadék 900 mg/l riboflavint tartalmaz.

5. példa

A tenyészet, az oltó tápközeg, a fermentáció körülményei az 1., 2., 3. vagy 4. példa szerintiék. A különbség a főfermentációs tápközeg összetételében van, amely a következő:

szacharóz (vagy nyers cukor)	10	súly%
takarmányélesztő száraz biomassa	3	súly%
ammónium-szulfát $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0,2	súly%
kálium-dihidrogén-foszfát (KH_2PO_4)	0,6	súly%
kálium-hidrogén-foszfát (K_2HPO_4)	1,4	súly%
magnézium-szulfát (MgSO_4)	0,01	súly%

48 órás fermentálás után a tenyészfolyadék 700 mg/l riboflavint tartalmaz.

6. példa

Ferde hús-pepton-agaron tenyésztett 24 órás WNIIGenetika—304 törzs tenyészetet hús-pepton bouillon oltó tápközegebe viszünk és az oltóanyagot 37 °C hőmérsékleten 10 órán keresztül készítjük rázóasztalon. Az oltóanyagot 10% mennyiségben a következő összetételű főfermentációs tápközegebe visszük:

glükóz	8	súly%
élesztőextraktum	0,5	súly%
kazein- vagy peptonhidrolizátum	0,02	súly%
ammónium szulfát $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0,2	súly%
kálium-dihidrogén-foszfát (KH_2PO_4)	0,6	súly%
kálium-hidrogén-foszfát (K_2HPO_4)	1,4	súly%
magnézium-szulfát (MgSO_4)	0,01	súly%
nátrium-citrát $(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$	0,1	súly%
pH = 7,1—7,2		

A fermentációt 200 ford/perc sebességű rázóasztalon végezzük 48—50 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten. 48 óra fermentálás után a tenyészfolyadék 1000 mg/l riboflavint tartalmaz.

Szabadalmi igénypontok

1. Mikrobiológiai eljárás riboflavin előállítására a Bacillus subtilis faj riboflavin termelésére képes mikroorganizmusának levegő jelenlétében végzett szubmerz tenyésztésével szén- és nitrogénforrást, a szükséges ásványi sókat és a növekedést elősegítő anyagokat tartalmazó tápközegeben, *azzal jellemezve*, hogy a Bacillus subtilis faj riboflavin termelésére képes mikroorganizmusaként a WNIIGenetika—304, CMJM B—2116 szám alatt letétbehelyezett vagy a WNIIGenetika—304a, CMJM B—2117 szám alatt letétbehelyezett törzset alkalmazzuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a tenyésztést szénforrásként szacharózt, glükózt vagy melaszt, növekedést elősegítő anyagként a takarmányélesztő vagy étkezési élesztő száraz biomasszáját vagy élesztőextraktumot tartalmazó tápközegeben végezzük.

Ábra nélkül

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
Megjelent a Műszaki Könyvkiadó gondozásában
87-848 — Szegedi Nyomda