

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 24.VII.1964 (P 105 300)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 30.VI.1966

Kl. 53 g, 3/01

MKP A 23 k

1/16

UKD

Współtwórcy wynalazku

i Roman Majchrzak, Warszawa (Polska), Zygmunt
właściciele patentu: Nawrocki, Warszawa (Polska), Bożena Rocznik,
Olsztyn (Polska)

BIBLIOTEK

Urzędu Patentowe-
Polskiej RzeczypospolitejSposób otrzymywania pasz o wysokiej zawartości witaminy B₁₂

1

Podstawą otrzymywania krystalicznej witaminy B₁₂ dla celów farmaceutycznych względnie jej koncentratów paszowych są kierowane procesy biosyntezy. Procesy te polegają na hodowli aktywnych mikroorganizmów, przy czym bardzo ważnym zagadnieniem jest uzyskanie możliwie wysokich stężeń witaminy B₁₂ w nagromadzonych kulturach, co osiąga się przez odpowiedni dobór pożywek produkcyjnych, mikroorganizmów i warunków hodowli.

Znane sposoby produkcji witaminy B₁₂ polegają na wykorzystaniu wywaru melasowego lub zbożowego przy użyciu do biosyntezy *Bacillus megaterium* lub *Streptomyces olivaceus*.

Poza wywarem z gorzelnii proponuje się jako pożywkę wywary po kwasie cytrynowym, glukonowym i itakonowym, które zadaje się lizatami odpadowej grzybni po fermentacji cytrynowej lub po antybiotykach i po uzupełnieniu środowiska szeregiem związków organicznych i nieorganicznych fermentuje się całość bakteriami propionowymi.

Jeszcze inny sposób biosyntezy witaminy B₁₂ polega na prowadzeniu procesu w warunkach bez-tlenowych przy użyciu termofilnych bakterii metanowych.

Wadą wymienionych sposobów są niskie wydajności witamin B₁₂ wynoszące 3—5 mg/litr, (opis patentowy Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2.816.568), a wyjątkowo 8—10 mg/litr, (opis patentowy nr 42.378) stosowanie często drobnoustrojów

2

tlenowych, złożony cykl produkcyjny, kosztowna aparatura. Wysokie wydajności do 10 mg/litr otrzymano w hodowlach bakterii propionowych przy użyciu drogich surowców i stosowaniu długiego, 20 dniowego okresu fermentacji.

Sposób według wynalazku pozwala na otrzymanie znacznie wyższych wydajności witaminy B₁₂ wynoszących 20—30 mg/litr lub 1,5 mg/g suchej masy przez zastosowanie odpowiedniej pożywki zawierającej wywar ziemniaczany, przez dobór mikroorganizmów i warunków fermentacji. Według wynalazku fermentację można prowadzić sposobem periodycznym (6—7 dni) lub półciągłym (2—3 dni) lub ciągłym.

Cykl produkcyjny prowadzony według tego sposobu jest krótki, prosty, może być prowadzony w warunkach niesterylnych, nie wymaga inwestycji, a jedynie niewielkich adaptacji w gorzelniach rolniczych. W rezultacie procesu z wywaru ziemniaczanego, który jest paszą nietrwałą o niskiej zawartości suchej masy i azotu, oraz bez witaminy B₁₂, otrzymuje się „uszlachetniony wywar”, który stanowi paszę trwałą, o dwukrotnie zwiększonej zawartości suchej masy i różnych formach związanego azotu, oraz o wysokiej zawartości witaminy B₁₂ (20—30 mg/l).

Podstawową pożywkę stanowi ziemniaczany wywar gorzelniczy uzupełniony tanimi składnikami pokarmowymi jak mleczan amonu, glikoza, melasa, kielki słodowe lub zarodki zbożowe względnie ich

wyciągi oraz sole kobaltu. Do biosyntezy zastosowano bakterie propionowe z gatunku *Propionib. freudenreichii*, *Propionib. petersonii*, *Propionib. shermanii* lub mieszaninę tych gatunków, przy czym skład pożywki i warunki hodowli zostały ustalone w oparciu o fizjologię tych organizmów, szczególnie zdolność wykorzystywania mleczanów i azotu amonowego. Ustalony skład pożywki zapewnia bujny wzrost bakterii propionowych (ponad 70 miliardów komórek w mililitrze) i wysoką wydajność biosyntezy (20—30 mg korynoidów na litr).

Poza pożywką i mikroorganizmami istotnym elementem sposobu są warunki fermentacji. Ponieważ wzrost bakterii propionowych zostaje hamowany w kwaśnym środowisku, dlatego sposób według wynalazku uwzględnia stałe lub okresowe zobojętnianie pożywki dla utrzymania pH w granicach 6,5—7,4. Do neutralizacji stosuje się amoniak, wodę amoniakalną, węglan amonu lub mocznik. Ten sposób zobojętniania środowiska oparty o fizjologię bakterii propionowych pozwala na dodatkowe wzbogacenie wywaru w różne formy związanego azotu.

Końcowy produkt tak kierowanej fermentacji może być wykorzystany bezpośrednio w żywieniu zwierząt jako pasza o dużej zawartości witaminy B₁₂ i azotu lub jako dodatek do pasz wprowadzany w ilości 1—3 litrów na 1 tonę paszy lub odwirowuje się masę bakteryjną, która stanowić może po wysuszeniu półprodukt do otrzymania czystej, krystalicznej witaminy B₁₂ lub jej koncentratów dla celów farmaceutycznych, lub stanowić może surowy preparat witaminy B₁₂ dla celów paszowych o zawartości 1—1,5 mg witaminy B₁₂ na 1 g suchej masy bakterii, a pozostałość wykorzystuje się jako cenną paszę o wysokiej zawartości azotu i zwiększonej ilości witaminy B₁₂ w stosunku do wywaru dotychczasowego, nie uszlachetnionego. Wywarem uszlachetnionym będzie zarówno wywar z zawiesiną bakterii propionowych, jak i przesącz po ich odwirowaniu.

Stosowanie sposobu według wynalazku w gorzelniach rolniczych daje jako produkt uboczny wywar uszlachetniony o zwiększonej trwałości, wysokiej zawartości witaminy B₁₂ i związanego azotu.

Stosowanie w żywieniu zwierząt „uszlachetnionego wywaru”, produkowanego według wynalazku, daje więc możliwość szybkiego i taniego podniesienia produktywności i zdrowotności zwierząt użytkowych.

Przykład: Na 1 litr wywaru ziemniaczanego dodaje się 12 g mleczanu amonu, 14 g melasu, 50 g glikozy, 100 ml 10-cio procentowego wyciągu z kiełków słodowych i 15 mg CuSO₄·7H₂O. Po wyjałowieniu pożywkę szczepi się świeżą hodowlą *Propionibacterium petersonii* w ilości 50 ml kultury macierzystej. Fermentację prowadzi się w temperaturze 28° w ciągu 6 dni, utrzymując wartość pH w granicach 6,5—7,4 za pomocą jałowego roztworu węglanu amonu. Na 24 godziny przed końcem fermentacji dodaje się 5 mg 5,6-dwumetylobenzymidazolu, celem przekształcenia analogów w witaminę B₁₂. Tą drogą otrzymuje się w 1 litrze pożywki do 20 mg korynoidów oznaczanych metodą *E.coli*, zawierających około 75% witaminy B₁₂ oznaczanej metodą *Ochromonas mahlamensis*. 1 litr przefermentowanej pożywki zawiera ponad 8,5 g suchej masy komórkowej.

Na opisanej pożywce można skrócić czas fermentacji i zwiększyć wydajność stosując hodowlę półciąglą. W tym celu w odstępach 2 lub 3-dniowych odbiera się połowę przefermentowanej pożywki do dalszego wykorzystania, a pozostałą połowę uzupełnia się brakującymi składnikami. Tak prowadzony proces umożliwia prowadzenie fermentacji w warunkach niesterylnych, skrócenie czasu produkcji do 2—3 dni i zwiększenie wydajności do 30 mg korynoidów w 1 litrze co daje przeszło 20 mg czystej witaminy B₁₂.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania pasz o wysokiej zawartości witaminy B₁₂ wytwarzanej przez bakterie propionowe *P. petersonii* lub *P. freudenreichii* lub *P. shermanii* lub ich mieszaniny w procesie fermentacji, **znamienny tym**, że proces fermentacji prowadzi się na pożywce zawierającej wywar ziemniaczany uzupełniony mleczanem amonu, melasem, glikozą oraz kiełkami słodowymi lub zarodkami zbożowymi lub ich wyciągami.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do środowiska w procesie fermentacji wprowadza się ciągle lub okresowo amoniak, wodę amoniakalną, węglan amonu lub mocznik w celu utrzymania wartości pH w granicach 6,5—7,4.