

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

63144

Patent dodatkowy
do patentu

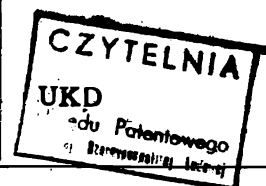
Zgłoszono: 17.II.1965 (P 107 477)

Pierwszeństwo: 18.II.1964 Węgry

Opublikowano: 10.VII.1971

Kl. 30 h, 2/20

MKP C 12 d, 5/06



Współtwórcy wynalazku: Hariklia Vakaliosz, Ferenc Vargha, Sandor Piukovich

Właściciel patentu: Chinoin Gyógyszer-es Vegyészeti Termékek Gyára RT, Budapeszt (Węgry)

Sposób wytwarzania związków należących do grupy witaminy B₁₂

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania związków należących do grupy witaminy B₁₂ na drodze biologicznej.

Z opisów patentowych NRF nr nr 109175 i 1097081 znane jest otrzymywanie związków z grupy witaminy B₁₂ za pomocą szczepu *Propionibacterium shermanii*-33, wytworzonego w obecności około 0,005% jonów kobaltu w stosunku do środowiska hodowli. Stosując ten szczep po 12 dniach fermentacji płyn fermentacyjny zawiera 18,8 mg/litr witaminy B₁₂.

Opis patentowy nr 47117 omawia sposób otrzymywania witaminy B₁₂ za pomocą *Propionibacterium* PBS 77. Przy wytwarzaniu tego szczepu stosuje się jony kobaltu w ilości 0,00025% w stosunku do pożywki, po czym fermentację prowadzi się również w obecności jonów kobaltu.

Sposób wytwarzania związków grupy witaminy B₁₂ z węgierskiego opisu patentowego nr 143834 polega na prowadzeniu fermentacji szczepu *Propionibacterium shermanii* w obecności jonów kobaltu. Uzyskuje się wyższą wydajność w stosunku do wyżej opisanych sposobów, osiągając stężenie witaminy B₁₂ w ilości 17 gamma/ml.

Stwierdzono, że można wytwarzać związki należące do grupy witaminy B₁₂, zwłaszcza cyjanokobalaminy i hydroksokobalaminy na drodze biologicznej stosując nowy szczep *Propionibacterium shermanii* 104 b.

2

Szczep *Propionibacterium shermanii* 104 b zdeponowany w Państwowym Instytucie Higieny w Budapeszcie pod nr 630903/24, wytwarza się z znanego szczepu *Propionibacterium shermanii* przez mutację w obecności jonów kobaltu w stężeniu 5000—10 000 γ/ml.

Nowy szczep różni się od innych szczepów *Propionibacterium shermanii* i innych bakterii kwasu propionowego zdolnością rozkładania cukrów. Znanne bakterie kwasu propionowego rozkładają fruktozę i dekstrozę, podczas gdy *Propionibacterium shermanii* 104/b rozkłada dekstrozę szybko, a fruktozę w ogóle nie rozkłada.

Nowy szczep odznacza się następującymi właściwościami: komórki bakterii są okrągłe o wielkości 0,5—0,6 μ. Występują parami lub w postaci krótkich łańcuchów. Morfologiczne właściwości szczepów hodowanych w warunkach aerobowych lub anaerobowych różnią się tylko w nieznacznym stopniu: Ekstrakt drożdżowy — kwas mlekowy — agar: słaby wzrost. Na powierzchni pożywki powstaje szara obwódka. Namok kukurydziany — glukoza — agar: po 12-dniowej hodowli w warunkach anaerobowych występują białe lub kremowo zabarwione okrągłe bakterie. Ekstrakt drożdżowy — żelatyna — kwas mlekowy: bakterie nie przeprowadzają żelatyny w stan ciekły.

Bakterie są gram-dodatnie i katalazo-dodatnie. Oprócz kwasu propionowego, octowego i dwutlenku węgla bakterie produkują kwas mlekowy, gli-

cerynę, mannozę, galaktozę i fruktozę, natomiast nie produkują dekstryny, inuliny, maltozy, rafinozy, sorbitolu i glikogenu. Bakterie nie powodują zupełnie redukcji azotanów. Bakterie można wyosabniać z produktów mlekowych.

Sposób prowadzenia mutacji, w wyniku której otrzymuje się szczep *Propionibacterium shermanii* 104/b jest nowy. Fakt uzyskania nowego szczepu, przez mutację znanego szczepu w obecności jonów kobaltowych, w świetle danych literaturowych jest zupełnie nieoczekiwany. Wiadomo bowiem (np. Bayland Pharm. Rev. 6, 1954, 345; Demerc i współprac., Am. Naturalist 85, 1951, 119; Jarai Acta Microbiol. Hung. 9, 1962, 273), że obecność kobaltu nie wpływa zupełnie na mutację bakterii i streptomycetów. Dotychczas stosowano jony kobaltu, w ilości wynoszącej 0,0203% w stosunku do pożywki wyłącznie do wytwarzania drożdży o zmniejszonej zdolności oddychania (Lidegren i współprac. Nature 182, 1958, 446).

W wytwarzaniu nowego szczepu sposobem według wynalazku stosuje się jony kobaltu w ilości 15–20-krotnej w stosunku do ilości jonów kobaltu używanych w wcześniejszych doświadczeniach (0,2–0,3% jonów kobaltu). Otrzymany nowy szczep rozmnaża się znacznie szybciej od szczepu wyjściowego.

Według wynalazku związki należące do grupy witaminy B₁₂, zwłaszcza cyjanokobalaminę, hydroksokobalaminę i inne biologicznie czynne związki wytwarza się w nieobecności jonów kobaltowych w sposób następujący:

Szczep *Propionibacterium shermanii* 104/b podaje się fermentacji w warunkach anaerobowych, korzystnie przy wartości pH = 6,5–7 w pożywce składającej się zasadniczo z roztworu otrzymanego po kwasowej lub enzymatycznej hydrolizie substancji zawierających skrobię (skrobia, mleczko skrobiowe, chleb itd.), odpowiadającego zawartości glikozy w ilości 2–10% i 2–4% namoku kukurydzianego.

Fermentację prowadzi się w ciągu od około 40 do 96 godzin, przy czym okres ten zależy od stężenia pożywki. Po zakończeniu rozkładu węglowodanów korzystnie do brzezki dodaje się 5,6-dwumetylobenzimidazol, korzystnie w ilości 1 mg/litr, który włącza się w cząsteczkę produktu fermentacji, po czym fermentację kontynuuje się podczas mieszania 10–24 godzin. Otrzymany płyn fermentacyjny, zawierający masę bakteryjną wraz z związkami należącymi do grupy witaminy B₁₂, można w zależności od życzenia przerabiać do zastosowania w medycynie ludzkiej lub na paszę.

Masę bakteryjną usuwa się z płynu fermentacyjnego przez odfiltrowanie przy wartości pH = 6,7–7,5. Zgodnie z korzystną postacią wynalazku, masę bakteryjną ekstrahuje się następnie gorącą wodą, po czym ekstrakt zatęża do jednej setnej pierwotnej objętości i ewentualnie dalej oczyszcza przez ekstrakcję, adsorpcję itd.

Sposobem według wynalazku otrzymuje się witaminę B₁₂ o bardzo wysokim stopniu czystości z znacznie wyższą wydajnością od uzyskiwanej w znanych sposobach. Nowy szczep wytwarza oprócz hydroksokobalaminy około 20% cyjanokoba-

laminy bez dodawania jonów cyjanowych do roztworu fermentacyjnego, którą ewentualnie można przeprowadzić w cyjanokobalaminę. W tym przypadku cyjanokobalaminę otrzymuje się z wydajnością 25–30 mg/litr (przy oznaczeniu chemicznym, a przy oznaczeniu za pomocą bakterii *E. Coli* wartość ta jest naturalnie znacznie wyższa).

Poważną zaletę stosowania nowego szczepu do fermentacji stanowi fakt, że po przeprowadzonej fermentacji, przy wartości pH roztworu pofermentacyjnego 6,7–7,5 łatwo odsąca się masę bakteryjną wraz z związkami z grupy witaminy B₁₂, co znacznie upraszcza proces.

Nowy szczep odznacza się niezwykle odpornością wobec żelaza. Przy wprowadzeniu do roztworu fermentacyjnego 2000 ν /ml siarczanu żelaza nie obserwuje się istotnych różnic ani we wzroście szczepu ani w wydajności produktu końcowego w porównaniu z prowadzoną w analogicznych warunkach próbą kontrolną.

Ponadto dużą zaletą sposobu według wynalazku jest fakt, że fermentację z nowym szczepem można prowadzić w stosunkowo szerokim zakresie temperatur, a mianowicie 30–36°C, przy czym zmienia się wyłącznie szybkość fermentacji, natomiast zdolność produkcyjna szczepu praktycznie nie ulega zmianie.

Następujące przykłady wyjaśniają bliżej wynalazek.

Przykład I. Otrzymanie szczepu *Propionibacterium shermanii* 104/b. 9 ml pożywki, otrzymanej z 20,0 g dekstrozy, 10,0 g namoku kukurydzianego, 40 ν /ml siarczanu żelaza i 7.500 ν /ml azotanu kobaltu w 1000 ml wody wprowadza się 1 ml inoculum zawierającego 4×10^8 bakterii znanego szczepu *Propionibacterium shermanii*. Hodowlę inkubuje się przez 120 godzin w temperaturze 28°C w termostacie, po czym przenosi się na pożywkę agarową w płytkach Petri'ego i inkubuje w anaerobowych warunkach w atmosferze. Otrzymany szczep *Propionibacterium shermanii* 104/b stosuje się do fermentacji.

Przykład II. Fermentację za pomocą mutantu bakterii *Propionibacterium shermanii* 104/b prowadzono w roztworze o objętości 4 litrów o następującym składzie:

Hydrolizat*)	— 800 ml/litr
namok kukurydziany, w prze-	
liczeniu na suchą substancję	— 20 g/litr
pantotenian wapniowy	— 20 mg/litr
wartość pH = 6,5	

Hydrolizat przed zmieszaniem z pozostałymi składnikami pożywki wysterylizowano w temperaturze 120°C w ciągu 40 minut po czym w stanie sterylnym zmieszano z resztą składników. Pożywkę fermentacyjną zaszczerpiono 25% 4–5-dniowym, odpowiednio rozwiniętym szczepem.

*) Hydrolizat otrzymany po hydrolizie substancji zawierających skrobię stosowano w ilości odpowiadającej zawartości 10% glikozy.

Inoculum hodowano na pożywce o następującym składzie:

glikoza	— 80 g/litr
namok kukurydziany w przeliczeniu na suchą substancję	— 20 g/litr
CaCO ₃	— 4 g/litr
wartość pH = 7,3	

Przy szczepieniu wartość pH pożywki ustalono w warunkach sterylnych na 6,8—7,0. Fermentację prowadzono w temperaturze 28°C, przy czym stężenie jonów wodorowych wzrastało w fazie intensywnej fermentacji o wartość 0,6—0,8 w ciągu czterech godzin. Korygowanie pH do wartości 6,8—7,0 przeprowadzano więc co cztery godziny za pomocą wodorotlenku amonowego.

Rozmnażanie mutantu *Propionibacterium shermanii* 104/b zakończyło się po 64—72 godzinach i uzyskano ilość bakterii 6,0—8,0 · 10¹⁰/ml. Fermentację prowadzono dalej do 80 godzin, po czym dodano 1 mg/litr 5,6-dwumetylobenzimidazolu. Płyn fermentacyjny zawierał 8 mg/litr cyjanokobalaminy i 20 mg/litr innych związków z grupy witaminy B₁₂, takich jak kwas kobirynowy, kobinowy, kobamowy, koenzym α-dwumetylobenzimidazolilokobamidu, które oznaczono metodą chromatografii bibułowej.

Przykład III Podczas fermentacji prowadzonej jak w przykładzie I, po 80 godzinach dodano 1 mg/litr 6,5-dwumetylobenzimidazolu, a następnie przez 24 godziny próbkę płynu fermentacyjnego ogrzewano do wrzenia z KCN i oznaczono za pomocą bakterii *E. Coli* metodą dyfuzyjną na agarze zawartość witaminy B₁₂. Aktywność witaminy B₁₂ w płynie fermentacyjnym wynosiła po 80 godzinach 86 mg/litr. Zawartość witaminy B₁₂ oznaczono metodą chemiczną przez ogrzewanie do wrzenia z cyjankiem potasowym, a następnie za pomocą chromatografii bibułowej. Wynosiła ona 27 mg/litr.

Przykład IV. Fermentor o pojemności 40.000 litrów, który zawierał wysterylizowaną pożywkę o następującym składzie:

Hydrolizat (analogiczny jak w przykładzie I)	— 450 ml/litr
namok kukurydziany w przeliczeniu na suchą substancję	— 20 mg/litr
pantotenian wapniowy	— 20 mg/litr
wartość pH = 6,5	

zaszczepiono czterodniową hodowlą *Propionibacterium shermanii* 104/b.

Hydrolizat przed zmieszaniem z pozostałymi składnikami wysterylizowano w ciągu 40 minut w temperaturze 120°C.

Użyta ilość inoculum wynosiła 25%. Po zaszczepieniu pH środowiska fermentacyjnego doprowadzono za pomocą wodorotlenku amonowego do wartości 6,8—7,0 a temperaturę do 28°C. W trakcie fermentacji korygowano pH za pomocą wodorotlenku amonowego do wartości 6,8—7,0.

Po 44 godzinach fermentacji dodano 1 mg/litr 5,6-dwumetylobenzimidazolu. Zawartość witaminy B₁₂ w płynie fermentacyjnym, oznaczona metodą chromatografii bibułowej, wynosiła 16 mg/litr.

Otrzymany płyn fermentacyjny w ilości 40 m³ po doprowadzeniu do wartości pH = 7—7,5 przesączono na prasie filtracyjnej, a osad zawierający masę bakteryjną wraz z związkami z grupy witaminy B₁₂ przemyto wodą, po czym zawieszono go w wodzie w ilości takiej, żeby uzyskać objętość 6 m³. Po dodaniu formaliny i FeCl₃ wytrącił się osad, po czym mieszaninę ogrzano do wrzenia, ponownie przesączono i osad przemyto. Przesącz, który zawierał witaminę B₁₂, zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem do około 400 litrów.

Wytrącony osad odsączono z pomocniczym środkiem filtracyjnym i ekstrahowano alkoholem benzylovym. Po oddzieleniu faz przemyto alkohol benzylovym wodą, zawierającą siarczan amonowy, a następnie przez dodanie czterochlorku węgla przeprowadzono witaminą B₁₂ z alkoholu benzylovego do wody. Z wodnego roztworu witaminę ekstrahowano fenolem i chromatografowano na Al₂O₃, a następnie krystalizowano. Otrzymano 315 g krystalizowanej witaminy B₁₂.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania związków należących do grupy witaminy B₁₂, zwłaszcza cyjanokobalaminy i hydroksokobalaminy na drodze biologicznej, **znamienny tym**, że nowy szczep *Propionibacterium shermanii* 104/b, zdeponowany w Państwowym Instytucie Higieny w Budapeszcie pod nr 630903/24, otrzymany przez mutację znanego szczepu *Propionibacterium shermanii* za pomocą jonów kobaltu, korzystnie w stężeniu 5000—10 000 γ/ml, poddaje się fermentacji i po oddzieleniu masy bakteryjnej znajdujące się w niej związki należące do grupy witaminy B₁₂ ewentualnie wyodrębnia się w znany sposób.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że fermentację prowadzi się w środowisku składającym się z hydrolizatu otrzymanego przez kwasową lub enzymatyczną hydrolizę substancji zawierających skrobię w ilości odpowiadającej 2—10% glikozy i z namoku kukurydzianego w ilości wynoszącej 2—4% w stosunku do pożywki.

3. Sposób według zastrz. 1—2, **znamienny tym**, że masę bakteryjną wraz z produktem końcowym oddziela się z płynu pofermentacyjnego przez odfiltrowanie przy wartości pH = 6,7—7,5.

4. Sposób według zastrz. 1—4, **znamienny tym**, że masę bakteryjną ekstrahuje się gorącą wodą i otrzymany ekstrakt zateża do jednej setnej poprzedniej objętości, po czym ewentualnie oczyszcza w znany sposób.

Dekonano jednej poprawki

