

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

O P I S P A T E N T O W Y PATENTU TYMCZASOWEGO

82302

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Kl. 30h,2/20

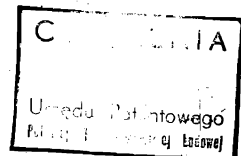
Zgłoszono: 05.06.1972 (P. 155805)

Pierwszeństwo: _____

MKP C12d 5/04

Zgłoszenie ogłoszono: 30.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 30.12.1975



Twórcy wynalazku: Witold Montwiłł, Krystyna Kosińska, Roman Brodowski

Uprawniony z patentu tymczasowego: Zjednoczone Zespoły Gospodarcze Sp. z o.o.,
Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania koncentratu ryboflawiny metodą biosyntezy

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania koncentratu ryboflawinowego do celów paszowych metodą biosyntezy przy użyciu szczepu *Eremothecium ashbyii*.

Znane jest stosowanie hodowli drobnoustrojów do wytwarzania produktów metabolizmów drobnoustrojów. Metoda biosyntezy wyeliminowała w poważnym stopniu syntezę chemiczną w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i paszowym. Otrzymywanie ryboflawiny w przemyśle oparte jest również na procesie syntezy mikrobiologicznej, w czasie której produktem ubocznym przemiany materii jest witamina B₂, wydzielona do podłoża lub gromadzona w masie komórkowej drobnoustrojów.

Według znanych metod do produkowania ryboflawiny w przemyśle stosuje się najczęściej dwa szczepy: *Ashbya gossypii* i *Eremothecium ashbyii*. Jako podłoże fermentacyjne stosuje się pożywki płynne, zawierające 0,25–1,5% węglowodanów, 1,0–5,0% białka oraz tłuszcze i sole mineralne w wymaganych ilościach. Źródłem węgla są węglowodany najczęściej w postaci glikozy, galaktozy, maltozy, sacharozy, rafinozy, znajdujących się w melasie cytrynowej lub w melasie z trzciny cukrowej. Źródłem azotu są produkty pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, w zależności od przedstawionych w różnych opracowaniach wymagań ilościowych i jakościowych. Według znanych metod najczęściej stosowanym materiałem białkowym są mączki kostne, rybne, z krwi, wątroba, albumina, kazeina, otręby żytnie, ryżowe lub pszenne, ekstrakt drożdżowy, ekstrakt jęczmienny, słodowy, mąka sojowa, z soczewicy, z nasion bawełny, wodny namok kukurydziany (W.N.K.), kietki zbożowe. Jako dodatkowe źródło energetyczne stosuje się produkty tłuszczowe takie jak tłuszcz kostny, masło kakaowe, olej sojowy, olej sezamowy, margaryna. Ponadto stosuje się szereg soli mineralnych, a mianowicie: sole żelaza, kobaltu, magnezu, wapnia sodu i potasu. Wymienione składniki mineralne dodawane są w postaci soli rozpuszczalnych w wodzie. Według stosowanych metod czynnikami niezbędnymi przy otrzymywaniu ryboflawiny są biotyna, tianina i mezoinozytol. Według znanej metody wyjałowioną pod ciśnieniem (120°C) brzeczkę fermentacyjną o pH = 5,5–7,5 szczepi się zawiesiną lub odwirowaną grzybnią używanej kultury ilości 0,7–4,0% obj. Całość brzeczeki napowietrza się jałowym powietrzem. Proces biosyntezy prowadzi się w tankach fermentorach przez 6–7 dni w temperaturze 28–340°C. Otrzymane wydajności kształtują się od 200 do 6000 γ/ml brzeczeki. Odfermentowany materiał suszy się w całości w suszarniach rozpyłowych lub walcowych albo poddaje obróbce chemicznej znanymi metodami w celu uzyskania czystej witaminy B₂.

Wadą znanej metody jest konieczność stosowania kosztownych urządzeń fermentacyjnych oraz urządzeń napowietrzających brzeczkę jałowym powietrzem. Poza tym podczas procesu fermentacji zużywa się dużo energii elektrycznej. Na skutek długiego czasu fermentacji często następuje zakażenie breczki. Ponadto część surowców używanych jako źródło węgla i azotu musi być najpierw poddawana działaniu enzymów proteolitycznych lub amylolitycznych, np. wątroba musi być preparowana enzymami protolitycznymi, aby białka przekształciły się w przyswajalną formę peptydów. Niezbędne jest również przeprowadzanie różnego rodzaju ekstrakcji, np. wodnych lub enzymatycznych niektórych surowców, w celu otrzymania łatwo przyswajalnych elementów pożywki (ekstrakt drożdżowy, słodowy, kukurydziany). Powyższe czynniki znacznie podrażają koszty produkcji witaminy B₂. Ze względu na wzmagające się ustawicznie zapotrzebowanie na ryboflawinę w przemyśle paszowym, celem wynalazku było opracowanie ekonomicznego sposobu otrzymywania koncentratu ryboflawiny, opartego na łatwo dostępnych i tanich surowcach. Jak wiadomo, ryboflawina jako czynnik zapobiegający pelagrze, wchodzi w skład enzymów oddychania tkankowego u ludzi i u zwierząt i jest niezbędnym elementem w organizmie żywym. Brak jej lub niedobór wywołuje w organizmie stan zwany ryboflawinową, prowadzący do różnego rodzaju schorzeń i zaburzeń. W związku z tym ryboflawinę stosuje się jako konieczny dodatek do pasz podawanych zwierzętom hodowlanym.

Według wynalazku do wytworzenia koncentratu ryboflawinowego metodą biosyntezy zastosowano pożywkę stałą, o wilgotności około 64%. Jako podstawowych składników do przygotowania podłoża fermentacyjnego użyto zmielonej kukurydzy i serwatki jako produktu odpadowego przemysłu mleczarskiego. Serwatkę wzbogacono glikozą oraz solami mineralnymi NaCl, CaCO₃, K₂HPO₄ i regulowano pH w granicach 5,8–6,4. W celu uzyskania większej powierzchni fermentacyjnej zastosowano sieczkę ze słomy pszennej.

W sposobie według wynalazku drobno zmieloną kukurydzę miesza się z około dwukrotną ilością w stosunku wagowym wzbogaconej serwatki oraz sieczką i poddaje się preparowaniu w około 100°C przez 45–60 min. Po ostudzeniu spreparowany materiał rozkrusza się mechanicznie. Uzyskuje się pożywkę nawilgoczną, o dużej porowatości, która zawiera:

sucha masa (%)	– 36,2
białko ogólne (% w s.m.)	– 16,2
tłuszcze	– 5,7
popiół	– 6,8
cukry redukujące przed inwersją	– 6,5
cukry redukujące po inwersji	– 7,4

Po sterylizacji w 1 atn (121°C) przez 90 minut podłoże po ostygnięciu szczepi się zawiesiną grzybni *Eremothecium ashbyii*, wyhodowaną na standartowej płynnej pożywce peptonowej w ciągu 48 godzin. Całość inkubuje się w temperaturze 30°C przez około 10 dni. Po tym okresie masa pofermentacyjna uzyskuje kolor ciemno żółty, o charakterystycznym, przyjemnym zapachu. Skład masy jest następujący:

sucha masa (%)	– 32,2
białko ogólna (% w s.m.)	– 17,4
popiół	– 7,1
tłuszcze	– 4,2
cukry redukujące przed inwersją	– 2,7
cukry redukujące po inwersji	– 3,1

Masę pofermentacyjną suszy się w suszarni tunelowej w przepływie powietrza o temperaturze 50–60°C. Wysuszony materiał miele się, otrzymując gotowy produkt, zawierający średnio 0,25–0,38% ryboflawiny t.j. 2500–3800 γ/g produktu.

Sproszkowany produkt barwy ciemnożółtej nie wykazuje działania biobójczego i biostatycznego w stosunku do badanych organizmów testowych, stanowi łatwo przyswajalny przez organizm materiał uzupełniający skład witaminowy pasz treściwych. Do produktu wchodzi sole mineralne pochodzenia serwatkowego oraz białko z wysoko cenionej pod względem paszowym rośliny jaką jest kukurydza. Ryboflawina w otrzymanym produkcie jest około 5 razy tańsza od czystej witaminy B₂ stosowanej dotychczas w przemyśle paszowym. W sposobie według wynalazku nie stosuje się przy fermentacji związków stymulujących w postaci biotyny, tiaminy i mezoinozytolu.

Przykład. 1000 ml serwatki uzupełnia się solami mineralnymi w ilości: NaCl – 2% wagowych, CaCO₃ (pastewny) – 1% wagowych, K₂HPO₄ – 0,025% wagowych przy czym pH ustawia się w granicach 5,8 – 6,4. Następnie dodaje się glikozy techniczne w ilości 0,5% wagowych. Tak przygotowaną serwatkę miesza się z 500 g drobno zmielonej kukurydzy i do otrzymanej zawiesiny dodaje się niewielką ilość sieczki. Podłoże preparuje się w temperaturze około 100°C przez 45–60 minut. Po ostygnięciu mocno zbitą masę rozkrusza się mechanicznie,

tak aby powstała luźna, rozdrobniona pożywka. Podłoże fermentacyjne w warstwie o grubości 5–8 cm **sterylizuje się** 1 atn (121°C) przez 90 minut. Po ostygnięciu szczepi się je porcją zawiesiny grzybni *Eremothecium ashbyii*, wyhodowanej w ciągu 48 godzin w temperaturze 28–30°C na płynnej, standartowej pożywce **peptonowej**, w ilości 10% obj. w stosunku do ilości użytej serwatki. Zaszczepione podłoże fermentacyjne **inkubuje się** w komorach termostatycznych, w absolutnie sterylnych warunkach, w temperaturze 28–30°C, przez 9–10 dni. Po tym okresie masę pofermentacyjną wyklada się na sita, które umieszcza się w suszarni tunelowej, w przepływie powietrza o temperaturze 50–60°C. Otrzymany wysuszony produkt miele się i **przechowuje** w ciemnym, suchym i chłodnym miejscu. Produkt może stosować jako uzupełnienie składników **witaminowych**, stosowanych w paszach sypkich lub granulowanych po zbilansowaniu ilości białka i witaminy B2 **zgodnie** z zapotrzebowaniem organizmu zwierząt.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania koncentratu ryboflawiny metodą bisyntezy, przy użyciu szczepu *Eremothecium ashbyii*, **z n a m i e n n y t y m**, że jako podłoże stosuje się stałą pożywkę, spreparowaną głównie z serwatki i **drobno** zmielonej kukurydzy z dodatkiem soli mineralnych, glikozy i siewki ze słomy w temperaturze około 100°C a następnie rozdrobnioną, którą po sterylizacji szczepi się zawiesiną grzybni *Eremothecium ashbyii*, **wy**hodowanej w znany sposób na płynnej standartowej pożywce peptonowej, po czym zaszczepione podłoże fermentacyjne inkubuje się w komorach termostatycznych w warunkach absolutnie sterylnych w temperaturze **około** 30°C przez około 10 dni, a następnie suszy powietrzem o temperaturze 50–60°C i miele.

2. Sposób według zastrz. 1, **z n a m i e n n y t y m**, że 100 części wagowych serwatki wzbogaconej solami mineralnymi NaCl, CaCO₃, i K₂HPO₄ oraz glikozę i o uregulowanym pH w granicach 5,8–6,4 miesza się z **drobno** zmieloną kukurydzą w ilości około 50 części wagowych oraz niewielką ilością siewki, poddaje **preparowaniu** w temperaturze około 100°C przez 45–60 minut i po ostudzeniu miele i sterylizuje.