

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

64983

Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 30 h, 2/20

Zgłoszono: 28.XI.1968 (P 130 294)

Pierwszeństwo: _____

MKP C 12 d 5/04

Opublikowano: 20.VII.1972

CZYTELNIA

UKD
Urzedu Patentowego
ul. Długa 1

Współtwórcy wynalazku: Tadeusz Szcześniak, Leonard Karabin, Krystyna Wituch, Maria Szczepanowska, Halina Wośko, Bohdan Rakowski, Jerzy Meller, Zofia Olińska

Właściciel patentu: Instytut Antybiotyków, Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania ryboflawiny metodą biosyntezy

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania ryboflawiny (witaminy B₂) metodą biosyntezy w podpowierzchniowej hodowli grzyba *Ashbya gossypii*.

Znane jest wytwarzanie ryboflawiny przy pomocy grzyba *Ashbya gossypii* należącego do klasy Ascomycetes. W sposobach tych grzyb ten był hodowany w płynnych pożywkach produkcyjnych zawierających jako źródło węgla łatwo przyswajalne węglowodany takie jak glukoza, sacharoza, albo zawierających jako źródło węgla tłuszcze roślinne i zwierzęce takie jak olej kokosowy, olej kukurydziany, oliwa z oliwek, olej arachidowy, olej sojowy, smalec, ciekłą frakcję smalcu — „lard oil” oraz mieszaniny tych tłuszczów.

Znane jest również z opisu patentowego nr 59792 wytwarzanie ryboflawiny przy zastosowaniu grzyba *Ashbya gossypii* hodowanego na pożywkach zawierających tłuszcz pożelatynowy jako źródła węgla.

Jako źródło azotu, pożywki produkcyjne zawierały substancje białkowe pochodzenia zwierzęcego takie jak kazeina, pepton, żelatyna, mąka rybna lub hydrolizaty enzymatyczne tych substancji, a także wolne aminokwasy.

Sposób według wynalazku polega na pasażowaniu grzyba *Ashbya gossypii* przez odpowiednio dobrane pożywki stałe i płynne a następnie hodowli na płynnej pożywce produkcyjnej zawierającej jako

2

źródło węgla tłuszcz pożelatynowy, a jako źródło azotu klej skórny i/lub kostny.

Pasażowanie prowadzi się przez płynną pożywkę, w której grzyb *Ashbya gossypii* wytwarza askospory, następnie przez pożywkę stałą, na której grzyb wyrasta w postaci kolonii, przez płynną pożywkę posiewową I, w której namnażają się komórki grzyba, przez płynną pożywkę posiewową II, w której rosnący grzyb wytwarza enzymy adaptacyjne oraz w płynnej pożywce produkcyjnej, w której grzyb wytwarza ryboflawinę.

Do otrzymania askospor stosuje się płynną pożywkę zawierającą 0,2—1,5% wagowych glukozy, 0,01—0,2% wagowych chlorowodoru tiaminy i do 100,0% wody drożdżowej. Do otrzymania kolonii grzyba *Ashbya gossypii* stosuje się pożywkę stałą zawierającą 0,2—3,0% wagowych glukozy, około 2,0% wagowych agaru i do 100,0% wagowych wody drożdżowej.

Namnażanie komórek prowadzi się w płynnej pożywce posiewowej I, zawierającej 0,2—3,0% wagowych glukozy, 0,1—0,5% wagowych laktozy, 0,1—1,0% wagowych peptonu, 0,1—0,5% wagowych ekstraktu drożdżowego oraz wody wodociągowej do 100,0% wagowych.

Wytwarzanie enzymów adaptacyjnych prowadzi się w płynnej pożywce posiewowej II zawierającej 0,5—3,0% wagowych drożdży paszowych, 0,5—3,0% wagowych tłuszczu pożelatynowego, 0,5—4,0% wagowych wyciągu namokowego kukurydzy (50% su-

chej masy) oraz wody wodociągowej do 100,0% wagowych.

Biosyntezę ryboflawiny prowadzi się w płynnej pożywce produkcyjnej zawierającej jako źródło węgla 0,1—10,0% wagowych tłuszczu pożelatynowego i jako źródło azotu 0,5—7,0% wagowych kleju skór-
nego i/lub kostnego, w stosunku do objętości po-
żywki.

Tłuszcz pożelatynowy wprowadza się bezpośred-
nio do płynnej pożywki produkcyjnej w ilości 0,1—
10,0% wagowych, a podczas hodowli Ashbya gos-
sypii w ilości 0,1—6,0% wagowych w stosunku do
objętości pożywki. Tłuszcz pożelatynowy wprowa-
dza się do pożywek jako taki lub w mieszaniu
z innymi tłuszczami, przy czym do pożywki pod-
czas hodowli grzyba Ashbya gossypii wprowadza się
go pomiędzy 6—120 godziną hodowli, korzystnie
w 72 i 120 godzinie hodowli.

Zastosowane jako składniki klej skórny i klej
kostny, jako produkty uboczne otrzymywane przy
produkcji żelatyny spożywczej, są surowcami bar-
dzo tanimi i łatwo dostępnymi, nie zawierają substan-
cji toksycznych. Obecność niektórych witamin oraz
wchodzące w skład kleju skórno i kostnego ami-
nokwasy stymulują zarówno proces wzrostu Ashbya
gossypii jak i syntezę ryboflawiny.

Klej skórny i klej kostny w odróżnieniu od in-
nych substancji białkowych pochodzenia zwierzę-
cego, zawierają stosunkowo dużą ilość aminokwa-
sów takich jak glicyna, alanina, prolina, argini-
na i treonina. Aminokwasy te są znanymi prekur-
sorami cząsteczki ryboflawiny i dlatego klej skór-
ny i klej kostny są surowcami wpływającymi na
zwiększenie wydajności biosyntezy ryboflawiny.

Ilościowy i jakościowy skład aminokwasów
w kleju skórny i kleju kostnym oraz dla porówna-
nia, w żelatynie spożywczej, obrazuje tablica 1.

Tablica 1

Aminokwasy	Żelatyna	Klej skórny	Klej kostny
Alanina	8,09	6,2	7,3
Arginina	7,98	10,0	10,0
Asparaginowy kwas	5,81	4,3	4,3
Fenylalanina	1,97	1,2	1,2
Glicyna	20,51	19,3	22,9
Glutaminowy kwas	9,93	7,3	9,6
Histydyna	0,70	0,4	0,3
Hydroksylizyna	0,81	—	—
Izoleucyna	1,37	0,7	0,7
Leucyna	2,89	1,7	2,1
Lizyna	3,40	3,1	2,7
Metionina	0,55	0,7	0,2
Prolina	13,36	9,2	9,8
Hydroksyprolina	11,36	10,9	6,6
Seryna	3,64	3,2	3,9
Treonina	1,79	1,2	1,8
Tyrozyna	0,80	0,5	0,6
Walina	2,06	ślady	ślady

Zawartość aminokwasów w żelatynie spożywczej
według Veis A., 1964: The macromolecular chemi-
stry of gelatin. New York. Academic Press. str. 4,
natomiast zawartość aminokwasów w kleju skór-
nym i kleju kostnym według Zakładu Analityki
Instytutu Antybiotyków — oznaczenia wykonano
na automatycznym analizatorze firmy Bender
i Hobein.

Zastosowanie w stosunkowo dużym stężeniu tia-
miny (witaminy B₁) w płynnej pożywce do otrzy-
mywania askospor pozwala uzyskać dużą ilość ciał
owocujących z askosporami w płynie hodowlanym
a także wolne askospory. Wpływ tiaminy na two-
rzenie się ciał owocujących zaznacza się szczególnie
w obecności innych uzupełniających substancji wzro-
stowych. Źródłem pozostałych uzupełniających sub-
stancji wzrostowych koniecznych do stymulowa-
nia tworzenia się ciał owocujących z askosporami
jest w stosowanej według wynalazku pożywce wo-
da drożdżowa, która zawiera oprócz tiaminy także
biotynę (witaminę H) niezbędną dla wzrostu
Ashbya gossypii, oraz pirydoksał (witaminę B₆).
Ponadto woda drożdżowa jest także źródłem azotu,
natomiast źródłem węgla w pożywce jest glukoza.

Zastosowanie do hodowli Ashbya gossypii po-
żywki stałej (szczepionej materiałem pobranym
z płynnej pożywki do otrzymywania askospor) po-
zwala uzyskiwać kolonie grzyba pochodzące z je-
dnej askospory. Ponadto umożliwia wybór kolonii
o intensywnym pomarańczowym zabarwieniu cha-
rakterystycznym dla kolonii grzyba posiadającego
zdolność do syntezy dużych ilości ryboflawiny.
Przeprowadzenie hodowli na tej pożywce wyklucza
możliwość użycia do dalszych pasażów kolonii bia-
łych względnie z białymi sektorami charakteryzu-
jących się brakiem zdolności do syntezy rybofla-
winy, względnie posiadających zdolność syntezy
ryboflawiny lecz w niewielkiej ilości.

Zastosowanie do hodowli Ashbya gossypii płyn-
nej pożywki posiewowej I (szczepionej jedną kolo-
nią grzyba, wyhodowaną na pożywce stałej) za-
wierającej dobrze przyswajalne substancje umo-
żliwia namnożenie komórek i tym samym otrzy-
manie materiału do szczepienia płynnej pożywki
posiewowej II.

Zastosowanie do hodowli Ashbya gossypii płyn-
nej pożywki posiewowej II (szczepionej zawiesiną
grzybni wyhodowaną w płynnej pożywce posie-
wowej I), zawierającej jako źródło węgla tłuszcz
pożelatynowy, powoduje wytworzenie przez ko-
mórki grzyba enzymów adaptacyjnych (powstają-
cych w wyniku zetknięcia się tych komórek z sub-
stratem — tłuszczem pożelatynowym) umożliwia-
jących zużywanie tłuszczu pożelatynowego. Wy-
tworzenie enzymów adaptacyjnych przez grzyb ma
szczególnie duże znaczenie, ponieważ płynna po-
żywka produkcyjna zawiera jako źródło węgla
tłuszcz pożelatynowy w stosunkowo dużej ilości.

Zastosowanie płynnej pożywki produkcyjnej
(szczepionej zawiesiną grzybni wyhodowaną
w płynnej pożywce posiewowej II) zawierającej
jako źródło węgla tłuszcz pożelatynowy i jako
źródło azotu klej skórny i/lub klej kostny, umożli-
wia otrzymanie wysokich wydajności ryboflawiny
tylko wtedy, gdy hodowla Ashbya gossypii dokar-

miana jest tłuszczem pożelatynowym dodawanym do pożywki w optymalnej ilości i w odpowiedniej godzinie hodowli. Dodawany tłuszcz pożelatynowy stymuluje drugi i trzeci cykl wzrostu grzybni i biosyntezę ryboflawiny. Klej skórny lub kostny wprowadza się do pożywki w postaci stałej lub w postaci roztworu.

Sposób prowadzenia hodowli Ashbya gossypii i wydajności ryboflawiny w płynnej pożywce produkcyjnej zawierającej tłuszcz pożelatynowy i klej skórny lub klej kostny przedstawiają szczegółowe przykłady, w których % oznaczają procenty wagowe.

Przykład I Przygotowano płynną pożywkę do otrzymywania askospor grzyba Ashbya gossypii o składzie:

Glukoza czysta	1,0 %
Tiamina HCl	0,1 %
Woda drożdżowa (0,5% suchej masy) do	100,0 %

pH pożywki korygowano do wartości = 6,9 za pomocą wodorotlenku potasu, rozlewano po 10 ml do probówek i wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut.

Probówkę z pożywką szczepiono 4—5-dniową kolonią grzyba wyhodowaną na pożywce stałej.

Przygotowywano pożywkę stałą o następującym składzie:

Glukoza czysta	2,0 %
Agar	2,0 %
Woda drożdżowa (0,5% suchej masy) do	100,0 %

pH pożywki korygowano za pomocą wodorotlenku potasu do wartości = 7,2 i wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut. Pożywkę rozlewano do płytek Petri'ego po 20 ml. Pożywkę stałą szczepiono zawiesiną askospor wyhodowaną na pożywce płynnej. Inkubację przeprowadzano w temperaturze 28°C w ciągu 4—5 dni. Otrzymane w ten sposób kolonie grzyba stosowano do szczepienia płynnej pożywki posiewowej I.

Przygotowywano płynną pożywkę posiewową I o składzie:

Glukoza czysta	1,0 %
Laktoza czysta	0,3 %
Pepton	0,5 %
Ekstrakt drożdżowy	0,3 %
Woda wodociągowa	do 100,0 %

sowano do szczepienia płynnej pożywki posiewowej II.

Przygotowywano płynną pożywkę posiewową II o składzie:

5 Drożdże paszowe	2,0 %
Tłuszcz pożelatynowy	1,5 %
Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy)	3,0 %
10 Woda wodociągowa	do 100,0 %
pH pożywki korygowano do wartości = 7,2, pożywkę rozlewano po 50 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut.	

Każdą kolbę z płynną pożywką posiewową II szczepiono 1 ml zawiesiny grzybni z płynnej pożywki posiewowej I. Hodowlę prowadzono w ciągu 24 godzin w takich samych warunkach jak na płynnej pożywce posiewowej I. Otrzymaną w ten sposób zawiesiną grzybni szczepiono płynną pożywkę produkcyjną.

Przygotowywano płynną pożywkę produkcyjną o składzie:

25 Klej skórny	3,0 %
Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy)	6,0 %
Glicyna	0,15 %
KH ₂ PO ₄	0,15 %
30 Mg++	1 µg/ml
Co++	2 µg/ml
Mn++	5 µg/ml
Zn++	10 µg/ml
Woda wodociągowa	do 100,0 %

pH pożywki korygowano do wartości = 6,8 za pomocą wodorotlenku potasu. Pożywkę rozlewano po 30 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i do każdej kolby dodawano tłuszcz pożelatynowy w ilości 4,0% objętościowych. Pożywki wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 3 godzin.

Każdą kolbę z pożywką szczepiono 1 ml zawiesiny grzybni z płynnej pożywki posiewowej II. Hodowlę prowadzono w zaciemnionym pomieszczeniu na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach/min. i mimośrodzie 25 mm w temperaturze 28°C w ciągu 192 godzin.

Do poszczególnych partii kolb z płynnymi pożywkami produkcyjnymi zawierającymi tłuszcz pożelatynowy w ilości 4,0% objętościowych w 72, 96, 120 oraz 72 i 120 godzinie hodowli Ashbya gos-

Zawartości ryboflawiny (witaminy B₂) po godzinach hodowli Ashbya gossypii w pożywkach, do których dodawano tłuszcz pożelatynowy w różnych godzinach hodowli przedstawione są w tabeli 2.

Tabela 2

Czas dodawania tłuszczu pożelatynowego				
godzina	96 godzina	120 godzina	72 i 120 godzina	
µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	
3140	3100	2720	5100	

Errata

W główce opisu patentowego mylnie wydrukowano nazwisko współtwórcy wynalazku

jest: Maria Szczepanowska

powinno być: Maria Szczepankowska

Jak wykazano wyżej największą wydajność ryboflawiny otrzymano w pożywce, do której dodano tłuszcz pożelatynowy w 72 i 120 godzinie hodowli.

Przykład II Skład jakościowy i ilościowy pożywek posiewowych, sposób ich przygotowywania oraz sposób przeszczepiania i warunki hodowli Ashbya gossypii były takie same jak w przykładzie I. Ponadto przygotowywano płynne pożywki produkcyjne zawierające klej skórny w ilości 3,0%, 3,5% i 4,0% objętościowych.

Do poszczególnych partii kolb z płynnymi pożywkami produkcyjnymi zawierającymi różne ilości kleju skórno (3,0%, 3,5%, 4,0%) dodawano tłuszcz pożelatynowy w ilości po 2,5% objętościowych w 72 i 120 godzinie hodowli.

Zawartości ryboflawiny (witaminy B₂) w pożywkach z różnymi ilościami kleju skórno po 168 godzinach hodowli Ashbya gossypii przedstawione są w tablicy 3.

Tablica 3

Klej skórny 3,0%	Klej skórny 3,5%	Klej skórny 4,0%
$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
5780	5910	5850

Jak wykazano wyżej w pożywkach zawierających klej skórny otrzymuje się wysokie wydajności ryboflawiny.

Przykład III Skład jakościowy i ilościowy pożywek posiewowych, sposób ich przygotowywania oraz sposób przeszczepiania i warunki hodowli Ashbya gossypii były takie same jak w przykładzie I. Ponadto przygotowywano płynne pożywki produkcyjne zawierające klej kostny w ilości 3,0%, 3,5% i 4,0% objętościowych.

Do poszczególnych kolb z płynnymi pożywkami produkcyjnymi zawierającymi różne ilości kleju kostnego (3,0%, 3,5%, 4,0%) dodawano tłuszcz pożelatynowy w ilości po 2,5% objętościowych w 72 i 120 godzinie hodowli. Zawartości ryboflawiny (witaminy B₂) w pożywkach z różnymi ilościami kleju kostnego po 192 godzinach hodowli Ashbya gossypii przedstawione są w tablicy 4.

Tablica 4

Klej kostny 3,0%	Klej kostny 3,5%	Klej kostny 4,0%
$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
5180	5060	5040

Jak wykazano wyżej w pożywkach zawierających klej kostny otrzymuje się wysokie wydajności ryboflawiny.

W przykładach I, II, III, wykazano, że sposobem według wynalazku można otrzymać wysokie wydajności ryboflawiny w płynnych pożywkach

zawierających tłuszcz pożelatynowy, klej skórny lub klej kostny.

Wytworzoną ryboflawinę znajdującą się w płynach hodowlanych izoluje się jedną ze znanych metod chemicznych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania ryboflawiny metodą biosyntezy w podpowierzchniowej hodowli grzyba Ashbya gossypii na pożywkach zawierających tłuszcz pożelatynowy jako źródło węgla, **znamienny tym**, że grzyb Ashbya gossypii poddaje się wstępnemu pasażowaniu przez odpowiednio dobrane pożywki stałe i płynne a następnie poddaje się hodowli na płynnej pożywce produkcyjnej zawierającej jako źródło azotu klej skórny i/lub kostny.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pasażowanie prowadzi się przez płynną pożywkę, w której grzyb Ashbya gossypii wytwarza askospory, następnie przez pożywkę stałą, na której grzyb wyrasta w postaci kolonii, przez płynną pożywkę posiewową I, w której namnażają się komórki grzyba, przez płynną pożywkę posiewową II, w której rosnący grzyb wytwarza enzymy adaptacyjne oraz w płynnej pożywce produkcyjnej w której grzyb wytwarza ryboflawinę.
3. Sposób według zastrz. 1 i 2, **znamienny tym**, że do otrzymania askospor stosuje się płynną pożywkę zawierającą 0,2—1,5% wagowych glukozy, 0,01—0,2% wagowych chlorowodoru tiaminy i do 100,0% wody drożdżowej.
4. Sposób według zastrz. 1—3, **znamienny tym**, że do otrzymania kolonii grzyba Ashbya gossypii stosuje się pożywkę stałą zawierającą 0,2—3,0% wagowych glukozy, około 2,0% wagowych agaru i do 100,0% wagowych wody drożdżowej.
5. Sposób według zastrz. 1—4, **znamienny tym**, że do namnażania komórek stosuje się płynną pożywkę posiewową I, zawierającą 0,2—3,0% wagowych glukozy, 0,1—0,5% wagowych laktozy, 0,1—1,0% wagowych peptonu, 0,1—0,5% wagowych ekstraktu drożdżowego oraz do 100,0% wagowych wody wodociągowej.
6. Sposób według zastrz. 1—5, **znamienny tym**, że do wytwarzania enzymów adaptacyjnych stosuje się płynną pożywkę posiewową II zawierającą 0,5—3,0% wagowych drożdży paszowych, 0,5—3,0% wagowych tłuszczu pożelatynowego, 0,5—4,0% wagowych wyciągu namokowego kukurydzy (50% suchej masy) oraz do 100,0% wagowych wody wodociągowej.
7. Sposób według zastrz. 1—6, **znamienny tym**, że do biosyntezy ryboflawiny stosuje się płynną pożywkę produkcyjną zawierającą jako źródło węgla 0,1—10,0% wagowych tłuszczu pożelatynowego i jako źródło azotu 0,5—7,0% wagowych kleju skórno i/lub kleju kostnego.
8. Sposób według zastrz. 1—7, **znamienny tym**, że klej skórny lub kostny wprowadza się w postaci stałej lub roztworu.