

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 552 765

②① N° d'enregistrement national :

84 15102

⑤① Int Cl* : C 07 H 23/00; C 12 P 19/42.

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 2 octobre 1984.

③③ Priorité : HU, 4 octobre 1983, n° 3440/83.

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 14 du 5 avril 1985.

⑥③ Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦① Demandeur(s) : *RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR
RT. — HU.*

⑦② Inventeur(s) : Agnes Kelemen, Eva Cserey Pechany et
Istvan Jaksa.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin,
Schrimpf, Warcoin et Ahner.

⑤④ Procédé de conversion de corrinoïdes produits par des microorganismes en cyanocorrinoïdes.

⑤⑦ L'invention a pour objet la conversion des corrinoïdes
produits par des microorganismes en cyanocorrinoïdes par
réaction avec des cyanures.

On met en contact un bouillon de fermentation obtenu par
rupture des cellules des microorganismes, avantageusement
par traitement thermique en présence ou non d'ions sulfite,
facultativement après une purification, avec un adsorbant
convenable ou une résine échangeuse d'ions; on traite les
corrinoïdes sur la surface de l'adsorbant ou de la résine avec
une solution aqueuse contenant des ions cyanure ou un com-
posé fournissant ces ions, en une proportion permettant d'ob-
tenir les ions cyanure en un excès molaire de 1,1 à 2,0 fois
par rapport aux corrinoïdes; on lave la résine avec de l'eau et
on élue les cyanocorrinoïdes.

Additifs au fourrage et autres utilisations analogues.

15 - 765 / 84

La présente invention concerne un procédé nouveau pour la conversion des corrinoïdes produits par des microorganismes en cyanocorrinoïdes.

On sait que les corrinoïdes sont exclusivement produits par des microorganismes. Dans les cellules des microorganismes, les corrinoïdes sont accumulés sous forme de coenzymes ou sont liés à des protéines. Comme premier stade d'isolement des corrinoïdes, il faut rompre les cellules et briser les liaisons entre le groupe désoxyadénosyle du squelette de corrine de la coenzyme B₁₂ et les protéines (voir Ullmann : Encyklopedie der Chemischen Technology, 18 , 214, 1967). Si les cellules sont rompues en présence d'ions cyanure, sulfite ou nitrite, les coenzymes sont converties en cyano-, sulfito- ou nitrito-corrinoïdes correspondants, alors qu'en l'absence des ions précités, on obtient des hydroxycorrinoïdes. Il est bien connu que la stabilité des complexes corrinoïdes est différente. Les stabilités diminuent dans l'ordre suivant : cyano-, sulfito-, nitrito- et hydroxycorrinoïdes. Etant donné que les hydroxycorrinoïdes sont extrêmement instables, dans les procédés connus jusqu'à présent, on les convertissait en cyano- ou sulfito-corrinoïdes plus stables au cours du premier stade du traitement. On préparait en général les cyanocorrinoïdes

stables en rompant les cellules des microorganismes en présence d'ions cyanure.

Les procédés connus pour la rupture des cellules la libération des corrinoïdes à partir de la forme liée
5 à des protéines et leur conversion en cyanocorrinoïdes correspondants sont résumés, par exemple, dans les monographies suivantes : E.L. Smith: Vitamin B₁₂ Ed. Methuen's, 15, 26-28 (1965) ; Pawelkiewicz : Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor, Enke Verlag Stuttgart,
10 280 (1962) ; W. Friedrich : Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoide (R. Ammon : Fermente, Hormone, Vitamine III/2) 10-13, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1975).

Etant donné qu'on doit préparer des cyanocorrinoïdes comme produit final, en raison des volumes importants
15 impliqués et de la présence d'impuretés qui peuvent également réagir avec les ions cyanure, on doit, pendant la préparation industrielle des cyanocorrinoïdes, utiliser les ions cyanure en un excès multiple par rapport aux hydroxycorrinoïdes pour obtenir le produit final
20 désiré. Ceci pose des problèmes de sécurité et d'environnement.

Selon le brevet hongrois 171339, pendant la rupture des cellules et la libération des corrinoïdes à partir des liaisons avec les protéines, on utilise l'ion cyanure
25 en un excès molaire de 100 à 600 fois, de préférence, 200 à 400 fois par rapport à la teneur en vitamine B₁₂ du

bouillon de fermentation. On traite ce bouillon de fermentation avec les ions cyanure pendant 10 à 300, de préférence, 20 à 120 minutes.

5 Selon le brevet US 2.530.416, on traite le bouillon de fermentation obtenu par culture des microorganismes produisant la vitamine B₁₂ ou un concentré obtenu de celui-ci avec un composé capable de fournir des ions cyanure, par exemple, un sel cyanhydrique capable d'une dissociation ionique.

10 Dans le procédé décrit dans le brevet français 2.809.842, on rompt les cellules de Propionibacterium en présence de 5% de métabisulfite de sodium à une température de 60 à 70°C. On purifie d'abord les sulfito-corrinoïdes obtenus par extraction avec un solvant et
15 ensuite on traite pour la teneur en vitamine B₁₂ à 60°C pendant 15 minutes pour obtenir ainsi les cyanocorrinoïdes désirés. Le produit obtenu après cristallisation dans l'acétone contient 10 ppm d'ions cyanure libres.

Un inconvénient commun aux procédés connus est qu'ils
20 exigent une quantité extrêmement élevée d'ions cyanure quand on les emploie à l'échelle industrielle. En conséquence, pour une réalisation industrielle, on doit résoudre des problèmes difficiles de sécurité et de protection de l'environnement. Un autre inconvénient est que le produit
25 brut contient des ions cyanure libres. Ce n'est pas un problème si l'on prépare des corrinoïdes cristallins puisque cette impureté peut être éliminée des corrinoïdes

pendant les stades de purification. Toutefois, si on doit utiliser le produit brut comme additif au fourrage, on doit maintenir la concentration en ions cyanure libres au-dessous d'une certaine limite.

5 Par le procédé selon l'invention, on prépare les cyanocorrinoïdes stables sans les inconvénients cités. Les principaux stades du procédé sont comme suit :

On effectue la rupture des cellules des microorganismes et la libération des corrinoïdes des liaisons avec des protéines d'une façon connue, en présence ou en l'absence
10 d'ions sulfite et/ou par traitement thermique, de sorte que les corrinoïdes présents dans la solution sont adsorbés sur un adsorbant ou une résine échangeuse de cations, facultativement après des stades connus de purification.

15 Par le stade d'adsorption, on stabilise les hydroxo- ou sulfito-corrinoïdes. On prépare ensuite des cyanocorrinoïdes stables à partir des corrinoïdes adsorbés sur la surface de l'adsorbant ou la résine échangeuse d'ions en traitant l'adsorbant ou la résine avec
20 un excès molaire de 1,1 à 2,0 d'ions cyanure ou de composés capables de fournir des ions cyanure (par exemple une cyanohydrine). Cette réaction est instantanée à la surface de l'adsorbant ou de la résine échangeuse de cations. On peut éliminer l'excès qui n'a pas réagi des ions cyanure
25 par lavage de l'adsorbant ou de la résine échangeuse de cations, si bien que les cyanocorrinoïdes éliminés de l'adsorbant ou de la résine échangeuse sont exempts d'ions cyanure libres.

L'invention concerne un procédé nouveau de conversion de corrinoïdes produits par des microorganismes en cyano-corrinoïdes, selon lequel on met en contact un bouillon de fermentation obtenu par rupture des cellules d'une façon connue, de préférence par traitement thermique en présence ou en l'absence d'ions sulfite (facultativement après des stades connus de purification) avec un adsorbant convenable ou une résine échangeuse d'ions, puis on traite les corrinoïdes adsorbés sur la surface de l'adsorbant ou de la résine avec une solution aqueuse contenant des ions cyanure ou un composé capable de fournir des ions cyanure en une quantité qui fournit les ions cyanure dans un excès molaire de 1,1 à 2,0 par rapport aux corrinoïdes. On lave ensuite l'adsorbant ou la résine échangeuse avec de l'eau et on élue les cyanocorrinoïdes formés par une technique connue, de préférence avec de l'éthanol aqueux.

On peut utiliser avantageusement le procédé de l'invention également pour le traitement des bouillons de fermentation qu'on obtient par rupture des cellules par un traitement thermique en l'absence d'ions sulfite. Dans ce cas, les corrinoïdes présents dans le bouillon de fermentation non filtré sont directement adsorbés sur une résine macro-réticulaire d'adsorption utilisant des techniques à lit fluidisé ou par simple mélange. Etant donné qu'on peut exécuter ce stade en un temps extrêmement bref, les hydroxycorrinoïdes ne sont pratiquement pas décomposés pendant cette période. On convertit alors les

corrinoïdes liés à l'adsorbant en cyanocorrinoïdes à l'aide d'une solution aqueuse diluée contenant des ions cyanure dans un excès molaire de 1,1 à 2,0 par rapport aux corrinoïdes adsorbés, de sorte que les ions cyanure qui n'ont pas réagi sont lavés par l'eau et les cyano-corrinoïdes sont élués de l'adsorbant d'une façon connue. La solution obtenue contient la quantité totale des corrinoïdes sous une forme de cyanure stable et elle est pratiquement exempte d'ions cyanure.

Les principaux avantages de ce nouveau procédé sont comme suit :

- 1) La quantité d'ions cyanure nécessaire pour la réaction est inférieure de deux ordres de grandeur à celle exigée par les procédés connus.
- 2) Le procédé convient particulièrement pour des réalisations industrielles économiques, étant donné que :
 - on peut effectuer l'adsorption et la purification de l'ingrédient actif et sa conversion en cyanocorrinoïdes ainsi que l'élution par une opération continue avec un bon rendement ;
 - il est inutile d'employer des procédés et des équipements coûteux pour l'élimination des ions cyanure ;
 - l'ordre des stades technologiques est en conformité avec les exigences de sécurité puisque le risque d'un dégagement de gaz cyanhydrique est exclu du fait qu'on prépare les cyanocorrinoïdes à un pH neutre.

3) Le produit élué de l'adsorbant est pratiquement exempt d'ions cyanure libres. Ceci est particulièrement important si l'on doit employer le produit comme additif au fourrage sans autre purification.

5 4) Dans l'eau de rebut obtenue pendant la réalisation du procédé, qu'on décharge dans les égouts ou dans les eaux "vivantes", la concentration en ions cyanure est au dessous de la limite autorisée et on satisfait donc aux exigences de la protection de l'environnement.

10 Les exemples suivants servent à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée :

Exemple 1

On règle à pH 4,0 avec de l'acide sulfurique 1 m³ du bouillon de fermentation obtenu par fermentation (brevet hongrois 159.356) avec une micropopulation mélangée produisant du méthane et contenant *Corynebacterium* sp. (24A1), *Corynebacterium* sp. (244C1), *Lactobacillus* sp. (244B C1) et *Propionibacterium* sp. (239 A1/6), déposés dans la Collection Hongroise Nationale des Microorganismes (OKI) sous les numéros 76, 77, 78 et 79 respectivement, ayant un pH de 6,3 et contenant 50 g de corrinoïdes. On chauffe ensuite ce bouillon de fermentation à 100°C et on maintient à cette température pendant 10 minutes. Pendant ce stade, les cellules sont rompues et les corrinoïdes libérés des cellules sont dissous dans le milieu de fermentation. La solution contient 24 g d'hydroxycobalamine et 23,5 g de corrinoïdes apparentés.

On fait passer le bouillon de fermentation à travers une colonne remplie avec 20 litres de DIAION HP 20 (Mitsubishi) qui est une résine macroréticulaire d'adsorption dans le sens ascendant, par la technologie en lit fluidisé. Au cours de ce stade, les corrinoïdes dans le bouillon de fermentation sont adsorbés sur la résine. Les débris des cellules et les impuretés organiques et minérales sont ensuite éliminés par passage d'eau à travers la colonne dans le même sens que pendant l'adsorption. Ensuite, on introduit dans la colonne de bas en haut 20 litres d'une solution aqueuse contenant au total 3,0 g de cyanure de potassium (1,25 équivalent). Après 10 minutes au repos, on décharge du mélange l'eau contenant le cyanure de potassium et on lave la colonne avec 100 litres d'eau. On combine la solution ayant servi au traitement du cyanure et éliminée de la colonne avec la liqueur aqueuse de lavage. Les 120 litres de solution qu'on obtient ainsi contiennent 0,15 mg d'ions cyanure libres par litre.

On élue les cyanocorrinoïdes à partir de la résine d'adsorption avec 100 litres de méthanol et on fait continuellement couler vers le bas. A partir de l'éluat méthanolique, on évapore le méthanol sous vide à une température ne dépassant pas 50°C. La solution aqueuse contient 20,5 g de cyanocobalamine et 20,0 g d'autres cyanocorrinoïdes. Selon l'analyse par chromatographie liquide à haute pression, la concentration en hydroxycobalamine dans le produit est inférieure à 0,5%. On ne

détecte même aucune trace d'ions cyanure libres. Après séchage, on peut utiliser le produit comme additifs au fourrage.

Exemple 2

5 Comme matière de départ, on utilise 100 litres d'un bouillon de fermentation obtenu comme dans l'exemple 1 (en utilisant les mêmes microorganismes) contenant 5,0 g de corrinoïdes. Pour la rupture des cellules on ajoute au bouillon de fermentation 0,86 kg d'hydrogénophosphate
10 disodique dihydraté, 1,1 kg d'acide citrique et 1,0 kg de métabisulfite de sodium, puis on conserve le bouillon dans un autoclave à 120°C pendant 10 minutes. Le mélange obtenu contient 2,3 g de sulfito-cobalamine et 2,42 g de sulfito-corrinoïdes apparentés. Après refroidissement, on fait
15 remonter le mélange dans une colonne remplie de 3 litres de Ambertlite XAD 2 (Rohm and Haas) à titre de résine d'adsorption macroréticulaire. Les sulfitocorrinoïdes sont adsorbés sur la résine d'adsorption. On élimine les traces du bouillon de fermentation provenant de la colon-
20 ne de résine avec de l'eau qu'on fait passer de bas en haut à travers la colonne. Ensuite, on fait passer de haut en bas à travers la colonne 15 litres d'une solution aqueuse contenant 0,5 g de cyanure de potassium (2 équivalents) à un débit de 2 volumes de lit/heure. En résultat, la couleur
20 caractéristique rouge jaunâtre des sulfitocorrinoïdes vire à un pourpre vif qui est caractéristique des cyanocorrinoïdes. Après passage de la solution aqueuse de cyanure de potassium,

on fait passer 45 litres d'eau de haut en bas à travers la colonne pour éliminer les ions cyanure. La liqueur qui sort est combinée avec la liqueur aqueuse de lavage. La teneur en ions cyanure libres dans la liqueur combinée est de 0,12 mg/l. On élue les corrinoïdes de la colonne de résine avec 10 litres d'une solution aqueuse de méthanol de 80 % en volume. On évapore l'éluat méthanolique sous vide pour éliminer le méthanol. La solution aqueuse obtenue contient 1,92 g de cyanocobalamine et 2,01 g de cyanocorrinoïdes apparentés. Par chromatographie liquide à haute pression on ne détecte aucun sulfito- ou hydroxy-corrinoïde. Le produit est également exempt d'ions cyanure libres.

Exemple 3

A partir de 100 litres d'un bouillon de fermentation obtenu par fermentation aseptique avec *Propionibacterium* sp. Al/6 déposé à la Collection Nationale Hongroise de Microorganismes (OKI) sous le n° 239, on sépare les cellules contenant des corrinoïdes. La teneur en corrinoïdes dans la crème cellulaire (biomasse) obtenue est de 7,5 g. A la biomasse on ajoute 20 litres d'eau, on règle son pH à 4,0 avec HCl et on conserve le mélange à 120°C pendant 10 minutes dans un autoclave. Après refroidissement, on élimine les débris cellulaires par séparation. La solution limpide obtenue contient 5,1 g d'hydroxycobalamine et 2,4 g d'autres corrinoïdes. On fait passer la solution à travers 35 litres d'une résine échangeuse de cations Amberlite IRC 50,

qui est dans un cycle d'hydrogène. On adsorbe les cor-
rinoïdes présents dans la solution sur la colonne. On
lave ensuite la colonne de résine avec 5 litres d'eau, puis
on fait passer 40 litres d'eau contenant 400 mg de cyanure
5 de sodium à travers la colonne à raison de 20 litres à
l'heure. On lave ensuite la colonne avec de l'eau jusqu'à
ce que la liqueur sortante soit exempte d'ions cyanure.
On recueille la liqueur de lavage contenant les ions
cyanure ; la teneur en ions cyanure libres est de 0,19 mg
10 par litre. A partir de la colonne échangeuse de cations,
on élue les cyanocorrinoïdes d'une façon connue
avec une solution aqueuse à 80% en volume d'acétone. On
évapore sous vide l'acétone de l'éluat. La solution aqueuse
obtenue contient 3,8 g de cyanocobalamine et 1,7 g d'autres
15 cyanocorrinoïdes. Par chromatographie liquide à haute pres-
sion on ne détecte aucune hydroxycobalamine dans la solution.
A partir de la solution, on peut préparer de façon connue
une cyanocobalamine cristalline, par exemple par extraction
avec un mélange 1:6 de phénol et de chloroforme, la dis-
20 solution de l'ingrédient actif dans l'eau et le traitement
par l'acétone.

Exemple 4

On procède comme dans l'exemple 3 sauf que de la solution
obtenue après rupture et séparation des cellules, on adsorbe
25 les corrinoïdes sur une montmorillonite correspondant à 2%

en poids, après réglage du pH à 3,5. Une fois l'adsorption terminée, on élimine l'argile d'adsorption par filtration et on lave jusqu'à neutralité avec de l'eau. On agite l'adsorbant avec 10 litres d'une solution aqueuse 40 mg/l de cyanure de sodium pendant 30 minutes, on filtre et on lave l'adsorbant qui reste sur le filtre avec 20 litres d'eau. On élue les corrinoïdes de l'adsorbant avec une solution aqueuse à 60% en volume d'éthanol. On élimine l'éthanol de l'éluat par évaporation sous vide. La solution aqueuse obtenue contient 3,5 g de cyanocobalamine et 1,6 g d'autres cyanocorrinoïdes.

REVENDICATIONS

1. Procédé de conversion de corrinoïdes produits par des microorganismes en cyanocorrinoïdes par une réaction avec des cyanures, caractérisé en ce qu'on met en contact un bouillon de fermentation obtenu par rupture
5 des cellules de microorganismes d'une façon connue, de préférence, par traitement thermique en présence ou en l'absence d'ions sulfite, facultativement après des stades connus de purification, avec un adsorbant convenable ou une résine échangeuse d'ions ; on traite les corrinoïdes adsorbés à la surface de l'adsorbant ou de la résine avec
10 une solution aqueuse contenant des ions cyanure ou un composé capable de fournir des ions cyanure, en une quantité procurant les ions cyanure avec un excès molaire de 1,1 à 2,0 par rapport aux corrinoïdes ; on lave
15 l'adsorbant ou la résine échangeuse avec de l'eau ; et on élue les cyanocorrinoïdes obtenus d'une façon connue, de préférence avec de l'éthanol aqueux.
2. Procédé selon la revendication 1, pour le traitement des bouillons de fermentation obtenus par traitement
20 thermique des cellules de microorganismes, caractérisé en ce qu'on traite le bouillon de fermentation non filtré obtenu après rupture par traitement thermique, avec une résine macroréticulaire d'adsorption, de préférence par technologie en lit fluidisé ; on met en contact la résine
25 contenant les corrinoïdes adsorbés avec une solution aqueuse renfermant des ions cyanure en un excès molaire

de 1,1 à 2,0 par rapport aux corrinoïdes et on procède ensuite comme dans la revendication 1.