

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY 95733

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 18.09.75 (P. 183422)

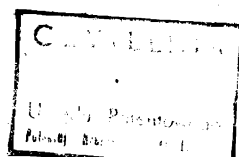
Pierwzeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 14.08.76

Opis patentowy opublikowano: 31.01.1980

MKP A23k 1/17

Int. Cl². A23K 1/17



Twórcy wynalazku: Halina Dahlig, Marian Tyc, Wojciech Sławiński,
Olgiard Lubiński, Leonard Karabin, Zdzisław Szyпка,
Jerzy Mazurczak, Aleksandra Konecka

Uprawniony z patentu : Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania preparatu paszowego

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania preparatu paszowego do stosowania jako dodatku do karmy dla zwierząt gospodarskich, w którym czynnym składnikiem antybiotycznym jest salicylan bacytracyny.

Pochodne bacytracyny opisane w patencie polskim nr 72067, wśród których wymieniono salicylan i 5-sulfosalicylan bacytracyny, otrzymano z czystej bacytracyny po wyodrębnieniu jej z brzezki fermentacyjnej i oczyszczeniu, a następnie poddaniu reakcji z kwasem.

Otrzymany w ten sposób produkt oczyszczano dla uzyskania substancji (nie zawierającej składników dodatkowych) do porównania jej mocy z mocą standardu bacytracyny. Substancja taka miała służyć w przyszłości jako wzorzec nowego związku dla porównywania produktów zawierających addukt bacytracyny.

Dotychczas stosowane preparaty paszowe bacytracyny zawierały przede wszystkim kompleks tego antybiotyku z cynkiem.

Poszukiwania nowych stymulatorów wzrostu zwierząt gospodarskich doprowadziły do stwierdzenia, że szczególnie korzystne jest stosowanie preparatów paszowych zawierających sól addycyjną bacytracyny z kwasem salicylowym. Jako wiadomo kwas salicylowy może być stosowany jako składnik pasz stymulujący wzrost zwierząt gospodarskich. W salicylanie bacytracyny znajdują się więc dwa składniki, o tym działaniu w przeciwieństwie do cynk-bacytracyny, gdzie tylko składnik antybiotyczny odgrywa rolę stymulatora.

Przeprowadzone doświadczenia na brojlerach otrzymujących karmę z 5 ppm paszowego salicylanu bacytracyny wykazały przyrost wagi kurcząt średnio o 2,3–2,8% w porównaniu z grupami kontrolnymi, wśród których były również kurczęta otrzymujące dodatkowo oksytetracyklinę w postaci Polfamiku B. Przy tym równocześnie zmniejszyło się zużycie paszy do 2,04 kg/kg przyrostu wagi. Pod względem zmniejszonego zużycia karmy preparat paszowy salicylanu bacytracyny przewyższa również preparat paszowy Zn-bacytracyny i inne pochodne.

W analogicznym doświadczeniu z preparatem Zn-bacytracyny zużycie paszy wynosiło 2,5–2,9 kg/kg przyrostu.

Sposobem według wynalazku do brzezki fermentacyjnej otrzymywanej przy użyciu szczepu z rodzaju *Bacillus*, zwłaszcza uzyskanej przy użyciu szczepów niezdolnych do tworzenia endospor lub o wybitnie

ograniczonej zdolności sporulacji, otrzymanej według patentu polskiego nr 90102, dodaje się nadmiar kwasu salicylowego w formie substancji stałej, zawiesiny lub roztworu aż do doprowadzenia do wartości pH 5,6–6,4. Całość miesza się od 30 minut do godziny, a następnie suszy w suszarni rozpyłowej, utrzymując na wlocie temperaturę 160°C na wylocie 80–100°C.

Otrzymany tym sposobem preparat paszowy zawiera przykładowo:

- około 8% salicylanu bacytracyny
- około 4% salicylanów nieorganicznych i wolnego kwasu salicylowego
- około 86,5% biomasy i soli nieorganicznych
- około 1,5% wody

W przypadku zużycia jako producenta drobnoustrojów przetrwalnikujących, preparat paszowy otrzymuje się z brzeczki pofermentacyjnej po usunięciu, przez sączenie bądź odwirowanie masy komórkowej. Brzeczkę zakwasza się w tym przypadku do wartości pH około 4 rozcieńczonym kwasem siarkowym, sący, następnie bulion alkalizuje roztworem wodorotlenku wapniowego lub sodowego do wartości pH około 7 i postępuje jak poprzednio.

Uzyskany preparat zawiera przykładowo:

- około 12,5% salicylanu bacytracyny
- około 36% salicylanów nieorganicznych i wolnego kwasu salicylowego
- około 50% soli nieorganicznych i organicznych rozpuszczalnych składników

brzeczki oraz

- około 1,5% wody

Preparat paszowy salicylanu bacytracyny otrzymuje się jako dodatek do karmy dla różnych gatunków zwierząt gospodarskich, stosując go w różnych ilościach zależnie od rodzajów zwierząt, dla których pasza jest przeznaczona.

Przykład 1. Brzeczkę zawierającą bacytracynę otrzymywano z fermentacji w kolbach na trzęsawce przy użyciu asporogennego mutantu z rodzaju *Bacillus*.

Stadium posiewowe. Kolby Erlenmayera o pojemności 500 ml, zawierające 50 ml niżej podanej pożywki posiewowej, zaszczepiono komórkami szczepu asporogennego U 3–3/93, zebranymi z dwudniowej hodowli na agarze skośnym.

Skład pożywki posiewowej:

mąka sojowa odtłuszczona	3,0%
mąka ziemniaczana	1,5%
CaCO ₃	0,4%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2%
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,03%
MnSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01%
KH ₂ PO ₄	0,02%
kwas mlekowy spożywczy	0,5%
woda wodociągowa ad	100%

Wartość pH pożywki ustalano roztworem wodorotlenku sodowego. Proces sterylizacji przebiegał w 117°C w ciągu 30 minut. Po sterylizacji wartości pH wynosiła 6,8.

Kolby z zaszczepioną pożywką wstawiono na trzęsawkę obrotową o 240 obr./min. Inkubowano w temperaturze 33°C w ciągu 24 godzin. Otrzymana hodowla służyła jako materiał szczepienny dla stadium produkcyjnego.

Stadium produkcyjne. Do kolb Erlenmayera o pojemności 500 ml zawierających po 30 ml niżej podanej pożywki produkcyjnej dodano hodowlę stadium posiewowego w ilości 1,5% w stosunku do objętości pożywki.

Pożywka produkcyjna:

mąka sojowa odtłuszczona	5,0%
mąka ziemniaczana spożywcza	2,0%
kwas mlekowy spożywczy	1,1%
CaCO ₃	0,3%
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,03%
MnSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2%
KH ₂ PO ₄	0,01%
woda wodociągowa ad	100%

Wartość pH pożywki ustalono roztworem wodorotlenku potasowego. Pożywkę wyjąłowiano w 177°C w ciągu 30 minut. Po wyjąłowieniu wartość pH wynosiła 6,9.

Fermentację prowadzono w temperaturze 33°C na trzęsawce obrotowej o 240 obr./min., Po zakończeniu fermentacji, co nastąpiło po 38 godzinach fermentacji, płyny fermentacyjne wykazywały aktywność 392 j/ml w przeliczeniu na bacytracynę. Oznaczenie bacytracyny przeprowadzano metodą biologiczną płytkowo-cylinderkową używając jako szczepu testowego *Micrococcus flavus* ATCC 10240.

Do 7 l brzeczki o pH 8,3 dodano 32 g kwasu salicylowego, po czym mieszano przez 30 minut w temperaturze pokojowej uzyskując wartość pH 6,0. Otrzymaną zawiesinę suszono na suszarni rozpyłowej utrzymując na wlocie temperaturę 160°C, na wylocie 80–100°C. Otrzymano 520 g produktu zawierającego ok. 4% kwasu salicylowego i wykazującego aktywność 4,6 j/mg w przeliczeniu na bacytracynę. Z otrzymanego preparatu paszowego salicylanu bacytracyny przygotowano karmę dla drobiu stosując 5–10 ppm w przeliczeniu na bacytracynę do mieszanki DK („Bacutil”) uzupełnionej śrutą z kukurydzy.

Przykład II. Biosyntezę bacytracyny prowadzono w fermentorach szklanych.

Stadium posiewowe I. Hodowlę posiewową przygotowano w sposób podany w przykładzie I (stadium posiewowe).

Stadium posiewowe II. Do kolb Erlenmayera o pojemności 500 ml zawierających po 30 ml jałowej pożywki posiewowej dodano po 0,3 ml hodowli stadium posiewowego I. Hodowlę inkubowano w temperaturze 33°C na trzęsawce obrotowej o 240 obr./min. w ciągu 18 godzin. Hodowla ta służyła jako inoculum dla stadium produkcyjnego.

Stadium produkcyjne. Do fermentorów szklanych o pojemności 14 l wiano 7 l pożywki produkcyjnej (patrz przykład I) z dodatkiem 0,2% surowego oleju sojowego. Proces wyjąłowienia prowadzono w autoklawie w temperaturze 120°C w ciągu 60 minut. Po sterylizacji wartość pH wynosiła 6,9. Wyjąłowioną pożywkę zaszczerpiono hodowlą stadium II dodając 1% w stosunku do objętości pożywki. Biosyntezę antybiotyku prowadzono w temperaturze 32°C przy stałym napowietrzaniu wynoszącym 1,5 objętości powietrza na objętość pożywki na minutę i przy stałym mieszaniu (800 obr./min.). W czasie fermentacji podawano pompą perystaltyczną olej sojowy jako środek przeciwpianowy. Po zakończeniu fermentacji, co nastąpiło w 30 godzinie, płyny pofermentacyjne wykazywały aktywność 396 j/ml bacytracyny, a wartość pH wynosiła 8,3.

Do 10 l brzeczki dodano 57 g kwasu salicylowego, mieszano w temperaturze pokojowej 1 godzinę. Całość mieszaniny reakcyjnej o wartości pH 6,3 skierowano do suszenia rozpyłowego postępując jak w przykładzie I. Otrzymano 800 g preparatu paszowego salicylanu bacytracyny o aktywności 3,7 j/mg w przeliczeniu na bacytracynę. Karmę dla drobiu przygotowano analogicznie jak w przykładzie I stosując 5–10 ppm.

Przykład III. Biosyntezę bacytracyny prowadzono w kolumnie fermentacyjnej przy użyciu wysokoaktywnego mutantu sporogennego Zp/L–2.

Materiał szczepienny przygotowano w kolbach na trzęsawce w sposób podany w przykładzie II (stadium posiewowe I i stadium posiewowe II). Różnica polegała na użyciu szczepu Zp/L–2.

Do kolumny fermentacyjnej o pojemności 2,5 l wiano 1,75 l pożywki produkcyjnej o składzie podanym w przykładzie I, wyjąłowionej w autoklawie w temperaturze 120°C w ciągu 45 minut. Jałową pożywkę zaszczerpiono inoculum (stadium posiewowe II) w ilości 1% w stosunku do objętości pożywki. Hodowlę prowadzono w temperaturze 33°C, przy stałym napowietrzaniu 1,2 objętości powietrza na objętość pożywki na minutę. Jako środka przeciwpianowego użyto mieszaniny oleju sojowego i smalcu (1 : 1). Proces zakończono w 29 godzinie fermentacji. Aktywność płynów pofermentacyjnych wynosiła 342 j/ml, a wartość pH 7,8.

Brzeczke po zakończeniu procesu fermentacji zakwaszono kwasem siarkowym 5 n do wartości pH 4. Odsączono biomase drobnoustroju produkcyjnego i przemyto wodą. Otrzymany bulion zadano 20% NaOH doprowadzając pH do wartości 6,8–7,0. Następnie dodając wodną zawiesinę kwasu salicylowego doprowadzono pH do wartości 5,7. Uzyskany roztwór skierowano do suszenia rozpyłowego, jak w przykładzie I. Uzyskano 24 g preparatu paszowego salicylanu bacytracyny o aktywności 7,1 j/mg w przeliczeniu na bacytracynę. Z preparatu przyrządzono karmę dla drobiu stosując go w ilości 5–10 ppm analogicznie jak w przykładzie I.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania preparatu paszowego zawierającego salicylan bacytracyny, z n a m i e n n y t y m, że bacytracynę zawartą w brzeczce fermentacyjnej lub bulionie poddaje się reakcji z kwasem salicylowym, w formie substancji stałej, zawiesiny lub roztworu wodnego, w nadmiarze do wartości pH mieszaniny reakcyjnej 5,6–6,4, korzystnie 5,7–5,9, po czym odparowuje uzyskując suchą pozostałość stanowiącą preparat paszowy.