



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 42378

Kl. 30 h, 2/20

Jerzy Pawełekiewicz

Poznań, Polska

Karol Zodrow

Poznań, Polska

Sposób otrzymywania witaminy B₁₂ na drodze mikrobiologicznej

Patent trwa od dnia 3 sierpnia 1956 r.

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania witaminy B₁₂ na drodze mikrobiologicznej. Z chwilą kiedy stwierdzono, że witamina B₁₂ prócz działania leczniczego w anemii złośliwej działa również wzrostowo na różne zwierzęta hodowlane, wzrosło ogromnie zapotrzebowanie na tę substancję. Dodatek do paszy, zwłaszcza pochodzenia roślinnego, witaminy B₁₂ powoduje lepsze wykorzystanie paszy oraz szybszy wzrost zwierząt nie spaśanych.

Koncentrat witaminy B₁₂ oraz krystaliczną witaminę B₁₂ można otrzymać z dosyć dużą wydajnością z produktów pofermentacyjnych fabrykacji streptomycyny, chlorotetracykliny i innych antybiotyków.

Okazało się też, że bogatym źródłem witaminy B₁₂ są ścieki miejskie.

Znane dotychczas sposoby nie pozwalają jednak na otrzymanie witaminy B₁₂ w wysokich stężeniach. Tak na przykład w specjalnych

kulturach *Streptomyces olivaceus* wydajności witaminy B₁₂ są rzędu 3 mg na jeden litr pożywki. (Pfeifer V. P., Vojnovich C. i Heger E. N., Ind. Eng. Chem. Tom 46, str. 843 rok 1954), a najwyższa wydajność o jakiej jest wzmianka w literaturze wynosi 8 mg witaminy B₁₂ na litr pożywki (Perlman D., Brown W. H. i Lee S. B., Ind. Eng. Chem. Tom 44 strona 1996 — rok 1952).

Niskie stężenia witaminy B₁₂ przy równocześnie wysokich stężeniach substancji balastowych, podrażają koszty produkcji koncentratów jak i krystalicznej witaminy B₁₂.

Stwierdzono, że przez odpowiednie prowadzenie hodowli bakterii kwasu propionowego można uzyskać wysokie wydajności witaminy B₁₂, rzędu 10 mg na jeden litr hodowli, o czystości 1—2 mg witaminy B₁₂ na 1 gram suchej masy.

Sposób według wynalazku polega na wyhodowaniu hodowli matki i odwirowaniu z niej komórek bakteryjnych, którymi zaszczepia się

właściwą pożywkę produkcyjną. Objętość hodowli matki powinna wynosić co najmniej 10% objętości pożywki produkcyjnej. Kwasy powstające w czasie hodowli należy przy tym zobojętnić, najlepiej roztworami wodorotlenków alkaliów lub węglanów potasowców tak, ażeby pH pożywki produkcyjnej wynosiło stale 5,5—7, przy czym hodowlę produkcyjną dokarmia się okresowo gliceryną lub cukrami (glukozą, laktazą itp.). Jako pożywkę stosuje się kwasowe i enzymatyczne hydrolizaty białek, zwłaszcza kazeiny lub innych białek, np. z grzybni promieniowców, białek zwierzęcych itp., ponadto sole magnezu, kobaltu i żelaza, fosforany, kwas pantotenowy lub jego sole i biotynę. Kwas pantetonowy lub biotynę można zastąpić naturalnymi ekstraktami zawierającymi te substancje, np. ekstraktem drożdżowym, wyciągami roślinnymi itp. Do pożywki o wyżej wymienionym składzie dodaje się, zwłaszcza w końcowym okresie prowadzenia hodowli, 5,6-dwumetylobenzimidazolu, w celu biosyntetycznego przeprowadzenia nieczynnej biologicznie ani klinicznie witaminy B_{12p} w witaminę B₁₂ czynną biologicznie i klinicznie.

Sposób prowadzenia hodowli przy zastosowaniu tego związku został już opisany w patencie nr 38116.

Przykład. Pożywkę o składzie

Kwasowy hydrolizat kazeiny . . .	2 g N
Trypsynowy hydrolizat kazeiny . . .	2 g N
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,8 g
K ₃ PO ₄	1,8 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,4 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	10 mg
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	8 mg
Pantotenian wapniowy	4 mg
Biotyna	0,3 mg
Gliceryna	25 g
Woda	1000 ml

i objętość 200 ml zaszczepiono zawieszoną bakterii propionowych, przygotowaną przez rozmnożenie wyżej wymienionych bakterii w hodowlach próbówkowych. Po 2—4 dniach hodowania hodowli — matki w temperaturze 28—30°C odwirowano bakterie i przeniesiono do świeżej pożywki o objętości 1000 ml. Kulturę produk-

cyjną hodowano w ciągu 20 dni w temperaturze 30°C. W czasie trwania hodowli dodawano stopniowo do podłoża hodowli węglanu sodowego w taki sposób, aby pH pożywki nie spadło poniżej 5,5 i nie przekraczało wartości 7,0. Równocześnie w odstępach kilkudniowych dodawano glicerynę (lub glukozę). W sumie zużyto około 30 g gliceryny (lub glukozy). Po 15-stu dniach hodowli dodano 10 mg 5,6-dwumetylobenzimidazolu.

W procesie prowadzonym w opisany sposób otrzymuje się z 1 litra hodowli 6—10 g masy bakteryjnej, zawierającej 9—10 mg czystej witaminy B₁₂.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymania witaminy B₁₂ na drodze mikrobiologicznej, znamieny tym, że do pożywki zawierającej kwasowe i enzymatyczne hydrolizaty białek, np. kazeiny, dodaje się w ilości co najmniej 10% objętości hodowli produkcyjnej, komórki bakteryjne pochodzące z wyhodowanej oddzielnie hodowli — matki, a proces technologiczny prowadzi się tak, aby w czasie hodowli pH pożywki wynosiło 5,5—7, przy czym hodowlę produkcyjną dokarmia się okresowo gliceryną lub cukrami.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że powstający w czasie hodowli nadmiar kwasu zobojętnia się roztworami wodorotlenków lub węglanów, zwłaszcza potasowców.
3. Sposób według zastrz. 1—2, znamieny tym, że do pożywki produkcyjnej dodaje się, zwłaszcza w końcowym okresie prowadzenia hodowli, 5,6-dwumetylobenzimidazol.
4. Sposób według zastrz. 1—3, znamieny tym, że do pożywki dodaje się kwasu pantetonowego lub biotyny lub naturalnych ekstraktów, zawierających te substancje, np. ekstraktu drożdżowego, ekstraktu roślinnego itp.
5. Sposób według zastrz. 1—4, znamieny tym, że do pożywki dodaje się soli mineralnych.

Jerzy Pawełkiewicz

Karol Zodrow

Zastępca: Kolegium Rzeczników Patentowych.