

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

66611

Patent dodatkowy
do patentu 64 983

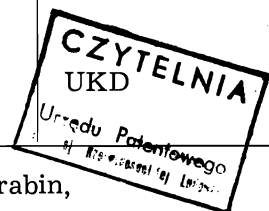
Zgłoszono: 17.III.1969 (P 132 385)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 15.III.1973

Kl. 30h,2/20

MKP C12d 5/04



Współtwórcy wynalazku: Tadeusz Szczesniak, Leonard Karabin,
Krystyna Wituch

Właściciel patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, 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 z opisu patentowego nr 59792 wytwarzanie ryboflawiny w podpowierzchniowej hodowli grzyba Ashbya gossypii na pożywkach zawierających tłuszcz pożelatynowy jako źródło węgla. Użytkiwane tą metodą wydajności ryboflawiny wynosiły 3781 µg/ml.

Postępem w tej dziedzinie był sposób ujawniony w opisie patentowym nr 64983. Polegał on na wytwarzaniu ryboflawiny metodą biosyntezy w podpowierzchniowej hodowli grzyba Ashbya gossypii na pożywkach zawierających tłuszcz pożelatynowy jako źródło węgla, przez wstępne pasażowanie grzyba Ashbya gossypii przez odpowiednio dobrane pożywki stałe i płynne, a następnie hodowli w płynnej pożywce produkcyjnej zawierającej jako źródło azotu klej skórnym i/lub kostnym. Uzyskiwane tą metodą wydajności ryboflawiny wynosiły 5910 µg/ml.

Stwierdzono, że wydajność ryboflawiny można jeszcze znacznie podwyższyć do 6420 µg/ml jeżeli jako źródło węgla w pożywkach zastosuje się tłuszcz kostny lub tłuszcz skórnym, albo w mieszaninie z innymi tłuszczami roślinnymi i zwierzęcymi, które wprowadza się bezpośrednio do pożywki posiewowej w ilości 0,1—6,0% wagowych, a podczas hodowli grzyba Ashbya gossypii w ilości 0,1—5,0% wago-

2

wych. Tłuszcz kostny lub tłuszcz skórnym wprowadza się do pożywki podczas hodowli Ashbya gossypii pomiędzy 0—120 godziną hodowli.

Ilościowy i jakościowy skład kwasów tłuszczowych w tłuszczu pożelatynowym, kostnym i skórnym obrazuje tablica 1.

Tablica 1

Ilościowy i jakościowy skład kwasów tłuszczowych w różnych tłuszczach

10

15

20

25

30

Wzór sumaryczny kwasu tłuszczowego	Zawartość kwasów tłuszczowych w procentach		
	tłuszcz pożelatynowy	tłuszcz kostny	tłuszcz skórnym
C ₁₄ H ₂₆ O ₂	—	0,4	0,2
C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1,4	1,5	1,2
C ₁₅ H ₃₀ O ₂	—	0,4	0,3
C ₁₆ H ₃₂ O ₂	23,5	24,3	25,2
C ₁₆ H ₃₀ O ₂	4,0	3,1	2,8
C ₁₆ H ₂₈ O ₂	0,5	—	—
C ₁₆ H ₂₆ O ₂	0,5	—	—
C ₁₇ H ₃₄ O ₂	—	1,1	0,9
C ₁₈ H ₃₆ O ₂	10,3	15,9	16,4
C ₁₈ H ₃₄ O ₂	55,0	47,4	48,2
C ₁₈ H ₃₂ O ₂	3,3	3,2	3,2
C ₂₀ H ₃₈ O ₂	1,5	1,3	1,1
C ₂₀ H ₄₀ O ₂	—	0,4	0,3

Sposób prowadzenia hodowli *Ashbya gossypii* i wydajności ryboflawiny w płynnej pożywce produkcyjnej zawierającej tłuszcz kostny lub tłuszcz skórną przedstawia szczegółowo przykład, w którym procenty oznaczają procenty wagowe o ile nie zaznaczono inaczej.

Przykład. 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% objętościowych

Wartość pH pożywki nastawiano na 6,9 za pomocą wodorotlenku potasu. Tak przygotowaną pożywkę rozlewano po 10 ml do probówek i wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut.

Probówki z pożywką szczepiono 5 dniową kolonią grzyba wyhodowaną na pożywce stałej.

Przygotowano pożywkę stałą o następującym składzie:

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

Wartość pH pożywki nastawiano za pomocą wodorotlenku potasu do 7,2 i wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut.

Pożywkę rozlewano do płytek Petri'ego po 20 ml. Pożywkę stałą szczepiono zawieszoną askospor wyhodowaną na pożywce płynnej. Inkubację przeprowadzano w temperaturze 28°C w ciągu 5 dni.

Otrzymane w ten sposób kolonie grzyba stosowano do szczepienia płynnej pożywki posiewowej I.

Przygotowano płynną pożywkę posiewową I o składzie:

Glukoza czysta (100% suchej masy) 1,0%
Laktoza czysta (100% suchej masy) 0,3%
Pepton 0,5%
Ekstrakt drożdżowy 0,3%
Woda wodociągowa do 100,0%
objętościowych

Wartość pH pożywki nastawiano na 6,5 za pomocą wodorotlenku potasu, 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 I stadium szczepiono 5 dniową kolonią grzyba wyhodowaną na pożywce stałej.

Hodowlę prowadzono w zaciemnionym pomieszczeniu, na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach/min. i mimośrodzie 25 mm w temperaturze 28°C w ciągu 24 godzin.

Otrzymaną w ten sposób zawieszoną grzybní stosowano do szczepienia płynnej pożywki posiewowej II.

Przygotowano płynną pożywkę posiewową II o składzie:

Drożdże paszowe 2,0%
Tłuszcz kostny lub skórný 1,5%
Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy) 3,0%
Woda wodociągowa do 100,0%
objętościowych

Wartość pH pożywki nastawiano na 7,2, 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 zawieszony grzybní 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 zawieszoną grzybní szczepiono płynną pożywkę produkcyjną.

Przygotowano płynną pożywkę produkcyjną o składzie:

Klej skórný 3,0%
Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy) 6,0%
Glicyna 0,15%
KH₂PO₄ 0,15%
Mg++ 1 µg/ml
Co++ 2 µg/ml
Mn++ 5 µg/ml
Zn++ 10 µg/ml
Woda wodociągowa do 100,0%
objętościowych

Wartość pH pożywki nastawiano na 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 kostny lub skórný w ilości 4,0% objętościowych. Pożywki wyjaławiano w temperaturze 110°C w ciągu 3 godzin.

Każdą kolbę z pożywką szczepiono 1 ml zawieszony grzybní z płynnej pożywki posiewowej II.

Hodowlę prowadzono w zaciemnionym pomieszczeniu, na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach/min. i mimośrodku 25 mm, w temperaturze 28°C, w ciągu 192 godzin.

Do każdej kolby z określonej partii pożywki produkcyjnej zawierającej tłuszcz kostny lub skórný w ilości 4,0% objętościowych dodawano taki sam tłuszcz w ilości 2,5% objętościowych w 72, 96, 120 oraz 72 i 120 godzinie hodowli *Ashbya gossypii*.

Zawartości ryboflawiny (witaminy B₂) po 192 godzinach hodowli *Ashbya gossypii* w pożywkach, do których dodawano tłuszcz kostny w różnych godzinach hodowli przedstawione są w tablicy 2.

Tablica 2

Czas dodawania tłuszczu kostnego			
72 godzina µg/ml	96 godzina µg/ml	120 godzina µg/ml	72 i 120 godzina µg/ml
3560	3510	2850	6420

Jak wykazano powyżej największą wydajność ryboflawiny otrzymano w pożywce, do której dodano tłuszcz kostny dwukrotnie w 72 i 120 godzinie hodowli.

Zawartości ryboflawiny (witaminy B₂) po 192 godzinach hodowli *Ashbya gossypii* w pożywkach, do których dodawano tłuszcz skórný w różnych godzinach hodowli, przedstawione są w tablicy 3.

5
Tablica 3

Czas dodawania tłuszczu skórnego			
72 godzina μg/ml	96 godzina μg/ml	120 godzina μg/ml	72 i 120 godzina μg/ml
3440	3280	2670	6320

Jak wykazano wyżej największą wydajność ryboflawiny otrzymano w pożywce, do której dodawano tłuszcz skórną dwukrotnie w 72 i 120 godzinie hodowli.

W przykładzie I wykazano, że sposobem według wynalazku można otrzymać wysokie wydajności ryboflawiny stosując płynne pożywki zawierające tłuszcz kostny lub tłuszcz skórną.

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

6
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania ryboflawiny metodą biosyntezy w podpowierzchniowej hodowli grzyba Ashbya gossypii przez wstępne pasażowanie grzyba Ashbya gossypii przez odpowiednio dobrane pożywki stałe i płynne, a następnie hodowli w płynnej pożywce produkcyjnej zawierającej jako źródło azotu klej skórną i/lub klej kostny, według patentu nr 64983 **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w płynnej pożywce posiewowej, a następnie w płynnej pożywce produkcyjnej, które zawierają jako źródło węgla tłuszcz kostny lub skórną.
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że tłuszcz kostny lub skórną wprowadza się bezpośrednio do pożywki w ilości od 0,1% do 6,0% wagowych a podczas hodowli Ashbya gossypii w ilości od 0,1% do 5,0% wagowych.
3. Sposób według zastrz. 1, 2 **znamienny tym**, że tłuszcz kostny lub skórną wprowadza się do pożywki podczas hodowli Ashbya gossypii pomiędzy 0—120 godziną hodowli.