

P.- 7338.-

Case 2.581.-

187371



- 8 MAR. 1949

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

MEMORIA DESCRIPTIVA

187371

para solicitar

P A T E N T E D E I N T R O D U C C I O N

e n

E S P A Ñ A

por DIEZ años

a nombre de MERCK & CO., INC., entidad norteamericana, establecida en 126 East Lincoln Avenue, Rahway, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRUDCCION DE PENICILINA".

-o-

Este invento se refiere a procedimientos mejorados para la producción de penicilina.

5 Cuando se emplee el vocablo "penicilina" en toda esta Memoria, pretende definir la sustancia antibacteri-
ca producida por mohos pertenecientes al género Penicillium cuando el pH del medio es casi neutro o está en el lado alcalino, las propiedades de cuya sustancia han sido descritas por Abraham y otros (Lancet, 241, 177-89, 1941; y Br. Jr. Exp. Path., 23, 103-120, 1942); a distinción del prin-



187371

5 cípio diferente aislado y descrito por Coulthard y otros (Nature, 150, 634-35, 1942); y Roberts (Jr. Biol. Chem, 147, 47-58, 1943), y que es formado por mohos pertenecientes al género Penicillium cuando el medio permanece distintamente ácido, en la escala de pH de aproximadamente 3,0 a 5,0.

10 Los procedimientos hasta ahora conocidos para la producción de penicilina suponen el tipo de crecimiento en tampón superficial estacionario del Penicillium notatum en capas de medios de escasa profundida-d. Tales procedimientos estacionarios de tampón superficial son desventajosos para las operaciones comerciales de producción en gran escala.

15 Hemos descubierto ahora un método por el cual se produce penicilina mediante razas de Penicillium productoras de penicilina, en condiciones sumergidas. El procedimiento sumergido de nuestro invento posee muchas ventajas sobre el procedimiento por capa de poca altura, y representa un tremendo ahorro en espacio, trabajo, equipo y tiempo, con una economía resultante en los gastos de producción. 20 Por la práctica del invento, se dispone por primera vez de un procedimiento práctico para la manufactura comercial en gran escala de penicilina.

25 De acuerdo con nuestro invento, se produce penicilina con grandes rendimientos, en condiciones sumergidas, empleando aireación, o aireación más agitación mecánica, cuando un medio acuoso es sometido a la acción de razas de Penicillium productoras de penicilina, tales como el Pen. notatum



187371

o el Pen. chrysogenum, mientras se mantiene el medio a un pH de aproximadamente 6,0-8,5. Hemos descubierto que, en tales condiciones sumergidas de formación de penicilina, se consigue un crecimiento exuberante del moho mucho más rápidamente que en los cultivos estacionarios, y el organismo crece homogéneamente a través de la masa del medio líquido, en forma de pequeñas colonias separadas y piezas mayores o menores de micelio vegetativo, y puede cultivarse en tanques adecuados. Además, la proporción de formación de la penicilina se acelera marcadamente en condiciones sumergidas de acuerdo con nuestro invento, y se consigue la máxima formación de penicilina en un período de tiempo más corto que el requerido en las condiciones de crecimiento superficial estacionario (2-6 días en comparación a 7-14 días o más.

La aireación, o la aireación y agitación, empleadas en nuestro procedimiento, pueden obtenerse por medio de cualquier método o de cualquier dispositivo, o combinaciones de dispositivos, que aseguren la disolución adecuada del aire a través de todo el medio. Por ejemplo, puede hacerse pasar aire a través de la altura del medio en un tanque de bastante altura, habiendo sido conducido dentro del tanque mediante una simple apertura de tubo. La adecuada disolución del aire puede asegurarse por agitación mecánica, por ejemplo, mediante hélices o un tubo-mezclador, o la disolución del aire puede lograrse haciéndolo pa-



187371

5

sar por pulverizadores o dispositivos similares que, de hecho, desmenuzan el aire de modo que se presenta una mayor superficie del ~~aire~~ las células suspendidas en el medio. En el último caso, la agitación mecánica puede reducirse o eliminarse en absoluto, siendo suficiente el paso del aire a través del líquido para proporcionar una adecuada agitación para la operación satisfactoria del procedimiento.

10

Pueden usarse varios medios para la producción de penicilina en condiciones sumergidas, de acuerdo con nuestro invento. Por ejemplo, tales medios pueden contener material nutritivo que incluya una fuente de carbono y energía. En ciertos casos, a describir en lo que sigue, los medios pueden contener además una mezcla orgánica compleja que comprende sustancias nitrogenadas.

15

En el medio, podemos utilizar sales minerales nutritivas como, por ejemplo, sales nitradas, como las de sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.; urea, sales amoniacales, líquido de maceración del maíz, etc. Las sales minerales nutritivas pueden utilizarse en diversas combinaciones y concentraciones, representado esencialmente la siguiente una composición típica: NaNO_3 - 6,0 grs.; KH_2PO_4 - 1,5 grs.; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 grs.; por litro de agua.

20

25

Como fuente de carbono y energía, podemos utilizar sustancias asimilables por razas de Penicillium productoras de penicilina, incluyendo los hidratos de carbono, el glicerol, las mezclas de los mismos, líquido de maceración del maíz, etc. La fuente de carbono y energía puede usar-



se en concentraciones de 0.5 - 10% y, con preferencia, en concentraciones de 1-4%, por volumen de medio.

5 Algunas sustancias, tales como el líquido de maceración del maíz, por ejemplo, contienen tanto material nutritivo como la fuente de carbono y energía asimilables por razas de Penicillium productoras de penicilina y, por consiguiente, un medio acuoso de las mismas puede usarse para la producción de penicilina, de acuerdo con este invento.

10 Hemos comprobado, además, que cuando se usa un medio de cultivo que comprende sales minerales nutritivas y una fuente de carbono y energía, tal como el glicerol, azúcar morena, dextrosa, melazas, sacarosa, almidón, etc., la velocidad de formación de penicilina es favorecida si tal medio es suplementado por la adición de ciertas mezclas orgánicas complejas que comprenden sustancias nitrogenadas. 15 Las mezclas orgánicas complejas que comprenden sustancias nitrogenadas y que son útiles para esta finalidad incluyen líquido de maceración del maíz, harina de tortas de haba de soja, harina de semillas de algodón, extracto de levadura, autorizado de Penicillium, etc., o similares. 20

Si en el medio se usan sustancias muy ácidas, tales como el líquido de maceración del maíz, por ejemplo, hemos comprobado que es aconsejable añadir un agente neutralizador tal como el carbonato de calcio, álcalis solubles, como por ejemplo, NaOH o KOH, o mezclas de carbonato de calcio y álcalis solubles. Como ilustración, el agente neutralizador puede ser añadido en una cantidad de aproxi- 25



187371

madamente 0.2-10 grs. a un medio que contenga 30 ml. de líquido de maceración del maix, por litro de medio, con buenos resultados. En lugar de añadir el agente neutralizador al medio, las mezclas orgánicas complejas que comprenden sustancias nitrogenadas pueden tratarse con él antes de su adición al medio.

Para obtener los mejores resultados, el procedimiento sumergido de nuestro invento se realiza preferentemente a una temperatura de 20-25° C, aunque también pueden emplearse temperaturas no comprendidas en esta escala.

Las sales de zinc, tales como el sulfato de zinc, tienen un efecto estimulante decisivo sobre la producción de penicilina, en condiciones sumergidas, salvo en presencia de mezclas orgánicas complejas que comprenden sustancias nitrogenadas, en cuyo caso la sal de zinc parece que no surte efecto. La sal de zinc no precisa añadirse al medio, sino que puede estar contenidas como impureza en alguno o en todos los otros constituyentes, tales como el agua, o las sales nutricias brutas, en cantidades suficientes para satisfacer las necesidades del proceso.

Otro detalle de nuestro invento reside en nuestro descubrimiento de que, en condiciones sumergidas, la producción y la acumulación de penicilina avanza muy satisfactoriamente en tanques construídos de acero al carbono.

A fin de impedir la formación de espuma durante la esterilización del medio, y durante el proceso sumergido, puede añadirse al medio un agente anti-espumante eficaz,

81
MALA REPRODUCCIÓN
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



187371

tal como el citrato tributílico o el aceite de ricino sulfonado, por ejemplo.

Al llevar a la práctica el proceso sumergido de nuestro invento, un medio seleccionado, en condición estéril, es inoculado con un fuerte inóculo de una raza de Penicillium productora de penicilina, tal como el Pen. notatum o el Pen. chrysogenum, y se deja avanzar el proceso en condiciones de aireación, o de aireación y agitación, hasta que se alcanza la máxima actividad productora de penicilina, según se observa por el análisis de muestras de los filtrados de cultivo.

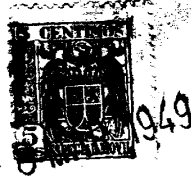
Los ejemplos siguientes ilustran cómo puede practicarse este invento, pero los técnicos comprenderán que las variaciones de los mismos y la sustitución de equivalentes quedan dentro del amplio alcance del invento.

Ejemplo 1.

A 2700 litros de medio estéril que contiene por litro de agua:

Líquido de maceración del maíz	30 mls.
Azúcar morena (calidad n.º 13 blanda)	20 grs.
NaN_3	6 grs.
KH_2PO_4	1,5 grs.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 grs.
CaCO_3	5 grs.

contenido en un tanque de 3.400 litros, se añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum, y la mezcla se aire continuamente por medio de un pulverizador de tubo anular que tiene agujeros de 1.6 mm. Flujo de aire, $540 \text{ dm}^3/\text{min.}$; presión $0.55\text{-}0.83 \text{ Kgs./cm}^2$. En cinco días, una muestra del fil-



187371

trado del cultivo dió en el análisis 40 unidades Florey/ml.

Ejemplo II.

A 200 litros de un medio estéril que contiene por litro de agua:

5	Líquido de maceración del maíz	30 mls.
	Azúcar morena	20 grs.
	NaNO ₃	6 grs.
	KH ₂ PO ₄	1,5 grs.
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 grs.
10	CaCO ₃ (añadido separadamente)	5 grs.
	Citrato tributílico	200 cc.

contenido en un fermentador de acero al carbono equipado con hélices, se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum, y la mezcla se a-irea y agita continuamente. Flujo de aire 4000 dm³/hora: presión 0.34 Kgs/cm²; agitación de las hélices, 400 r.p.m. En cinco días, una muestra del filtrado del cultivo dió en el análisis 49.6 unidades Florey/ml.

Ejemplo III.

20 A un medio estéril que contiene por litro de agua:

	Líquido de maceración del maíz	30 mls.
	NaNO ₃	6 grs.
	KH ₂ PO ₄	1.5 grs.
25	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 grs.
	CaCO ₃	5 grs.
	Melazas	4%

se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum, y la mezcla se airea continuamente en condiciones sumergidas.

30 En 6 días, una muestra del filtrado de cultivo dió en el análisis 43.2 unidades Florey/ml.

Ejemplo IV.



187371

A un medio estéril que contiene por litro de agua:

5	NaNO ₃	6 grs.
	KH ₂ PO ₄	1.5 grs.
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 grs.
	Melazas	4%

se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum y la mezcla se a-irea continuamente en condiciones sumergidas. En seis días, una muestra del filtrado de cultivo dió en el análisis 33.6 unida-des Florey/ml.

10 Ejemplo V.

A un medio estéril que contiene por litro de agua:

	Líquido de maceración del maíz	30 mls.
	NaNO ₃	6 grs.
15	KH ₂ PO ₄	1.5 grs.
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 grs.
	CaCO ₃	5 grs.

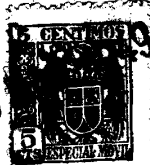
se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum, y la mezcla se airea continuamente en condiciones de cultivo sumergido. En cuatro días, una muestra del filtrado de cultivo dió en el análisis 22.4 unidades Florey/ml.

20 Ejemplo VI.

A un medio estéril que contiene por litro de agua:

	Líquido de maceración del maíz	30 mls.
	NaNO ₃	6 grs.
25	KH ₂ PO ₄	1.5 grs.
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 grs.
	CaCO ₃	5 grs.
	Azúcar morena	1%
	Glicerol	1%

30 se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum y la mezcla se airea continuamente en condiciones sumergidas. En seis días, una muestra del filtrado de cultivo dió en el análisis 60.8 unidades Florey/ml.



187371

Ejemplo VII.

A un medio estéril que contiene por litro de agua:

	Líquido de maceración del maíz	30 mls.
	NaNO ₃	6 grs.
5	KH ₂ PO ₄	1.5 grs.
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 grs.
	CaCO ₃	5 grs.
	Glicérol.	2%

se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum y la
 10 mezcla se aire continuamente en condiciones sumergidas. En
 seis días, una muestra del filtrado de cultivo, dió en el
 análisis 55.2 unidades Florey/ml.

Ejemplo VIII

A un medio estéril que contiene por litro de agua:

15	Líquido de maceración del maíz	30 mls.
	Azúcar morena	20 grs.
	NaNO ₃	6 grs.
	KH ₂ PO ₄	1.5 grs.
20	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 grs.
	CaCO ₃	0.5 grs.

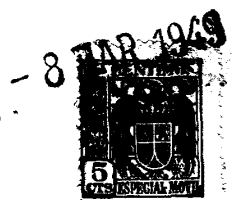
se le añade un fuerte inóculo de Penicillium chrysogenum (Thom.
 n.º. 5034.11) y la mezcla se airea continuamente, en condi-
 ciones sumergidas. En tres días, una mezcla del filtrado de
 cultivo dió en el análisis 18.0 unidades Florey/ml.

Ejemplo IX

A un medio estéril que contiene por litro de agua:

	Líquido de maceración del maíz	3%
	CaCO ₃	0.5-1%

se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum y la
 30 mezcla se airea continuamente en condiciones sumergidas. En
 cuatro días, una muestra del filtrado de cultivo dió en el
 análisis 29 unidades Florey/ml.



187371

Ejemplo X

A un medio estéril que contiene por litro de agua:

3 % de harina de habas de soja,

se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum y la mezcla se airea continuamente, en condiciones sumergidas. En tres días, una muestra del filtrado del cultivo dió en el análisis 17 unidades Florey/ml.

Ejemplo XI

A un medio estéril que contiene por litro de agua:

3 % de harina de semilla de algodón

se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum y la mezcla se airea continuamente, en condiciones sumergidas. En cuatro días, una muestra del filtrado de cultivo dió en el análisis 18 unidades Florey/ml.

Ejemplo XII

A un medio estéril que contiene por litro de agua:

3 % de germen de trigo

se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum y la mezcla se airea continuamente en condiciones sumergidas. En cinco días, una muestra del filtrado del cultivo dió en el análisis 21 unidades Florey/ml.

Ejemplo XIII

A un medio estéril que contiene por litro de agua:

3% de aguas residuales de la fabricación de whiskey

se le añade un fuerte inóculo de Penicillium notatum y la mezcla se airea continuamente en condiciones sumergidas. En cinco días, una muestra del filtrado del cultivo dió en el



187371

análisis 8 unidades Florey/ml.

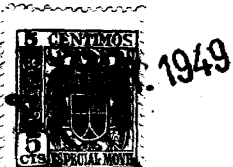
Pueden introducirse modificaciones al realizar el presente invento sin apartarse por ello del espíritu y del alcance del mismo; sólomente hemos de quedar limitados por las reivindicaciones anejas.

-----NOTA-----

Los puntos de invención propia, no nueva, pero no establecida, practicada, ni divulgada en España, que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Introducción, son los siguientes:

1º. Un procedimiento para la producción de penicilina, que comprenda someter un medio acuoso que contiene material nutritivo que incluye una reserva de carbono y energía asimilables por cepas de Penicillium productoras de penicilina a la acción de tales cepas, en condiciones aeróbicas sumergidas.

2º. Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º., en el cual el medio acuoso se mantiene a un pH de aproximadamente 5.0-8.5 mientras está siendo sometido a la acción de las cepas de Penicillium productoras de peni-



187371

oilina.

3º - Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º. o 2º., en el cual dicho medio acuoso contiene sales nutritivas y carbohidrato asimilables por las cepas de Penicillium productoras de penecilina.

4º. - Un procedimiento según se reivindica en el punto 3º., en el cual dicho medio acuoso contiene azúcar morena.

5º. - Un procedimiento según se reivindica en el punto 3º., en el cual dicho medio acuoso contiene melazas.

6º - Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1º a 3º., en el cual dicho medio acuoso contiene líquido neutralizado de maceración del maíz.

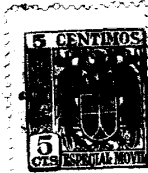
7º - Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1º a 3º., en el cual dicho medio acuoso contiene líquido de maceración de maíz y carbonato de calcio.

8º - Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual dicho medio acuoso contiene una mezcla orgánica compleja que comprende sustancias nitrogenadas.

9º - Un procedimiento para producir penicilina, en esencia como se ha descrito.

10º - Un procedimiento para la producción de penicilina.

Tal y como se ha descrito en la memoria que en-



1949

187371

tesede y para los fines que se han especificado.

Este Memoria consta de catorce hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid a 21 MAY. 1949

Alberto de Elizaburu

Por Poder

**MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL**