

P.- 7520.-

Case 2.584.-



1949

187378

- 9 MAR. 1949

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

187378

PATENTE DE INVENCION

• •

E S P A Ñ A

por VEINTE 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 PRODUCCION DE PENICILINA".

Es

Este invento se refiere a la producción de penicilina, y más particularmente a medios perfeccionados de producir por fermentación bencil-penicilina.

El invento afecta a la producción de penicilina por fermentación, en condiciones aireadas sumergidas, de un medio acuoso nutritivo por medio de un sustrato conveniente

5



187378

para sintetizar más de dos tercios de un miligramo de bencilpenicilina por mililitro de caldo fermentado.

Los hongos productores de penicilina han variado mucho en su capacidad para producir penicilinas. Ciertas mejoras en su capacidad han sido efectuadas por la selección de tipos procedentes de la naturaleza, y por procedimientos de mutación artificial. El mutante artificial conocido como Penicillium chrysogenum Q-176, proporcionado por la American Type Culture Collection de Washington, D.C., y por otras colecciones de tipos, ha sido considerado, en general, hasta ahora, como el mejor productor de penicilina de que podía disponerse. La máxima producción de penicilina por el P. Chrysogenum Q-176 ha oscilado desde unas 900 a 1.000 unidades internacionales de penicilina por mililitro de caldo fermentado. Este rendimiento, económicamente inadecuado, que representa menos de dos tercios de miligramo de penicilina por mililitro de caldo, ha supuesto el empleo de amplios equipos y complicados procedimientos para la producción industrial de penicilina.

Los inconvenientes de un rendimiento tan reducido han sido intensificados por la circunstancia de que, en la producción microbiológica de penicilina, ocurren en el caldo fermentado cierto número de penicilinas que difieren química y biológicamente. De éstas, la bencilpenicilina es la principalmente deseada desde el punto de vista médico, y las proporciones en las cuales ocurre en el caldo fermentado, se ha creído usualmente que dependen principalmente de las condiciones del cultivo, pero los solicitantes han descubierto que



187378

también dependen en gran medida del tipo de hongo empleado en la fermentación. En las condiciones de la producción industrial, la proporción de benzilpenicilina entre las penicilinas totales sintetizadas por el P. crhysoogenum Q-176 ha excedido raramente del 60 por ciento; es decir, el caldo fermentado de este mutante ha oscilado en unas 540 a 600 unidades internacionales de benzilpenicilina por mililitro de caldo, o sólo un rendimiento normal de aproximadamente un tercio de miligramo por mililitro.

Otra desventaja que ocurre en la producción de penicilina por fermentación ha sido que los organismos productores de penicilina empleados hasta ahora han comunicado impurezas coloreadas a la mezcla de penicilinas producidas durante el proceso de fermentación. Estas impurezas, comúnmente amarillentas han hecho precisa la purificación de las sales cristalizadas de benzilpenicilina por repetidos lavados con disolventes, y esta práctica ha disminuído seriamente los rendimientos totales de la benzilpenicilina misma.

Los solicitantes han producido tipos mejorados de hongos productores de penicilina que, cuando son cultivados sumergidos en medios nutricios aireados adecuados, son especialmente aptos para la producción de una cantidad de penicilinas que es en esencia el doble de la cantidad total de penicilinas hechas por los hongos productores de penicilina previamente conocidos. Este cambio desproporcionado en el resultado de la fermentación va acompañado por las nuevas circunstancias ventajosas siguientes: De la cantidad total de penicilinas que los tipos de hongos mejorados de esta solici-



1949

187378

5 tud sintetizan en el caldo fermentado, la proporción de bencilpenicilina aumenta inesperadamente hasta un promedio de 80 por ciento y más, de modo que la cantidad real de bencilpenicilina producida por estos hongos mejorados es del orden de 2 1/2 veces la que es producida por el mejor productor de penicilina anteriormente conocido. Además, el uso de sus tipos de hongos mejorados en los procesos de los solicitantes, tipos que no secretan pigmento durante su actividad de fermentación, permite la consecución económica de rendimientos de aislamiento de sales cristalizadas de bencilpenicilina mayores que los derivados hasta ahora por medio de cualquier hongo conocido productor de penicilina,

10 uno de los objetos de este invento es el de crear medios de mejorar la producción de penicilina por fermentación.

15 Otro objeto de este invento es el de crear medios mejorados para la producción de rendimientos incrementados de bencilpenicilina durante la fermentación en condiciones aireadas sumergidas.

20 Otro objeto es el de crear procedimientos de fermentación para la producción de una proporción aumentada de bencilpenicilina en la mezcla de penicilinas contenidas en el caldo fermentado.

25 Todavía otro objeto es el de crear procedimientos de fermentación que, evitando esencialmente la descarga de pigmentos solubles por los organismos productores de penicilina durante la actividad fermentativa en condiciones aireadas sumergidas, permiten la recuperación de cantidades incre-



187378

mentadas de penicilina, particularmente las sales cristalizadas de bencilpenicilina.

Estos y otros objetos serán aparentes por las descripciones y las reivindicaciones que aquí se exponen.

5 Los solicitantes han descubierto que los micetos particularmente adecuados para la consecución de estos objetos por la fermentación de medios nutricios aireados convenientes son los tipos productores de penicilina, no secretores de pigmentos, de miembros seleccionados de la penicilina, con tal de que sean tipos que, durante la actividad fermentativa, sean capaces de dar 80 % de las penicilinas totales como bencilpenicilina, y esta última en exceso de dos tercios de miligramo por mililitro de caldo fermentado. Entre este grupo, las series del P. chrysogenum son especialmente útiles, notablemente los descendientes mutados del P. chrysogenum.

10

15

Los tipos de hongos definidos por la norma expuesta en el párrafo inmediatamente anterior se obtienen por procedimientos de mutación y de selección. La selección, que implica la elección y el ensayo de tipos mutados para la existencia en los mismos del standard deseado, puede seguir a la mutación artificial o natural.

20 A continuación se describe un procedimiento ilustrativo de la forma en que se obtuvo un tipo de hongo standard según se usa en este invento.

25 Las esporas del conocido mutante P. chrysogenum Q-176 productor de penicilina, secretor de pigmento, que habían sido cultivadas en peptona-glucosa agar se pusieron en suspensión en agua estéril de la fuente y luego se some-



187378

tieron a una radiación ultra-violeta de una lámpara esterilizadora Westinghouse tipo 3B-WL782 que tenía una intensidad máxima a 2537 Å. Estas esporas estaban a una distancia de 200 mm de esta fuente de radiaciones. La duración de esta exposición a la luz fué de una hora. La temperatura durante esta exposición fué de 25°C.

Las esporas así tratadas se recubrieron con placas de peptona-glucosa agar y se hicieron transferencias a cultivos inclinados de agar de todas las colonias que se desarrollaron de las esporas supervivientes. Se ensayo la productividad de penicilina de los aislados resultantes, y el aislado de producción más elevado se seleccionó para el tratamiento ulterior siguiente.

Las esporas de este aislado se lavaron en agua estéril del grifo, se filtraron a través de algodón, y se irradiaron en una capa de poca altura en una cubeta de petri abierta con luz ultravioleta durante un periodo de 8 minutos. La fuente de luz era una lámpara Hanovia tipo 16200, operada a una distancia de 100 mm. de la suspensión de las esporas. La temperatura de exposición fué de 25°C. Las esporas supervivientes se recubrieron con placas de dextrosa de patata y agar. Se hicieron transferencias a cultivos inclinados de agar de esporas de todas las colonias de individuos que se desarrollaron. Las esporas de estos cultivos inclinados seleccionadas para una gran productividad de penicilina se irradiaron luego en la forma últimamente citada. De esta tercera serie irradiada se seleccionó un tipo que tenía el standard deseado, a saber, la incapacidad para secretar



187378

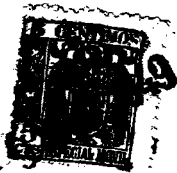
MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

5 pigmentos en medios de fermentación, pero la capacidad de sintetizar 80 % de las penicilinas totales como bencilpenicilina, y la bencilpenicilina así producida, en exceso de dos tercios de un miligramo por mililitro de caldo fermentado.

10 Los tipos mejorados así producidos del mutante P. chrysogenum Q-176 tienen las principales características morfológicas y así son identificados como miembros de la serie P. chrysogenum de los eumicetos. Dicho standard distingue tales tipos mejorados de todos los miembros conocidos productores de penicilina de la serie P. chrysogenum.

15 Ha de entenderse que el anterior ejemplo se da para ilustrar, no para limitar, la forma en la cual se obtienen los tipos mejorados productores de penicilina, no secretores de pigmentos, del standard definido. Diversas modificaciones de los procedimientos se les ocurrirán fácilmente a los técnicos, tales como por la irradiación de mutantes naturales o artificiales, o por variación en la intensidad o en la duración de la irradiación, o por variación de los medios de irradiación o de mutación, o por variación en la forma o en las operaciones de selección y ensayo.

20 Los tipos de hongos que tienen el standard definido son capaces de producir rendimientos mejorados de las penicilinas y particularmente de bencilpenicilina, cuando son cultivados de esporas o de material vegetativo en una variedad de medios en una amplia gama de condiciones de cultivo. Los medios adecuados contienen una fuente de carbono, proporcionado por los carbohidratos, tales como los monosacáridos,



187378

los disacaridos, melazas, productos de granos y cereales; y una fuente de nitrogeno, proporcionada por sales nitrogenadas y complejos nitrogenosos, tales como proteinas o proteinas degradadas. Se le proporcionan al medio diversas sales minerales para satisfacer las necesidades esenciales de estos tipos de hongos, y a menudo se incluye en el medio un agente neutralizador. Los medios contienen también un precursor tal como la fenilacetiletanolamina que suministra el grupo bencilo. Antes de que el medio sea inoculado, es esterilizado por calor y presión.

La fermentación por estos tipos mejorados de hongos es conducida por medio de crecimiento sumergido con agitación y aireación. Un método preferido de agitación es mediante hélices rotativas que funcionan a unas 100 r.p.m. y una proporción preferida de aireación es de aproximadamente medio volumen de aire por volumen de medio por minuto, aunque estos métodos pueden ser modificados sin alterar las capacidades productoras de penicilina de estos tipos de hongos no secretores de pigmentos. Las fermentaciones se dirigen usualmente bajo presión positiva de aire, y a una temperatura controlada dentro de la escala de 20° a 28°C.

E J E M P L O 1.

Se preparó un medio líquido que contiene 30 gramos de lactosa, 30 gramos de sólidos de líquido de maceración del maíz, 1 gramo de CaCO_3 , 1 gramo de fenilacetiletanolamina, 3 gramos de KH_2PO_4 , y agua destilada para completar un litro. Porciones consistentes en 60 ml. de este medio se distribuyeron en matraces Erlenmeyer de 250 ml. tapados con algodón,



187378

conteniendo cada uno 0.25 ml. de aceite de soja. Después de la esterilización de este medio durante 20 minutos a presión de vapor de 1.05 kgs., el contenido de los matraces se inoculó con esporas de dicho mutante estándar inducido por ultravioleta, no secretor de pigmentos, productor de penicilina. Se prepararon análogamente matraces inoculados con las esporas del Penicillium chrysogenum Q-176 productor de penicilina, secretor de pigmentos. La aireación se efectuó por agitación del contenido del matraz sobre un sacudidor rotativo a 220 r.p.m. a 24°C.

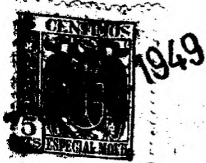
Los siguientes resultados fueron los promedios de varias fermentaciones comparables:

T A B L A I

	Unidades de penicilina por ml.
	<u>5 días</u>
15 P. chrysogenum Q-176 secretor de pigmento...	540
Mutante no secretor de pigmento.....	1660

E J E M P L O 2.

Se preparó el medio siguiente: Solubles secos de destilería, 50 gramos, lactosa, 30 gramos, KH_2PO_4 , 2 gramos, fenilacetiletanolamina, 2 gramos, y agua destilada para completar un litro. El medio se ajustó a pH 6.0 con KOH, y se añadieron 10 gramos de $CaCO_3$. Aliquotas de 60 ml. de este medio se distribuyeron en matraces Erlenmeyer que contenían 0.25 ml. de aceite de soja cada uno. Después de esterilización, el contenido de los matraces se inoculó con material vegetativo de dicho mutante de P. chrysogenum productor de penicilina, no secretor de pigmento, del standard citado. Por lo demás, las otras condiciones eran las mis-



187378

mas que en el ejemplo 1.

T A B L A II.

Días	3	4	5	6
Unidades internacionales de penicilina producidas por ml. de caldo.....	749	727	1060	1325

5 E J E M P L O 3.

Inóculos vegetativos del mutante no secretor de pigmento del ejemplo 2 se usaron en una serie de producciones en gran escala de penicilina en fermentadores de 45.000 litros operados bajo aireación forzada, con agitación mecánica, a una temperatura de unos 24°C. hasta que se alcanzó la máxima producción de penicilina.

10

El medio de fermentación contenía por litro: 30 gramos de lactosa, 38 gramos de sólidos de líquido de maceración de maiz, 1 gramo de CaCO₃, 2 gramos de KH₂PO₄, 1 gramo de fenilacetiletanolamina, y agua del grifo. Se usó aceite de soja como agente anti-espumante.

15

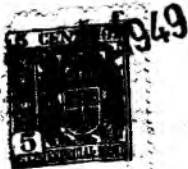
Los resultados obtenidos de esta serie se compararon con los de una serie similar de fermentaciones conducidas con un mutante de P. chrysogenum Q-176 ultravioleta, productor de penicilina, secretor de pigmento.

20

Los siguientes fueron los resultados medios:

T A B L A III.

	<u>Unidades internacionales de penicilinas totales</u>	<u>Unidades internacionales de benzil penicilina</u>
	<u>por ml.</u>	<u>por ml.</u>
Mutante secretor de pigmento	860	605
Mutante no secretor de pigmento	1720	1410



187378

Se observará que se obtuvo un aumento del doble en las penicilinas totales. También se observará que el mutante no secretor de pigmento, al producir 62 % de bencilpenicilina en las penicilinas totales, efectuó un aumento de doble a triple de bencilpenicilina.

EJEMPLO 4.

Las condiciones de fermentación fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 3. Se hicieron 7 ensayos en fermentadores de 45.000 litros con el mutante no secretor de pigmento del ejemplo 2. Se compararon con los ensayos en fermentadores de 45.000 litros operados exactamente en las mismas condiciones, salvo en que se usó un mutante de *P. chrysogenum* 3-176 secretor de pigmento para iniciar la fermentación.

Al terminar estas fermentaciones, la penicilina resultante se separó de los caldos fermentados por una serie de transferencias entre disolventes orgánicos y compensadores inorgánicos. En estas transferencias, se usó pentacetato como disolvente, aunque han resultado satisfactorios otros disolventes, tales como éter etílico, acetato amílico y cloroformo. Compensadores adecuados son mezclas de fosfatos potásicos, o carbonato sódico.

Un precipitante específico de la bencilpenicilina, la *N*-etilpiperidina, se usó para separar esta bencilpenicilina de otras clases de penicilina producidas durante la fermentación. Este precipitado, denominado sal *N*-etilpiperidínica bruta de bencilpenicilina, sirve como compuesto de partida para la recristalización y preparación de la sal sódica cristalizada pura de bencilpenicilina.



- 9 MAR. 1949

187378

La primera operación en la purificación de la sal N-etilpiperidínica de bencilpenicilina supone lavados sucesivos con acetona para separar las impurezas pigmentadas derivadas del caldo de fermentación. Como la sal N-etilpiperidínica de bencilpenicilina es algo soluble en la acetona de lavado, ocurren pérdidas de la misma en esta fase, y no se ha dispuesto de un método satisfactorio para la recuperación en cantidades sustanciales de la bencilpenicilina separada con los materiales pigmentados durante el lavado con acetona.

Se requiere un volumen mucho más reducido, sin embargo, del líquido de lavado, para separar materiales pigmentados de la sal N-etilpiperidínica obtenida de estos nuevos hongos no secretores de pigmentos que de la sal obtenida de la bencilpenicilina de fermentaciones realizadas con los organismos secretores de pigmentos anteriormente usados.

A continuación se da una ilustración de los datos medios de rendimiento de una serie de tandas realizadas en fermentadores de 45.000 litros.

T A B L A IV.

20	Unidades internacionales de penicilina en la sal bruta N-etilpiperidínica	Unidades internacionales de penicilina perdidas en el lavado con acetona	Porcentaje de penicilina perdida en el lavado con acetona
Tipo no secretor de pigmento	16.9×10^9	2.12×10^9	12.5
Tipo secretor de pigmento	12.4×10^9	2.62×10^9	21.2

Se ve por estos datos que, por el uso de un tipo de hongo no secretor de pigmento en la fermentación, la pérdida de aislamiento proporcionada debida al lavado con acetona es

187378

disminuída en 46 %. Esta mejora es adicional a los aumentos en penicilinas totales y bencilpenicilina demostrados en los ejemplos 1, 2 y 3.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 7 de agosto de 1948, bajo el número 45.155, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto de Propiedad Industrial.

- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1º.- Un procedimiento para la producción de penicilina, que comprende la fermentación, en condiciones aireadas sumergidas, de un medio nutritivo acuoso por medio de un eumiceto destinado a sintetizar más de dos tercios de un miligramo de bencilpenicilina por mililitro de caldo fermentado.

2º.- El procedimiento según se reivindica en el punto 1º, en el cual el eumiceto es apto para sintetizar bencilpenicilina en una proporción que representa más de 80 % de las penicilinas totales producidas en el medio fermentado.



187378

39.- El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 y 2 en el cual se producen sales brutas de bencilpenicilina desprovistas en gran medida de impurezas coloradas.

5

42.- El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 3, en el cual el eumiceto está desprovisto de la capacidad de secretar pigmento soluble durante la fermentación.

10

52.- El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 4 en el cual el eumiceto es un *Penicillium* productor de penicilina, no secretor de pigmento.

62.- El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 5, en el cual el eumiceto es un miembro productor de penicilina no secretor de pigmento, de la serie del *Penicillium chrysogenum*.

15

72.- El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 6, que incluye agitar y airear mecánicamente el medio inoculado para favorecer el crecimiento y la fermentación sumergidos.

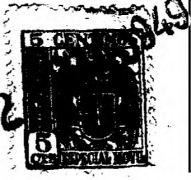
20

82.- El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 7, en el cual el *penicillium chrysogenum* es indetectable por medio de las propiedades bioquímicas standard aquí descritas.

25

92.- El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 8, en el cual la fermentación se realiza a aproximadamente 24°C.

102.- El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 8, que incluye cultivar previamente eumicetos pro-



187378

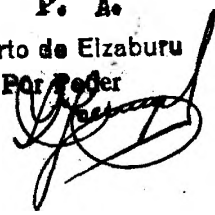
ductores de penicilina en medios nutricios, irradiar sus esporas resultantes, cultivar esporas supervivientes, y seleccionar de la progenie resultante un cultivo no secretor de pigmentos con la propiedad de sintetizar selectivamente benzilpenicilina en exceso de 80 por ciento de las penicilinas totales producidas por él durante la fermentación aireada sumergida de medios nutricios acuosos, inocular luego un medio nutritivo acuoso con material vegetativo de dicho cultivo, permitir que avance la fermentación aireada sumergida a una temperatura dentro de la escala de 20° a 28° C, recoger los productos, y separar la benzilpenicilina de los mismos.

119 - Un procedimiento para la producción de penicilina.

Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta memoria consta de quince hojas escritas por una sola cara.

Madrid, 2 MAY. 1949

F. A.
 Alberto de Elizaburu
 Por Feder


**MALA REPRODUCCION
 POR DEFECTO DEL ORIGINAL**