

188996

P.- 7539.

Case 2.792.



9 JUL 1949

188996

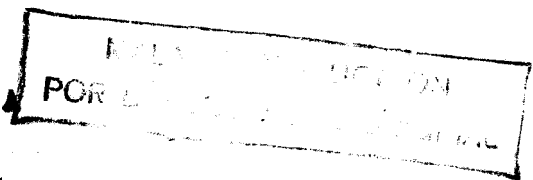
MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCIÓN

en

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 SUSTANCIAS VITAMINICAS POR FERMENTACION".-

Este invento se refiere a la producción de valiosos productos vitamínicos por fermentación. Más especialmente, se refiere a residuos de fermentación que pueden obtenerse por propagación de cepas seleccionadas de Fungi en medios nutritivos y que contienen vitamina B₁₂ sintetizada por hongos y sustancias vitamínicas afines con propiedades favorece.

5



- 9 JUL 6

dores del crecimiento para Lactobacillus lactis Dornier, y que son útiles como complementos alimenticios.

Las sustancias vitamínicas descritas en esta Memoria se ensayan convenientemente utilizando las respuestas al crecimiento del micro-organismo Lactobacillus lactis Dornier en las condiciones de ensayo descritas por Shorb (J. Biol. Chem. 169, 455-6). Las potencias de estas sustancias vitamínicas y de caldos fermentados y concentrados enriquecidos con ellas se expresan en términos de actividad LLD sobre la base de un Standard de hígado arbitrario, teniendo dicho standard una potencia de 1.000 unidades LLD por miligramo. Se ha determinado que la vitamina B₁₂ cristalizada pura tiene un análisis LLD de aproximadamente 11.000.000 de unidades LLD/miligramo.

Se ha sabido desde hace tiempo que los alimentos usuales, para animales y en particular, los usados para volatería, compuestos primordialmente de materias vegetales, tales como granos de cereales, harina de soja, alfalfa, y similares, y adecuados con respecto a su contenido en aminoácidos, minerales, y vitaminas de estructura química conocida, son deficientes en un factor o factores requeridos para la máxima proporción de crecimiento y reproducción adecuada. Este factor se caracteriza por una pronunciada tendencia a ser acumulado en los tejidos y a ser arrastrado a través del huevo al pollo. Debe dárseles a las gallinas raciones alimenticias que contengan este factor a fin de mantener el carácter adecuado de posibilidad de incubación y viabilidad de los pollos incubados. Los pollos deben recibir la sustan-



cia, ya directamente en su alimento, ya indirectamente por medio del huevo desde la gallina a fin de crecer en la proporción óptima y de evitar la mortalidad excesiva. Es evidente que el factor es de gran importancia económica para el agricultor.

5 En la práctica comercial los alimentos prácticos de buena calidad para avicultura contienen este denominado "factor proteínico animal" (al que se hará referencia en esta solicitud como "APF") en forma de subproductos de la carne, harina de hígado, harina de pescado, solubles de pescado, y similares. Estos materiales son relativamente poco abundantes. Tanto los subproductos de la carne como la harina de hígado son caros y aumentan considerablemente el coste de mantenimiento de la volatería. A estas sustancias se les puede oponer asimismo la objeción de que contienen cantidades relativamente pequeñas y variables del "APF". Por consiguiente, se ha deseado encontrar una fuente más concentrada y menos costosa de este importante constituyente de la dieta.

20 Hemos descubierto ahora que los residuos de fermentación activos en LLD producidos por propagación de ciertas cepas de Fungi en medios nutricios acuosos son fuentes concentradas de agentes favorecedores del crecimiento que producen esencialmente el mismo efecto sobre el crecimiento de pollos que el producido por el "factor proteínico animal". Hemos descubierto, además, que, cuando tales residuos de fermentación son sometidos a una operación de purificación, puede obtenerse de ellos vitamina B₁₂ para y que, en una ración por lo demás deficiente en "APF", un nivel de 0.000003% de vita-



188996

mina B₁₂ es capaz de producir un efecto satisfactorio y aparentemente máximo sobre la proporción de crecimiento de los pollos.

Es una característica del presente invento el que, en lugar de aislar la vitamina B₁₂ en forma pura a partir de caldos de fermentación, pueden emplearse concentrados de dichos caldos como suplementos alimenticios en cantidades que dependen de su contenido en sustancias activas en LLD. Hemos descubierto que tales concentrados pueden prepararse en una forma comercialmente practicable propagando cepas de hongos seleccionadas en un medio nutritivo acuoso, y separando luego los constituyentes volátiles de los caldos de fermentación resultantes a temperaturas inferiores a las destructoras de dichas sustancias vitamínicas activas en LLD. Las cepas de hongos que se ha comprobado ser comercialmente factibles para esta finalidad son las que producen caldos de fermentación que dan en el análisis al menos 20 unidades LLD por miligramo de sólidos contenidos en dichos caldos. Hemos comprobado que los sólidos solubles en agua de tales caldos de fermentación pueden tener una potencia de tanto como unas 140 unidades LLD por mgr. de sólidos en el caldo y que pueden obtenerse con facilidad concentrados que contienen 2.000 unidades LLD por mgr., o más. En contraste con esto, las fuentes más ricas de "APF" anteriormente disponibles, tales como los solubles de pescado y la harina de pescado, se ha comprobado que sólo contienen como 1-3 unidades LLD por mgr.

Debe notarse que una ración base deficiente en "APF" para avicultura se hace dietéticamente adecuada con respecto



188996

MALA REPRODUCCION

POR DIFERENCIA DEL ORIGINAL

al "APF" añadiendo a dicha ración 0.000003 % de vitamina

B₁₂, y que esta cantidad de vitamina B₁₂ produce una respuesta al crecimiento en los pollos equivalente a la producida por aproximadamente 1 a 5 % de solubles de pescado,

5 harinas de pescado, y similares. Esta relación de vitamina B₁₂ corresponde a un nivel de aproximadamente 330.000 unidades LLD por Kg. de alimento. Un concentrado de potencia de 2.000 unidades LLD por mgr., tal como el antes mencionado, suministra un nivel de 330.000 unidades LLD por Kg. de alimento cuando se añade en la proporción de 165 mgrs. de concentrado por Kg. de alimento (es decir, 0.0165 %).

10 Se sabe que se han empleado diversos solubles de fermentación como suplementos alimenticios primordialmente a causa de su contenido en riboflavina y otras vitaminas de estructura conocida, tales como biotina, ácido pantoténico, etc.

15 Hemos comprobado que estos materiales de la técnica anterior sólo contienen pequeñas cantidades de sustancias activas en LLD; por ejemplo, los solubles de fermentación butílica contienen solamente como 4 unidades LLD por mgr. y los solubles de destilación de granos contienen menos de 1 unidad LLD por mgr. Estos solubles de fermentación no contienen suficiente material activo en LLD para hacer practicable la recuperación desde los mismos de concentrados aptos para el enriquecimiento de alimentos deficientes en el "factor

20 proteínico animal".

25

A fin de hacer factible la recuperación de tales concentrados es esencial que el caldo de fermentación dé en el análisis al menos 20 unidades LLD por mgr. de sólidos conteni



188996

949

dos en él. Los micro-organismos que consideramos adecuados para producir caldos de esta potencia son los hongos bosquejados en la página 2 del libro "An Introduction to Industrial Mycology, de Smith y Raistrick (Londres, Edward Arnold and Co. 1938), esto es, Myxomicetos, Schizomicetos y Eumicetos. Especialmente adecuados son los Schizomicetos, particularmente ciertas razas de la especie Streptomyces griseus que pueden usarse también para la producción de los antibióticos streptomina y griseina. Otras especies de Streptomyces, tales como Streptomyces albideflavus, Streptomyces colombiensis nov.sp., Streptomyces roseochromogenus y Streptomyces antibioticus, incluyen cepas que producen grandes rendimientos de sustancias activas en LLD. Otros Schizomicetos adecuados son miembros del género Clostridium, y hemos comprobado que razas seleccionadas de Clostridium tetanomorphum, Clostridium cochlearium, Clostridium flabelliferum, y Clostridium butyricum son especialmente útiles para realizar nuestro procedimiento. Otros micro-organismos que entre los Fungi hemos descubierto son adecuados para la producción comercial de caldos de fermentación que dan en el análisis al menos 20 unidades LLD por miligramo de sólidos contenidos en dichos caldos son los Torula, Kremothecium ashbyi y Escherichia coli.

Deseamos recalcar que, para cualquier especie dada de hongo, es preciso seleccionar razas que produzcan caldos con la deseada actividad en LLD. Nuestro invento no se limita a ningún hongo particular, ni incluye toda raza de cualquier hongo dado. Por el contrario, todo micro-organismo que ensayado, que produzca un caldo de fermentación que dé en el análisis



- 9 49

188996

al menos 20 unidades LLD por mgr. de sólidos de caldo, ha resultado ser satisfactorio para producir concentrados aptos para el enriquecimiento de alimentos para animales deficientes en el "factor proteínico animal".

5 Todavía otra ventaja del presente descubrimiento reside en el hecho de que los productos vitamínicos valiosos aquí descritos pueden prepararse a partir de líquidos residuales de fermentación que resultan de la producción de los antibióticos estreptomycinina y griseína. Los procesos de fermentación de estreptomycinina y griseína implican la fermentación de masas de bajas concentraciones con el resultado de que debe disponerse de volúmenes en extremo grandes de caldo de fermentación para una cantidad relativamente pequeña de producción de estreptomycinina o griseína. El residuo de una gran instalación de fermentación de estreptomycinina puede constituir así muchos miles de litros de líquidos de fermentación residuales por día.

10

15

Anteriormente no se sabía que ningún producto útil estuviera presente en estos líquidos residuales. De hecho, la cantidad total de vitaminas de estructura conocida realmente contenida en tales líquidos es demasiado pequeña para hacer económica la concentración de los líquidos para la recuperación de dichas vitaminas. Estos líquidos de fermentación de estreptomycinina, por consiguiente, han constituido hasta ahora un problema serio y costoso en cuanto a la disposición de los residuos.

20

25

Ahora hemos hecho el sorprendente descubrimiento de que este líquido residual de la estreptomycinina, después de



188996

5 separar del mismo el antibiótico estreptomicina por medio de resinas de permutación iónica, da en el análisis esencialmente más de 20 unidades LLD por mgr. de sólidos contenidos en él. Hemos demostrado que de este líquido pueden recuperarse con-
centrados de gran actividad LLD, y que estos concentrados pue-
den usarse para el enriquecimiento de alimentos animales defi-
cientes en el "factor proteínico animal". Si se desea, el
líquido puede tratarse para producir vitamina para B₁₂.
Análogamente, líquidos griseínicos residuales, después de tra-
tarlos para recuperar el antibiótico griseína pueden tratarse
para recuperar concentrados ricos en LLD o vitamina B₁₂ pura.

10 Al llevar a cabo el presente invento, podemos emplear cualquiera de los medios nutricios acuosos ordinariamente uti-
lizados en la propagación de hongos. Los medios nutricios
15 usuales incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitró-
geno, sales inorgánicas y factores de crecimiento siempre que
se requieran. El carbono puede ser proporcionado por un car-
bohidrato tal como dextrosa, maltosa, xilosa, azúcar invertida,
jarabe de maíz y similares. El nitrógeno puede ser propor-
20 cionado por una sal amónica, aminoácidos, o proteínas, tales
como habas de soja, cáscara de avena, levadura, extractos de
levadura, digestión triptica de caseína, extracto de carne,
sangre en polvo, rascaduras proteínicas de carne y huesos, ha-
rina de salmón, harina de pescado, solubles de pescado, solu-
25 bles de destilería, y similares. Si se desea, los hongos pue-
den ser propagados usando proteínas (o aminoácidos) sin que
esté presente ningún hidrato de carbono en el medio, en cuyo
caso las proteínas (o aminoácidos) sirven como fuente del



349

188996

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

carbono y del nitrógeno requeridos por los micro-organismos.

La propagación es ordinariamente realizada en un medio acuoso pero también puede usarse en lugar de dicho medio acuoso un medio a base de salvado de cereales.

5 Cuando se usa un medio nutritivo acuoso, es esterilizado y luego inoculado con un cultivo de la cepa seleccionada de hongo y la mezcla es incubada hasta que el caldo de fermentación dé en el análisis al menos 20 unidades LLD por mgr. de sólidos del caldo, o más. La incubación se realiza usualmente en condiciones sumergidas y a una temperatura apropiada para el hongo específico empleado. La potencia (es decir, la actividad LLD) del caldo fermentado así obtenido es analizada utilizando la respuesta al crecimiento del micro-organismo Lactobacillus lactis Dornier, como se ha mencionado anteriormente en esta Memoria.

10

15

A la conclusión del período de fermentación, el caldo fermentado puede ser separado y los sólidos de fermentación, así obtenidos usarse, sin ningún tratamiento, para enriquecer alimentos animales deficientes en "APP". Ordinariamente se prefiere filtrar el caldo de fermentación y tratar el caldo filtrado con un adsorbente tal como tierra de batán o carbón activado, adsorbiendo de este modo las sustancias activas en LLD. Este adsorbato se seca y puede luego usarse como suplemento alimenticio.

20

25 Si se desea un suplemento alimenticio libre de adsorbente, el adsorbato se eluye con disolventes adecuados tales como soluciones acuosas o alcohólico-acuosas de piridina o α -picolina, y el eluato resultante se evapora a seque.



188996

dad. Este proceso efectúa una purificación parcial de los constituyentes LLD-activos y el producto sólido así obtenido es una fuente concentrada de factores de crecimiento aptos para el enriquecimiento de alimentos deficientes en "APP" para animales.

5

Si se desea una purificación ulterior, el concentrado sólido se extrae con un alcohol alifático inferior, tal como alcohol metílico, y el extracto alcohólico se hace pasar a través de una columna rellena de alúmina activada con lo cual las sustancias LLD-activas son adsorbidas por la alúmina. La columna se eluye luego con disolvente de metanol nuevo y las fracciones del eluato que muestran actividad LLD (según se determina por análisis microbiológico, se combinan y los eluatos combinados se concentran. La solución alcohólica concentrada se mezcla luego con un líquido miscible con dicha solución y en el cual sea insoluble la sustancia activa, tal como acetona. El precipitado que se forma se recristaliza desde una mezcla de acetona y agua para producir vitamina B₁₂ cristalizada.

10

15

20

Los ejemplos siguientes ilustran métodos de realizar el presente invento, pero ha de entenderse que estos ejemplos se dan a modo de ilustración y no de limitación.

Ejemplo 1

Un fermentador de 15.000 litros se carga con 43 Kgs. de extracto de buy concentrado (70 % de sólidos aproximadamente), 143 Kgs. de una digestión triptica de caseína, 72 Kgs. de cloruro sódico, 720 grs. de sulfato ferrosos heptahidrato, 144 grs. de nitrato cobaltoso hexahidrato, 20 litros de

25



188996

aceite de soja, y unos 13000 litros de agua. La solución se esteriliza durante 30 minutos a 120°C. se enfría a unos 28°C. y se inocula con 1130 litros de un cultivo vegetativo de una cepa productora de griseína de Streptomyces griseus designada como 25G. El medio inoculado se incuba a una temperatura de unos 28°C. durante un período de unas 48 horas, y se airea continuamente con aproximadamente 135 m³. de aire por hora. Al final del período de fermentación, todo el caldo de cultivo se acidifica a pH 3 con ácido fosfórico y se filtra. La torta de filtro se lava con agua, y el filtrado, con las lavaduras, se hace ligeramente alcalino con hidróxido sódico, y se filtra de nuevo. El caldo de fermentación resultante que contiene 1.7 % de sólidos, tiene un pH de 7.8 y un análisis LLD de 2400 unidades LLD por ml.

15 A. Filtrado seco de Caldo de fermentación de S. griseus.

380 litros de caldo de fermentación preparado como se ha descrito en lo que antecede se evaporaron a presión reducida y a una temperatura inferior a 40°C. a unos 23 litros. El concentrado, que tenía una actividad micro-biológica de unas 40.000 unidades LLD por ml., se secó luego por pulverización. El material seco contenía como 3 % de humedad, y poseía una actividad micro-biológica de unas 140 unidades LLD por mgr.

25 B. Adsorbato en carbón de Caldo de fermentación de S. griseus.

13.000 litros del mismo caldo de fermentación empleado en "A" anteriormente se agitaron con unos 72 Kgs. de carbón activado durante 30 minutos. El adsorbato se recuperó por



filtración y se lavó por suspensión en 380 litros de agua y nueva filtración.

195 grs. del adsorbato húmedo en carbón se secaron en una estufa de vacío a 45°C. durante aproximadamente 20 horas, dando 99 grs. de adsorbato seco. La actividad LLD del adsorbato seco era de 470 unidades LLD por mgr., calculada a partir de la actividad originariamente presente en el caldo de fermentación y la actividad residual del caldo agotado procedente de la adsorción en carbón.

10 C. Concentrado recuperado del eluato del adsorbato en carbón.

El resto del adsorbato en carbón lavado descrito en "B" (de la misma tanda de fermentación), representando como 72 Kgs. de carbón activado, se eluyó por agitación durante 30 minutos con 630 litros de piridina 25 %. La torta agotada se lavó dos veces sobre el filtro-prensa: primero devolviendo al ciclo 150 litros de piridina 25 % durante 20 minutos, y luego devolviendo al ciclo 106 litros de piridina 25% durante 20 minutos. Dos tercios del eluato y del lavado combinados se evaporaron a presión reducida (temperatura de vapor inferior a 35°C.) hasta 24 litros. 150 ml. del eluato concentrado, con una actividad de aproximadamente 250.000 unidades LLD/ml. se secaron desde el estado congelado, para producir 14.1 gr. de producto con una potencia de 2800 unidades LLD/mgr.

25 D. Vitamina B₁₂ cristalizada.

Un concentrado sólido preparado según el procedimiento descrito en "B" y "C" anteriormente, partiendo de 13000 litros de caldo fermentado, se extractó con alcohol metílico y



188996

el extracto alcohólico se hizo pasar luego a través de una columna que contenía alúmina activada, adsorbiendo así la vitamina B₁₂. La columna se eluyó con alcohol metílico nuevo y las fracciones del eluato que mostraron la actividad LLD más pronunciada se concentraron juntas. La solución alcohólica concentrada se mezcló luego con acetona con lo cual precipitó vitamina B₁₂ bruta y se recuperó por filtración. Este material se purificó por nueva precipitación desde solución en etanol por adición de acetona y el producto se purificó todavía por cristalización desde acetona acuosa para producir 106 mgr. de vitamina B₁₂ cristalizada.

El valor de los citados concentrados y de la vitamina B₁₂ para sustituir a los suplementos alimenticios que contienen "factor proteínico animal" quedó demostrado por los ensayos de alimentación de pollos, que luego se describen, en los cuales el crecimiento de pollos mantenidos sobre una dieta deficiente en "APF" fué comparado con el crecimiento de pollos sobre la misma dieta suplementada por dichos concentrados y por vitamina B₁₂.

Ensayos de alimentación de pollos.

Los pollos empleados en estos ensayos se incubaron a partir de huevos puestos por gallinas mantenidas con una dieta deficiente en "APF".

Pollos de un día se pusieron bajo la siguiente dieta base:



188996

	Harina de habas de soja	70 %
	Dextrosa comercial	7.9
	Celulosa	5.0
	Aceite de germen de trigo	4.5
5	Gluconato de calcio	2.5
	Glicina	8.0
	DL-metionina	0.9
	CaCO ₃	1.5
	K ₂ HPO ₄	1.612
10	KH ₂ PO ₄	1.0
	NaCl	0.838
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.51
	CaHPO ₄ .2H ₂ O	0.375
	Citrato ferrico	0.138
15	MnSO ₄ .4H ₂ O	0.025
	KI	0.004
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0015 %
	ZnCl ₂	0.00125
	L-arginina	0.50
20	L-cisteina	0.20
	Colina	0.20
	Inositol	0.10
	Acido p-aminobenzoico	0.03
	Niacina	0.01
25	Pantotenato de Ca	0.004
	Riboflavina	0.002
	Tiamina	0.002
	Piridoxina	0.002



Acido pteroilglutámico.	0.0004
Menadiona	0.0004
Biotina	0.00004
Polvo A y D	0.10

5 Después de cinco días bajo la citada dieta base, se seleccionaron grupos de 7 pollos cada uno, equilibrados en cuanto se refiere al peso corporal, y recibieron las siguientes dietas ^{base}/suplementadas como se indica en la tabla siguiente:

Dieta No	Suplemento	Cantidad de % de suplemento de la dieta total	Unidades LLD aña- didas en suplemen- to por Kg. de dieta	No de pollos
C-1068	ninguno	-	0	7
C-1093	Vit. B ₁₂ crist.	0.000003 %	330.000	7
C-1094	Caldo seco de <u>S. griseus</u> (concentrado A citado)	0.3 %	420.000	7
C-1095	Adsorbato seco de <u>S. griseus</u> en carbón (B de arriba)	0.1 %	470.000	7
C-1096	Adsorbato en carbón de Eluato acuoso en piridina liofilizada de <u>S. griseus</u> (C de arriba)	0.02 %	560.000	7

La proporción de crecimiento de estos pollos se re-



188996

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

sume en la tabla siguiente:

Edad de los pollos en días	5	8	10	12	15	17	Incremento sobre la ganancia en C-1068 - 17 días de edad
Dieta C-1068	49.9	57.3	59.7	67.6	66.2	66.5	-
5 C-1093	49.9	58.7	67.0	79.3	107.3	125.8	59.3
C-1094	49.9	58.9	65.9	77.7	92.4	117.8	51.3
C-1095	49.9	60.4	67.3	82.5	108.7	126.7	60.2
C-1096	49.9	58.6	67.9	83.1	102.6	122.6	56.1

10 Estos ensayos establecen claramente que el crecimiento de los pollos de prueba es marcadamente incrementado, en comparación con pollos alimentados sobre una dieta base deficiente en "APF", al dar a dichos pollos de prueba dicha dieta base enriquecida con cualquiera de los concentrados mencionados, o vitamina B₁₂.

15 Ejemplo 2.

Un fermentador de 15000 litros se cargó con 43 Kgs. de concentrado de extracto de buey, 142 Kgs. de una digestión triptica de caseína, 73 Kgs. de cloruro de sodio, 20 litros de agente anti-espumante, y 13000 litros de agua. El medio se esterilizó, se inoculó, fermentó, acidificó, filtró y neutralizó como se ha descrito en el ejemplo 1.

25 El caldo neutro filtrado de fermentación (aproximadamente 15000 litros) se agitó con 45 Kgs. de carbón activo durante 30 minutos para adsorber los constituyentes ILD-activos. El adsorbato se retiró por filtración y se lavó poniéndolo en suspensión en unos 380 litros de agua y filtrando de nuevo.



188996

- 9 JUL 1954

El adsorbato lavado se eluyó por agitación durante 20 minutos con 360 litros de α -picolina 25 %, y el eluato se recuperó por filtración. La torta de filtro se lavó sobre el filtro-prensa devolviendo al ciclo 114 litros de α -picolina 25 % durante 30 minutos. El eluato y el lavado combinados se evaporaron a presión reducida (temperatura de vapor inferior a 35°C) hasta un volumen de 23 litros, y se diluyó con 230 litros de metanol. El material inerte que precipitó se separó, y los constituyentes IID-activos brutos se precipitaron añadiendo la solución en metanol a 680 litros de éter. El precipitado se recuperó por filtración, se lavó con éter, y se secó en una estufa de vacío a una temperatura inferior a 30°C para producir 860 grs. de producto seco; potencia micro-biológica, 1500 unidades IID/mgr.

El valor de este material como fuente de "APP" en comparación con extractos bruto de hígado y con vitamina B₁₂ cristalizada se determinó biológicamente usando ensayos de alimentación de pollos según se describe en lo que sigue:

Ensayos de alimentación de pollos.

Los pollos empleados se incubaron a partir de huevos puestos por gallinas mantenidas a una dieta deficiente en el "factor proteínico animal".

Pollos de un día se colocaron bajo una dieta ^{base/}que era idéntica a la del ejemplo 1, salvo en que su contenido de harina de habas de soja era de 40 % y su contenido de dextrosa comercial era de 27.9 %.

Después de cinco días a la citada dieta base, se seleccionaron grupos de 7 pollos equilibrados en cuanto a su peso.



188996

y recibieron las citadas dietas base suplementadas como se indica en la tabla siguiente:

Dieta N°	Suplemento	Cantidad % de suplemento de la dieta total	N° de pollos
C-1014A	ninguno	-	7
C-1014B	ninguno	-	7
C-1055	extracto bruto de hígado	1 %	7
C-1059	concentrado de fermentación de <u>S. griseus</u> preparado como se ha dicho	0.0227 %	7
C-1057	Vitamina B ₁₂ crist.	0.000003 %	7

La proporción de crecimiento de los pollos a estas dietas se resume en lo que sigue:

peso medio corporal en gramos

Edad de los pollos en días	5	8	10	12	15	18	incremento sobre la ganancia en C-1014 - 18 días de edad.	
Dieta C-1014	50.4	60.1	66.0	77.9	93.9	113.0) - (114.8 de promedio)	
C-1014	50.4	59.7	66.9	78.4	97.1	116.7		
C-1055	50.4	60.2	68.3	83.5	105.7	133.2		18.4
C-1059	50.4	62.4	71.6	84.7	109.1	135.6		20.8
C-1057	50.4	61.3	68.7	83.4	107.7	132.6		17.8

Estos ensayos muestran que el crecimiento de los pollos de prueba es incrementado notablemente en comparación con los pollos alimentados con una dieta base deficiente en APT. alimentado a dichos pollos con dicha dieta base enriquecida con un concentrado de fermentación de S. griseus o con vitamina



188996

B₁₂. Los ensayos muestran también que el crecimiento incrementado es aproximadamente el mismo que el producido alimentando a los pollos de ensayo con la dieta base enriquecida con 1 % de extracto bruto de hígado, que es una de las mejores de las fuentes anteriores del "factor proteínico animal".

Ejemplo 3

Se preparó un medio nutritivo que contenía lo siguiente :

- 10 Harina de habas de soja . . . 3 %
- Dextrosa 2 %
- Solubles de destilería . . . 0.75 %
- NaCl 0.25 %
- Co⁺⁺ 1 p.p.m.
- 15 Agua del grifo, hasta 100 %

15 Este medio se preparó, esterilizó e incubó con 10 % en volumen de un cultivo vegetativo de una cepa productora de estreptomicina de Streptomyces griseus. Después de inoculación, el caldo inoculado se agitó a 27°C durante dos días en condiciones sumergidas aireadas. El caldo fermentado se

20 acidificó con ácido fosfórico a pH 3 y se filtró a través de sílice de diatomáceas ("Supercel"). El análisis de caldo de fermentación filtrado mostró una actividad en estreptomicina de 810 γ /ml. y una actividad LLD de 2700 unidades LLD/ml. (45 unidades LLD por mgr. de sólidos del caldo).

25 250 litros de este caldo de fermentación filtrado se hicieron pasar a través de una columna que contenía 600 grs. de una resina permutadora de iones del tipo de ácido carboxílico



188996

(IRC-50 suministrada por la Resinous Products and Chemical Co.), adsorbiendo de este modo la estreptomina sobre la resina. Los caldos efluentes de los cuales fué separada así la estreptomina se combinaron.

5 A. Adsorbato en carbón.

75 litros de este caldo efluente se trataron con 1600 grs. de carbón activo, con lo cual el carbón adsorbió el 75 % de las sustancias LLD-activas originariamente presentes en el caldo. El adsorbato sobre carbón se lavó y se
10 secó. El producto seco contenía aproximadamente 80.000 unidades LLD/gramo y puede usarse en la misma forma que el adsorbato en carbón descrito en el ejemplo 1 para el enriquecimiento de alimentos para animales, deficientes en "APP".

B. Adsorbato sobre tierra de batán.

15 40 litros de caldo efluente preparado en esencia como se ha descrito antes (pero dando en el análisis 500 unidades LLD/ml.) se ajustaron a pH 2.5 con ácido fosfórico, y el caldo resultante se trató con 600 grs. de tierra de batán ("O.K. Brand"). El adsorbato sobre tierra de batán, que
20 contenía 90 % de la actividad LLD originariamente presente en el caldo, se lavó y secó para producir un producto seco final que contenía 30.000 unidades LLD/gramo. Este producto puede usarse en la misma forma que los adsorbatos en carbón antes descritos y en el ejemplo 1 para el enriquecimiento de
25 alimentos deficientes en "APP" para animales.



188996

C. Concentrado seco por pulverización.

Una parte de 80 litros del mismo caldo efluyente usado como material de partida en la parte "A" del presente ejemplo, se evaporó hasta un volumen de 12 litros. Una porción de esta solución concentrada (5740 ml.) se secó por pulverización para producir 335 grs. de producto seco con una potencia microbiológica de 140 unidades LLD/mgr. Este producto puede usarse en la misma forma que el caldo seco de S.gri-
seus descrito en el ejemplo 1 para el enriquecimiento de alimentos deficientes en "APF" para animales.

Ejemplo 4.

Se prepara un medio consistente en 1 % de digestión triptica de caseína, 0.3 % de concentrado de extracto de buey y 10 p.p.m. (partes por millón) de nitrato cobaltoso hexahidrato. El pH se ajusta a 7 aproximadamente. Siete porciones de 500 ml. de este medio se colocan cada una en matraces Erlenmeyer de 2 litros y se esterilizan durante 30 minutos a 115°C. Cada matraz es luego inoculado con unos 10 ml. de un cultivo vegetativo de Streptomyces roseochromogenus y se incuba durante 7 días sobre una máquina agitadora rotativa. El contenido de los matraces se mezcla luego y se filtra.

Un litro de caldo filtrado (aproximadamente 1500 unidades LLD/ml.) se evapora a presión reducida (temperatura inferior a 35°C.) y se seca desde el estado congelado, para producir 6.9 grs. de producto con una actividad de unas 130 unidades LLD/mgr.

Otra porción de caldo filtrado, que asciende a 2300



188996

- 9 JUL -

5 ml., es agitada a pH 7 durante 30 minutos con 23 grs. de carbón activado. El adsorbato así obtenido se eluye dos veces por agitación durante 30 minutos con una mezcla de 125 ml. de etanol, 12.5 ml. de piridina, y 112.5 ml. de agua. Los eluatos combinados se evaporan a presión reducida (temperatura inferior a 35°C) y se secan desde el estado congelado para producir 2.3 grs. de producto que dió en el análisis 440 unidades LID por mgr.

10 Este residuo seco de fermentación y el eluato sobre carbono preparado antes pueden usarse en la misma forma que los productos descritos en el ejemplo 1 para el enriquecimiento de alimentos ^{deficientes} en "APP".

Ejemplo 5

15 se prepara un cultivo de Streptomyces albidoflavus y se incuba exactamente como se ha descrito en el ejemplo 4 para el Streptomyces roseochromogenus.

20 El caldo de fermentación se acidifica a pH 3 con ácido fosfórico, se filtra, y el caldo filtrado se neutraliza pH 7 aproximadamente con hidróxido sódico. 1570 ml. de caldo neutro filtrado (análisis; 1000 unidades/ml.; 77 unidades LID/mgr. de sólidos del caldo) se agita durante 30 minutos con 15.7 grs. de carbón activado. El adsorbato así obtenido se recupera por filtración. El adsorbato húmedo se seca a 45°C. en una estufa de vacío durante 20 horas para producir 50.7 grs. (con inclusión de la ayuda de filtración) 25 de adsorbato seco, cuya potencia es aproximadamente de 30 unidades/mgr., calculada por la potencia del caldo neutro filtrado original y del caldo agotado del tratamiento con carbón.



188996

Este adsorbato sobre carbón puede usarse en la misma forma que los productos descritos en el ejemplo 1 para el enriquecimiento de alimentos deficientes en "APF".

Ejemplo 6

5 Se preparó un medio de fermentación conteniendo lo siguiente:

- Levadura de Pfeiffer seca 2 %
- Nitrato de cobalto 10 p.p.m. como Co⁺⁺
- Agua destilada, para hacer 100 %

10 40 ml. del medio citado en un matraz de 250 ml. se esterilizaron e inocularon con 5 % en volumen de un cultivo vegetativo de 48 horas de una cepa productora de griseína de Streptomyces griseus designada como 25G. Después de inoculación, el caldo inoculado se incubó a 28°C durante 72 horas, durante cuyo tiempo el matraz se agitó continuamente sobre una máquina agitadora rotativa.

15 Después de terminado el período de fermentación, el análisis LID del caldo fermentado era de 4800 unidades por ml. (unas 220 unidades LID por mgr. de sólidos del caldo).

20 Este caldo se usa para producir concentrado sólido con actividad "APF", así se desea, vitamina B₁₂ para de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

Ejemplo 7

25 Se prepararon ocho medios de fermentación, idénticos con respecto a sales inorgánicas, pero que contenían diferentes material suplementarios nitrogenados. La compo-



188996

ción de estos medios fué como sigue :

	Suplemento del medio (como se indica en la tabla sigte)	
	NaCl	0.5 %
	Aceite de habas de soja	1 %
5	FeSO ₄ .7H ₂ O	50 p.p.m.
	Co (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	10 p. p. m.

40 ml. de cada uno de los medios en un matraz de 250 ml. se esterilizaron e inocularon con 2 1/2 % en volumen de un cultivo vegetativo de una cepa productora de griseína de *Streptomyces griseus*. Después de inoculación, los caldos inoculados se incubaron a 28°C durante 4 días durante cuyo tiempo los matraces se sacudieron continuamente sobre una máquina sacudidora rotativa.

Después de terminar el período de fermentación, los caldos fermentados se analizaron y los resultados obtenidos, dependiendo del suplemento del medio añadido, se resumieron en la tabla siguiente :

Suplemento del medio	Unidades LLD por ml. de caldo fermentado.	Unidades LLD por mgr. de sólidos del caldo.
3% de levadura seca Standard Brands Y.1	4300	120
4% digestión de proteína. . .	3500	78
3% cáscara de avena	1400	40
8% sangre en polvo Armour . .	1700	20
4% harina de pescado SMA . .	2500	56
6% harina residual de salmon. .	1900	29
2% rascaduras proteínicas de carne y huesos.	590	24
1 % extracto de buey Anglo	900	60



9 JUL 1949

188996

Estos caldos pueden usarse para producir concentra-
dos sólidos con actividad "APP", o, si se desea Vitamina B₁₂
pura de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

Ejemplo 8

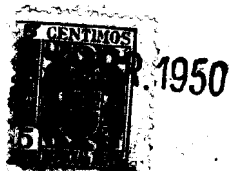
5 Se preparó un medio conteniendo lo siguiente:

- Infusión Difco de corazón y cerebro . . . 3.7 %
- Agar Difco 0.37 %
- Cobalto (como nitrato de cobalto) . . . 2 p.p.m.
- Agua destilada, hasta 100 %

10 Este medio se preparó y subdividió en cinco matra-
ces Erlenmeyer de 125 ml., conteniendo 100 ml. por matraz.
Los matraces y sus contenidos se esterilizaron y cada uno de
los matraces se inoculó con una especie diferente de Clostridium
como se indica en la tabla siguiente.

15 Después de inoculación, los caldos inoculados se in-
cubaron anaeróbicamente, sin agitación durante un período de
varios días a una temperatura de 35°C. Después de terminado
este período de fermentación, las actividades de los caldos
determinadas por ensayo con Lactobacillus lactis Dorner, eran
20 como sigue:

Cultivo	Unidades LLD/ml. de caldo	Unidades LLD/mgr. de sólidos del caldo.
<u>Clostridium tetanomorphum</u>	5000	125
<u>Clostridium cochlearium</u>	5000	125
25 <u>Clostridium flabelliferum</u>	2000	50
<u>Clostridium butyricum</u>	4000	100



- o - N O T A - o -

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

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

5 1º.- Un procedimiento para la producción de sustancias vitamínicas, que comprende propagar un microorganismo seleccionado de aquellas cepas de hongos que, cuando son cultivados en un medio nutritivo, producen productos de fermentación que dan en el ensayo al menos 20 unidades

10 LLD por miligramo de sólido contenido en dichos productos, realizándose dicha propagación en un medio líquido nutritivo durante un periodo de tiempo suficiente para producir un caldo de fermentación que ~~da~~ en el ensayo al menos 20 unidades LLD por miligramo de sólidos contenidos en el caldo, y recuperar del caldo materiales solubles con actividad LLD sin descomposición sustancial de su contenido vitamínico.

15

2º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1, en el cual la propagación se realiza en un medio nutritivo acuoso.

20

3º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 2, en el cual el medio nutritivo acuoso usado con-



1950

188996

REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

tiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable, y sales inorgánicas.

5 4º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual la propagación se realiza en condiciones sumergidas.

5º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 4º, en el cual la propagación se realiza en condiciones aireadas.

10 6º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual el micro-organismo es una cepa seleccionada del género Clostridium.

7º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 6, en el cual el micro-organismo es una cepa seleccionada de la especie Clostridium tatanamorphum.

15 8º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1 a 5, en el cual el micro-organismo es una cepa seleccionada del género Streptomyces.

20 9º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 8, en el cual el micro-organismo es una cepa seleccionada de la especie Streptomyces griseus.

10º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 9, en el cual el micro-organismo es una cepa seleccionada, productora de griseína, de Streptomyces griseus.

25 11º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 9, en el cual el micro-organismo es una cepa seleccionada, productora de estreptomina, de Streptomyces griseus.



12º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual el material LLD activo se recupera del caldo de fermentación tratando el caldo con carbón adsorbente y secando el adsorbato a temperaturas inferiores a las destructivas de la vitamina B₁₂.

13º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 11 y 12, en el cual el caldo de fermentación obtenido por la propagación de una cepa seleccionada, productora de estreptomocina, de Streptomyces griseus, se trata primero con una resina de permutación iónica para determinar la adsorción de la estreptomocina presente en el caldo sobre dicha resina, la resina de permutación iónica y la estreptomocina adsorbida sobre ella se separan del caldo, y el caldo residual se somete luego a tratamiento con carbón adsorbente.

14º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 12 o 13, en el cual el material LLD activo se eluye del adsorbato en carbón con un disolvente, y la solución LLD activa resultante se concentra.

15º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual el material LLD activo recuperado del caldo de fermentación se somete a un fraccionamiento cromatográfico y se recupera vitamina B₁₂.

16º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 10, 12, 14 y 15, en el cual la solución concentrada LLD activa eluida del adsorbato en carbón de un cal-

do de fermentación resultante de la propagación de una cepa seleccionada, productora de griseína, de Streptomyces griseus, se extrae con alcohol metílico, el extracto alcohólico se pasa a través de una columna que contiene alúmina activada, la columna se aluye con alcohol metílico, las fracciones del eluato que muestran actividad LLD más pronunciada se concentran, se añaden acetona a la solución alcohólica concentrada, y la vitamina B₁₂ bruta que precipita se recupera.

10 17º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 16, en el cual la vitamina B₁₂ bruta obtenida se precipita desde una solución de la misma en etanol por adición de acetona y el producto purificado resultante se recristaliza desde acetona acuosa para producir vitamina B₁₂ cristalizada.

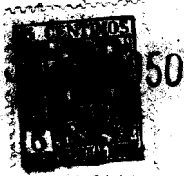
15 18º.- Un procedimiento de preparar composiciones alimenticias para animales, dietéticamente adecuadas con respecto al "factor proteínico animal" que comprende añadir a un material nutricional deficiente en "factor proteínico animal" como fuente de dicho factor, una sustancia vitamínica producida por un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores.

20 19º.- Un procedimiento para la producción de sustancias vitamínicas por fermentación.

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

Esta Memoria con-

188996



ta de treinta hojas escritas por una sola cara.

Madrid e

P.A. - 3 ABR. 1950

Alberto de Elzabur

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

Ch/-

- 30 -