

191178

191178

16 SEP. 1950

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud  
d e

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

Nº 191.178 formulada el 11 de Enero de 1950

e n

E S P A Ñ A

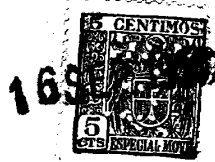
por VEINTE años

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

" MEJORAS INTRODUCIDAS EN LA PREPARACION DE  
SUSTANCIAS VITAMINICAS ".-

-----

Este invento se refiere en general a la producción por fermentación de sustancias de valor terapéutico y nutritivo, y en particular a un método perfeccionado para la producción microbiológica de sustancias vitamínicas que tienen



169  
191178

propiedades promovedoras del crecimiento del micro-organismo lactobacillus lactis Dorner.- También se refiere a un método perfeccionado para la producción micro-biológica de vitamina B 12.- La vitamina B 12 es una combinación cristalina, de color rojo, soluble en agua, derivable del hígado y valiosa en el tratamiento de ciertos tipos de anemia humana, por ejemplo, la anemia perniciosa.- Es además valiosa como factor duplitivo para animales.-

Las sustancias vitamínicas tales como la vitamina B 12 que se producen utilizando nuestro procedimiento perfeccionado, se ensayan convenientemente utilizando la respuesta al crecimiento del micro-organismo lactobacillus lactis Dorner en las condiciones de ensayos descritas por Shorb (J. Biol. Chem. 169, 455-6).- Las potencias de estas sustancias vitamínicas y de caldos fermentados y concentrados enriquecidos en ellas se expresan en términos de actividad LLD a base de un patrón de hígado arbitrario que tiene una potencia de 1.000 unidades LLD por milígramo.- Se ha determinado que la vitamina cristalina pura B 12 tiene una actividad LLD de unos 11.000.000 LLD de unidades por milígramo.-

Las sustancias vitamínicas que tienen actividad LLD se producen por fermentación de agentes nutritivos por razas seleccionadas de varias especies de la subtribu Fungi. La potencia de los caldos resultantes de la fermentación de agentes nutritivos ordinarios por dichos organismos, es sin embargo en extremo pequeña en comparación con las potencias de la vitamina pura B 12.- Estos productos varían en su



191178

5 contenido de sustancias de actividad LLD, según la especie  
de hongo empleada, pero ordinariamente contiene una activi-  
dad LLD equivalente a un contenido de vitamina B 12 del or-  
den 0.00003 mg/ml.- Es en extremo difícil separar vitamina  
pura B 12 o concentrados de alta actividad LLD de las gran-  
des cantidades de impurezas presentes en dichos medios.-  
Por tanto, ha sido de gran importancia encontrar una manera  
de aumentar la potencia LLD del caldo fermentado y aumentar  
al mismo tiempo la concentración de sustancias de actividad  
10 LLD con relación a los sólidos totales del caldo.-

Ahora se ha descubierto que estos sujetos pueden  
conseguirse propagando razas de hongos que producen sustan-  
cias dotadas de actividad LLD en agentes nutritivos acuosos  
a los que se ha añadido cobalto.- Se ha descubierto que,  
15 cuando estos hongos se cultivan en presencia del cobalto aña-  
dido, se producen por el micro-organismo cantidades muy aumen-  
tadas de sustancias de actividad LLD.- Esto da por resul-  
tado un caldo final de actividad LLD muy aumentada y también  
un gran aumento en la concentración de vitamina B 12 en rela-  
20 ción con el total de sólidos del caldo.- Este mayor rendi-  
miento microbiológico de material de actividad LLD no solo  
facilita el aislamiento de la vitamina pura B 12 del caldo  
fermentado, sino que también hace posible usar el contenido  
sólido del caldo como suplemento de alimentación para ani-  
25 males.-

Es en especial sorprendente que la adición del co-  
balto pueda estimular la mayor producción microbiológica de



165 191178

5 sustancias de actividad LLD, tales como la vitamina B 12 porque se sabe que el cobalto es en extremo tóxico para muchos micro-organismos.- Hemos descubierto que, a concentraciones mas altas, el cobalto es de hecho también tóxico para las razas de hongos que producen sustancias dotadas de actividad LLD.- Por ejemplo, una cantidad de cobalto, (en forma de nitrato de cobalto) superior a 10-20 partes por millón, a base del agente inhibe de hecho la producción de sustancias de actividad LLD por el hongo Streptomyces Griseus.-

10 La cantidad de cobalto presente durante la fermentación puede variar según el agente usado, pero ordinariamente preferimos emplear una cantidad de cobalto entre 0.1 y 20 partes aproximadamente por millón de partes del agente.- En algunos casos puede ser deseable usar cantidades mayores o  
15 menores de cobalto según la toxicidad de este para el hongo particular empleado.- En el caso del Streptomyces griseus, hemos preparado caldos de fermentación de alta actividad LLD y hemos conseguido excelentes rendimientos de vitamina cristalina B 12 cultivando el micro-organismo en agentes que  
20 tenían aproximadamente dos partes por millón de cobalto (como nitrato de cobalto).-

25 El cobalto puede añadirse en forma metálica, pero ordinariamente se añade en forma de una combinación del mismo, con preferencia una sal como el nitrato de cobalto; o bien en la forma de una sal natural de cobalto o complejo tal que pueda estar presente en agentes nutritivos microbianos ricos en cobalto.- En vista de lo inconveniente de ofrecer la can-



191178

tividad de cobalto deseada añadiendo estos materiales nutritivos naturales, preferimos añadir el cobalto en forma de una sal del mismo.-

Al realizar el presente invento, podemos emplear agentes nutritivos ordinariamente utilizados en la propagación de hongos.- La producción de actividad LLD por un hongo dado puede ciertamente variar según el agente nutritivo usado, pero se ha descubierto que, para cualquier tipo de agente deficiente en cobalto, la adición de pequeñas cantidades de esta da por resultado invariable un gran aumento en el rendimiento de sustancias de actividad LLD.-

Los agentes nutritivos usuales incluyen una fuente de carbono asimilable, otra de nitrógeno asimilable, sales inorgánicas y factores de crecimiento cuando se desea.- El carbono puede suministrarse por un hidrato de carbono tal como dextrosa, maltosa, xilosa, azúcar invertido, jarabe de maíz, etc.- El nitrógeno puede suministrarse por una sal amónica, amino-ácidos o proteínas, tales como habas de soya, avena, levadura de cerveza, extractos de levadura digesto triptico de caseína, extracto de carne, caína de sangre, carne de protenina y raspaduras de huesos, harina de salmón, harinas de pescado, solubles de pescado, solubles de destilería, etc.- Si se quiere, los hongos pueden propagarse usando proteínas (o amino-ácidos) sin que esté presente ningún hidrato de carbono en el agente, y en tal caso las proteínas (o amino-ácidos) sirven como fuente del carbono y el nitrógeno requeridos por el micro-organismo.-



191178

Los micro-organismos, cuyas razas seleccionadas consideramos adecuadas para nuestra fermentación, utilizando agentes nutritivos acuosos que contienen cobalto añadido, forman parte de los hongos, según se definen en las páginas 1 y 2 del libro "An Introduction to Industrial Mycology", de Smith y Raistrick (Londres, Edward Arnold and Co., tercera edición 1.946) esto es mixomicetos, esquizomicetos y eumicetos.- Son especialmente adecuados los esquizomicetos y en particular ciertas razas de la especie Streptomyces griseus que pueden usarse también para la producción de los antibióticos estreptomycinina y griseina.- Otras especies de Streptomyces, tales como Streptomyces albidoflabus, Streptomyces colombienses nov. sp. Streptomyces roseo chromogenus y Streptomyces antibioticus, incluyen razas que producen grandes rendimientos de sustancias de actividad LLD.- Otros esquizomicetos adecuados son especies del género Clostridium, y hemos descubierto que razas seleccionadas de las siguientes especies producen sustancias de actividad LLD en las condiciones de fermentación de nuestro procedimiento: Clostridium tetanomorphum, Clostridium cochlearium, Clostridium flabelliferum y Clostridium butydicum.- Otros micro-organismos entre los hongos que hemos descubierto que también producen actividad LLD son: Torula, Eremothecium ashbyii y Escherichia coli.- Deseamos recalcar, sin embargo, que para cualesquiera especies dadas de hongos, es preciso seleccionar razas que produzcan sustancias de actividad LLD.- Nuestro invento no se limita a ningún hongo en particular ni incluye cualquier raza de un



191178

5 hongo dado.- Por otra parte, cada micro-organismo tratado hasta ahora que produce sustancias de actividad LLD producirá estas sustancias en rendimiento muy aumentado cuando se propaga en un agente nutritivo acuoso que contenga una concentración de cobalto óptima.-

10 El agente se esteriliza y el agente esterilizado que contiene la deseada cantidad de cobalto se inocula con un cultivo del hongo seleccionado y la mezcla se incuba hasta que se obtiene la actividad óptima LLD.- La fermentación se realiza ordinariamente durante un periodo de unos dos a siete días aunque si se quiere puede emplearse tiempo mas corto o más largo.- Usualmente la incubación se lleva a cabo en condiciones sumergidas y a temperatura adecuada para el hongo específico empleado.-

15 La vitamina B 12 puede aislarse de la mezcla de fermentación en forma cristalina si se quiere filtrando el caldo de alimentación y tratando el caldo filtrado con carbón vegetal archivado adsorbiendo así la vitamina B 12.- El carbón activado se lava con una solución acuosa de piridina o  $\alpha$ -picolina y el lavado resultante se evapora a sequedad.- El concentrado sólido se extrae con un alcohol alifático bajo, tal como alcohol metílico, y el extracto alcohólico se hace pasar por una columna empaquetada con alúmina activada con lo cual ésta adsorbe la vitamina B 12.- Luego la columna se desarrolla con mas disolvente de alcohol alifático bajo y las fracciones del lavado que muestran actividad de vitamina B 12 (determinada por ensayo microbiológico) se combinan y los

20

25



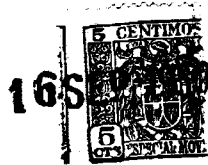
191178

lavados combinados se concentran.- Luego la solución alcohó-  
lica concentrada se mezcla con un líquido miscible con ella y  
en el cual sea incoluble la sustancia activa, como la acetona.  
El precipitado que forma se depura por reprecipitación de al-  
cohol añadiendo acetona y el producto se purifica más por cris-  
5 talización de agua, por la adición de acetona para producir  
vitamina B 12 cristalina.-

Los siguientes ejemplos ilustran los métodos de rea-  
lizar el presente invento pero debe entenderse que solo se dan  
10 por vía de ilustración y no de limitación.-

E J E M P L O I.-

Agentes que contenían 2% de levadura de cerveza seca  
suspendida en agua destilada y cantidades variables de cobal-  
15 to (como nitrato de cobalto) según se indica en el siguiente  
cuadro se prepararon y subdividieron en frascos de Erlenmeyer  
de 250 ml., que contenían 40 ml., por frasco.- Después de  
esterilizar los frascos y su contenido a 120º C., durante me-  
dia hora, los frascos se inocularon con un 2.5% aproxima-  
20 damente de volúmen de un cultivo vegetativo de cuarenta y ocho  
horas de Streptomyces griseus 25G (una raza productora de  
griseína) crecido en un digesto triptico de extracto de carne  
de agente de caseína.- Después de la inoculación, los caldos  
inoculados se mantuvieron a 28º C., durante cuatro días, tiem-  
25 po en el cual se agitaron continuamente en una máquina agita-  
dora giratoria.- Terminado este periodo de fermentación,  
las actividades de los caldos, determinadas por ensayo con



191178

Lactobacillus lactis Dorner, fueron las siguientes:

	<u>Cobalto</u> <u>ppm.</u>	<u>Unidades LLD</u> <u>por ml. de caldo fermentado</u>
	0	300
5	1	2760
	2	3000
	10	4600
	20	3000

E J E M P L O II.-

10

Se preparó un agente que contenía:

	Carne de proteína y raspadura de huesos	8 %
	Cloruro sódico	0.5 %
	FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1550 ppm
15	Agua destilada hasta un total de	100 %

Este agente se preparó, esterilizó, inoculó e incubó como se describe en el ejemplo I.- Una segunda porción del mismo agente a que se añadieron 2 ppm de cobalto (como nitrato de cobalto) se esterilizó, inoculó e incubó de igual modo.-

20

Al fin del periodo de fermentación el ensayo de los caldos fué el siguiente

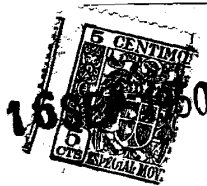
<u>Sin cobalto</u>	<u>Cobalto 2 ppm</u>
160 unidades LLD/ml.	590 unidades LLD/ml.

E J E M P L O III.-

25

Se prepararon agentes de fermentación que contenían:

Digesto triptico de casina	1%
----------------------------	----



191178

Extracto de carne	0.3 %
Cloruro sódico	0.5 %
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50 ppm.
Aceite de habas de soya	0.15% (como anti-espumante)
Agua corriente a razón total de	100 %

5  
El agente anterior se prepara en un fermentador de 3.000 galones y se esteriliza.- El agente se inocula con 275 galones de inoculación vegetativa de una raza de Streptomyces griseus productora de griseína designada con 25G y la mezcla se incuba a 28º C., durante 48 horas en condiciones de  
10 agitación, sumersión y aireación.-

El caldo fermentado se ensaya usando Lactobacillus lactis Dorner como organismo de ensayo, y luego el caldo se trata para recuperar la vitamina B 12 cristalina.- Esto se  
15 hace filtrando el caldo y adsorbiendo el material activo del mismo por medio de carbón vegetal activado, el adsorbido de carbón se lava con una solución acuosa de piridina y el lavado resultante se evapora a sequedad a presión reducida.- El  
20 concentrado sólido así obtenido se extrae con alcohol metílico y el extracto alcohólico se adsorbe luego en columna usando alúmina activada y el material activo se lava de él con alcohol metílico nuevo.- Estas fracciones que tienen muy  
25 pronunciada actividad microbiológica se concentran juntas y la solución concentrada se mezcla con acetona, con lo cual precipita y se recupera vitamina B 12 bruta.- Este producto se purifica por reprecipitación de solución de etanol añadiendo acetona.- El producto se purifica más por cristaliza-



191178

ción de agua y acetona para producir vitamina B 12 cristalina.-

Se obtuvieron los siguientes resultados en obtenciones duplicadas que muestran el efecto de cobalto, añadido en forma de su nitrato:

5	Obtención número	Cobalto ppm	Potencia del caldo unidas LLD/ml	Vitamina B 12 Cristalina aislada
	1	nada	173	18.4 mg
	2	2 ppm	2250 (media)	106.7 mg

Se preparó un agente de fermentación que contenía:

10	Harinas de habas de soya (Staley 4-S)	3 %
	Dextrosa	2%
	NaCl	0.25 %
	Solubles de destilería	0.75 %
	Agua hasta un total de	100 %

15 Este agente se preparó y subdividió en frascos de Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 40 ml por frasco.- Se añadieron cantidades variables de cobalto (como su nitrato) como se indica en el siguiente cuadro, y los frascos y su contenido se esterilizaron calentando a 120° C., durante media hora.- Los frascos se inocularon con 2.5% aproximadamente de volumen de un cultivo vegetativo de cuarenta y ocho horas de una raza de Streptomyces griseus productora de estreptomicina.- Después de la inoculación los caldos inoculados se mantuvieron a 27° C., durante tres días con agitación continua en un agotador giratorio.- Terminado este periodo de fermentación, la estreptomicina y las actividades LLD de los caldos dieron el siguiente ensayo:

20

25



191178

<u>Go.ppm.</u>	<u>Estreptomina <math>\gamma</math>/ml.</u>	<u>Unidades LLD/ml.</u>
0.0	850	300
0.5	825	3000
1.0	845	3100
2.0	650	4200
4.0	235	5000
6.0	< 150	2400
8.0	< 150	2000
12.0	< 150	220

10 Este agente se preparó y subdividió en frascos de Erlenmeyer de 125 ml que contenían 100 ml de agente por frasco.- Los frascos y su contenido se esterilizaron calentando a 120° C., durante venticinco minutos.- Los agentes se enfriaron a 37° C., y se inocularon con 1 ml por frasco de una suspensión Clostridium tetanomorphum crecido de anaerobicamente en agente de sesos-hígado-corazón Bacto.- Después de la inoculación, 15 los caldos inoculados se mantuvieron en condiciones estacionarias a 37° C., durante el periodo indicado en el cuadro de abajo.-

20 Un segundo grupo de frascos que contenían el mismo agente suplementado con 10 microgramos de hexahidrato y nitrato de cobalto por ml, (aproximadamente dos partes de cobalto por millon de partes del agente) se esterilizaron, inocularon e incubaron de igual modo.- Terminado el periodo de fermentación el ensayo de los caldos fué el siguiente: (los valores 25 dados se obtuvieron por promedio de valores obtenidos en cuatro fermentaciones diferentes realizadas en cada una de las



1950

191178

condiciones indicadas).

<u>Periodo de fermentación días</u>	<u>Sin cobalto</u>	<u>Actividad LLD por ml, cobalto 2 ppm.</u>
4	660	4600
5 7	760	6300

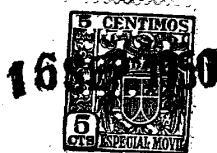
Varios cambios y modificaciones pueden hacerse en la realización del presente invento sin apartarse de su espíritu y finalidad; por ejemplo, pueden emplearse agentes nutritivos sólidos tales como salvados en grano en vez de los agentes nutritivos acuosos especificados.- Como estos cambios y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones anexas, deben considerarse como parte de nuestro invento.-

La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América con fecha 10 de julio de 1948, bajo el número 38.176, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto-Ley sobre Propiedad Industrial.-

- N O T A -

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

20 1º.- Mejoras introducidas en la producción de caldos de fermentación como se han descrito, caracterizadas porque di-



191178

5 chos caldos están enriquecidos de sustancias vitamínicas obtenidas por fermentación de un agente nutritivo acuoso que contiene como 0.1-20 partes de cobalto por millón de partes de agente, por medio de una raza, productora de actividad LLD, de un micro-organismo perteneciente a la subtribu Fungi.-

10 22.- Mejoras introducidas en la producción de caldos de fermentación como se han descrito, caracterizadas porque dichos caldos están enriquecidos en su contenido de sustancias vitamínicas, obtenidas fermentando un agente nutritivo acuoso que contiene como 0.1-20 partes de cobalto por millón de partes de agente, por medio de un crecimiento sumergido y aeróbico de un Streptomyces, que produce sustancias de actividad LLD.-

15 32.- Mejoras introducidas en la producción de caldos de fermentación como se han descrito, caracterizadas porque dichos caldos están enriquecidos en su contenido en sustancias vitamínicas, obtenidos fermentando un agente nutritivo acuoso que contiene entre 0.1 y unas 20 partes de cobalto por millón de partes de agente, por medio de un crecimiento sumergido de Clostridium que produce sustancias de actividad LLD.-

20 42.- Mejoras introducidas en la producción de caldos de fermentación como se han descrito, caracterizadas porque dichos caldos contienen vitamina B 12 sintética de Streptomyces obtenidos fermentando un agente nutritivo acuoso, en condiciones sumergidas y aireadas, que contiene entre 0.1 y 25 20 partes de cobalto por millón de partes de agente, por medio de una raza del microorganismo.-



191178

Streptomyces griseus productora de griseína.-

5 59.- Mejoras introducidas en la producción de caldos de fermentación como se han descrito, caracterizadas porque dichos caldos contienen vitamina B 12 sintética de Streptomyces, obtenidos fermentando, en condiciones sumergidas y aireadas, un agente nutritivo acuoso que contiene como de 0.1 a 20 partes de cobalto por millón de partes de agente, por medio de una raza del micro-organismo Streptomyces griseus, productora de estreptomycinina.-

10 60.- Mejoras introducidas en la producción de caldos de fermentación como se han descrito enriquecido en su contenido de sustancias vitamínicas, caracterizadas porque dichos caldos se han obtenido fermentando un agente nutritivo acuoso que contiene como de 0.1 a 20 partes de cobalto por millón de partes de agente, mediante el crecimiento sumergido de una raza de Clostridium tetanomorphum que produce sustancias de actividad LLD.-

20 70.- Mejoras introducidas en la preparación de sustancias vitamínicas.-

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

Esta Memoria consta de quince hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.-

Madrid,

16 SEP. 1950

P. A.  
Alberto de Elzabura  
Por Poder