

SE/.



193259

193259

Memoria Descriptiva

para una patente de invención por veinte años en España, por:

" Procedimiento de obtención de un nuevo medio de cultivo para la producción de antibióticos y cultivo de microorganismos en general ", a favor de los Sres. Don Fernando Goddín Rouleau, y Don Rafael Ibañez González, residentes en Madrid, Manuel Becerra, 15 dup., y Montesquiza, 44, respectivamente.-

.

El presente invento se refiere a un procedimiento para la obtención de un nuevo medio de cultivo destinado a la producción por biosíntesis de antibióticos tales como penicilina, estreptomina, polimixina y similares y en general para el cultivo de microorganismos, que presenta sobre los medios conocidos y en particular sobre el medio a base de agua de maceración de maíz (Corn Steep Liquor) las siguientes ventajas.

- 1) Constancia en la composición del medio;
- 2) producción de micelio, más rápida y mas abundante para la preparación del inóculo de los tanques de fermentación;
- 3) obtención de un inóculo de mejor calidad;

5

10

193259



-2- JUN 1 1951

- 4) rendimientos de antibióticos por lo menos iguales a los del Corn Steep Liquor y en menos tiempo de fermentación;
- 5) facilidad de obtención y de conservación de la primera materia;
- 6) en el caso de países deficitarios en la producción de maiz, permite aprovechar otra materia prima, evitando la necesidad de importar el "Corn Steep Liquor" o el maiz para la obtención del mismo sustituyendo también a la lactosa, y resultando, mas económica la producción de los antibióticos.

Hasta la fecha se consideraba como materia prima indispensable para la fabricación de la penicilina el "Corn Steep Liquor" cuya adición al medio de cultivo, propuesta en el año 1946 por Moyer y Coghill, aumentó de modo extraordinario los rendimientos en penicilina por unidad de volumen al facilitar su biosíntesis.

Se trata de un subproducto de la industria del maiz obtenido por la maceración del grano en agua a pH 4 a una temperatura de 45-52°, y una activa fermentación natural, especialmente de tipo láctico, controlada por inyecciones de anhídrido sulfuroso. Para su conservación y transporte, se precisa concentrarlo hasta un 40-60 por cien de sólidos.

Han fracasado hasta ahora los numerosos intentos realizados para aislar el componente activo que confiere al "Corn Steep Liquor" la notable propiedad de estimular la biosíntesis de la penicilina por los microorganismos del grupo *Penicilium Notatum-Crysogetum* pero existe la evidencia de que se trata mas bien de varios factores que de uno solo, entre los que se encuentran proteínas, amino-ácidos, ácido láctico, azúcares reductores, sales minerales, componentes vitamínicos del grupo B y ciertos precursores específicos de la penicilina.

193259



-3- 21 JUN 1951

Sin embargo uno de los inconvenientes principales del "Corn Steep" cuando se destina a usos microbiológicos, es precisamente la variabilidad de su composición, que depende siempre del proceso de fabricación empleado en la industria del maíz y hasta en una misma fábrica, de la clase y procedencia del maíz, de la estación del año y de otros factores incontrolables.

El medio de cultivo a base de "Corn Steep" ha de ser completado por la adición de azúcares reductores, generalmente lactosa.

Los inventores han descubierto:

- 1) Que del embrión o germen de la semilla del Algarrobo, (Ceratonia Siliqua) se pueden obtener las proteínas, polipeptidos, amino-ácidos, sales minerales, constituyentes vitamínicos y precursores necesarios para la biosíntesis de la penicilina, así como para el desarrollo en cultivo de los microorganismos;
- 2) que del albumen o endospermo de la misma semilla se pueden obtener azúcares reductores, concretamente manosa y galactosa, que pueden perfectamente sustituir a la lactosa como factor energético de la biosíntesis de los antibióticos;
- 3) que ciertos microorganismos, como por ejemplo el *Penicillium Cryso-genum*, segregan enzimas capaces por sí solos de fragmentar las proteínas del germen o embrión de la semilla del Algarrobo así como los azúcares complejos del albumen o endospermo de la misma semilla, poniendo tanto a los unos como a los otros en condiciones de poder ser aprovechables para la biosíntesis de la penicilina.

Numerosísimas experiencias comparativas efectuadas por los inventores, han demostrado que la composición del nuevo medio obtenido a base de cualquiera de los procedimientos indicados a continuación y utilizando siempre como materia prima el embrión de la

193259



-4-

semilla del Algarrobo, es extraordinariamente fija como se demuestra tanto por su análisis como por los rendimientos, practicamente constantes, en la producción de la penicilina.

5 Otras experiencias comparativas, con el "Corn Steep Liquor", demostraron que cualquiera de los extractos, hidrolizados, etc. preparados a partir del embrión de la semilla del Algarrobo producen, a las 24 horas de cultivo, un rendimiento de micelio mucho mayor que el suministrado por el "Corn Steep Liquor" y de una calidad mejor para su utilización como inóculo. Por lo tanto, el tiempo necesario, en la industria, para la preparación del inóculo se reduce considerablemente, lo que tiene una gran importancia económica. Al mismo tiempo, se ha demostrado que el rendimiento en penicilina es por lo menos igual, a veces superior al del "Corn Steep Liquor".

15 La fragmentación o degradación de las proteínas contenidas en la sustancia germinativa de la semilla del Algarrobo, para su transformación en polipéptidos y amino-ácidos así como la liberación de las demás sustancias necesarias o útiles a la biosíntesis y al desarrollo microbiano, tales como componentes vitamínicos, etc., lo mismo que la degradación de los polisacáridos de la misma sustancia germinal y del albumen o endospermo de la semilla, se pueden lograr por varios procedimientos:

- 25 1) Por extracción, autólisis, hidrólisis o proteólisis de las proteínas y azúcares contenidas en la sustancia germinativa de las semillas, por medios físicos, químicos o enzimáticos;
- 2) por la fermentación láctica espontánea y debidamente controlada de la sustancia germinativa;
- 30 3) por la fermentación de la misma sustancia germinativa mediante iniciadores, tales como salvado de trigo, yogourt,



excremento de ruminantes etc., o de gérmenes previamente aislados del grupo de los lactobacilos u otros. En todos estos casos es necesario concentrar los líquidos extraídos hasta aproximadamente 30-50% de sólidos para que puedan conservarse sin fermentación ni contaminación posterior.

Puede también emplearse como primera materia, la harina del embrión, o la sustancia germinativa, o las proteínas extraídas del mismo, previamente extraídas por disolventes adecuados para la obtención del aceite que contiene, el cual a parte de su valor económico, es perjudicial para el cultivo de ciertos microorganismos.

Cuando se utilizan los procedimientos de fermentación, parte de los azúcares se transforman en ácido láctico, el cual sin embargo mas bien favorece la biosíntesis de la penicilina, como ocurre con el "Corn Steep Liquor".

En el caso, ya mencionado, de la utilización de microorganismos que poseen enzimas, proteolíticos y amilolíticos suficientemente potentes para lograr por sí mismos la degradación antes expuesta, así como la liberación de todas las sustancias contenidas en la semilla y necesarias a su desarrollo o a la biosíntesis de antibióticos, cabe teóricamente la posibilidad de preparar el medio de cultivo directamente a base de harina de embrión y de harina de endospermo, en las debidas proporciones (entre 1 parte de la primera y 2 hasta 5 de la segunda) o incluso, de harina de la semilla completa, decorticada o no y enriquecida, si hace falta, en uno de los dos componentes o por otras materias susceptibles de mejorar el medio o de reducir su precio de costo, tales como harina de pescado o carne, harinas de tortas de semillas de algodón, lino, soja, etc. Sin embargo, en la práctica, el medio de cultivo preparado en esta forma presenta varios inconvenientes que llegan a dificultar o imposibilitar su utilización. En particular, la



suspensión de las harinas de germen y sobre todo de albumen resulta dificultada por la formación de grumos. Por otra parte, la harina de albumen comunica a la suspensión acuosa una viscosidad elevadísima que ya a concentraciones muy inferiores a las necesarias, haría difícil o imposible la aireación del medio y hasta su agitación, sin contar con que por la esterilización del mismo se produciría un verdadero engrudo.

Para obviar estos inconvenientes es preciso y suficiente someter las semillas del Algarrobo o las harinas procedentes de la misma, a procesos conocidos de solubilización, por ejemplo, por hidrolisis acuosa o gaseosa, autolisis, etc.

Como ejemplo para aclarar uno de los métodos de preparación del medio, damos el siguiente que no constituye limitación alguna:

Se prepara un iniciador de fermentación poniendo 66 grs. de salvado de trigo con 660 c.c. de agua del grifo acidulada con cualquier ácido orgánico o inorgánico, pero preferentemente con ácido sulfuroso a p H.4 y colocando en estufa a 50° durante 24 horas. En este momento está en plena fermentación. Se pesan 1.000 g. de germen troceado de la semilla de algarrobo, se añaden 4.440 c.c. de agua del grifo acidulada como antes, preferentemente con sulfuroso a p H.4 y todo el iniciador recientemente preparado como se ha dicho. Se pone en estufa a 50° durante 48 horas, al cabo de las cuales se prensa para obtener la mayor cantidad posible de jugo. Posteriormente se pasa por una tela fina o papel de jarabe y se concentra por evaporación a presión reducida hasta contener de 30 a 50% de sólidos. De este extracto espeso se pone en el medio la cantidad conveniente según el fin a que se le destine, así por ejemplo, para la producción de penicilina se añade en proporción de 2% de sólidos, completando el medio en 2% de glucosa si se



trata de producir micelio para el inóculo o de lactosa si se destina al medio de fermentación, juntamente con los precursores necesarios, así como carbonato cálcico para regular el PH.

N O T A.-

5 La presente patente de invención comprende las siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento de obtención de un nuevo medio de cultivo para la producción de antibióticos y cultivo de microorganismos en general, caracterizado porque las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos, se extraen de la sustancia germinal y del albumen de las semillas del Algarrobo (Algarrobo común, *Ceratonia Siliqua* L; Algarrobo blanco y Algarrobo gris, *Prosopis L Alba* y *Griseb*; Algarrobo falso, *Cercis Siliquastrum*, *canadensis* y *chinesis*; Algarrobito, *Prosopis campestris*, Algarrobilla, *Caesalpinia melanocarpa* y *brevifolia* y otras especies de *Caesalpinaceae*, *Cassidaceae* y *Mimosaceae*).

2.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos se extraen del embrión (gérmen) y del albumen (endospermo) de la semilla del Algarrobo y previamente a la aplicación del medio, por autólisis acuosa entre 40° y 50°c.

3.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos se extraen del embrión (gérmen) y del albumen (endospermo) de la semilla del Algarrobo y previamente a la apli-



cación del medio por hidrólisis ácida en medio líquido entre los límites de pH 1 - 6 y de temperatura de 20° - 75°c ó, bajo presión, hasta 140° c.

5 4.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos se extraen del embrión (gérmen) y del albúmen (endospermo) de la semilla del Algarrobo y previamente a la aplicación del medio por hidrólisis alcalina en medio líquido entre los límites de pH 8 - 14 y de temperatura de 20° - 75°c ó, bajo presión, hasta 140°c.

15 5.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos se extraen del embrión (gérmen) y del albúmen (endospermo) de la semilla del Algarrobo y previamente a la aplicación del medio por hidrólisis ácida en medio gaseoso por ejemplo mediante una corriente de cloro, ácido clorhídrico gaseoso o de anhídrido sulfuroso.

20 6.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos se extraen del embrión (germen) y del albúmen (endospermo) de la semilla del Algarrobo y previamente a la aplicación del medio por hidrólisis alcalina en medio gaseoso por ejemplo mediante una corriente de gas amoníaco.

25 7.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos se extraen del embrión (germen) y del albúmen

30



(endospermo) de la semilla del Algarrobo y previamente a la aplicación del medio por proteólisis enzimática bien por las encimas de la misma semilla, bien por encimas proteolíticas y amilolíticas añadidas a este fin.

5 8.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, y caracterizado además porque las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos se extraen del embrión (germen) y del albumen (endospermo) de la semilla del Algarrobo y previamente a la aplicación del medio por fermentación láctica espontánea y debidamente controlada o provocada mediante iniciadores tales como salvado de trigo, yogurt, excremento de rumiantes y análogos o de gérmenes previamente aislados del grupo de los lactobacilos u otros.

10 9.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos se extraen del embrión (germen) y del albumen (endospermo) de la semilla del Algarrobo por los mismos microorganismos productores de los antibióticos o que se pretenden cultivar, siempre que posean encimas proteolíticas y amilolíticas suficientemente potentes para conseguir la degradación de las proteínas y de los polisacáridos para liberar y hacer aprovechables las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento.

20 10.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos se extraen de la semilla del Algarrobo entera y previamente reducida a sémola o harina, con o sin extracción por disolventes del aceite que contiene y tratada posteriormente según

25

30



se indica en las reivindicaciones anteriores.

5 11.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque parte de las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos, se extraen de la sustancia germinal y del albumen de las semillas y mas especialmente las proteínas pueden ser extraídas del embrión (germen) de la semilla del Algarrobo, separada por medios conocidos, de las demás constituyentes de la semilla, tales como cutícula y albumen (endospermo) y reducido a
10 sémola o harina.

15 12.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque parte de las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos, se extraen de la sustancia germinal y del albumen de las semillas y mas especialmente los azúcares reductores son extraídos del albumen (endospermo) de la semilla del Algarrobo, separado por medios conocidos de los demás constituyentes de la semilla, tales como cutícula y embrión (germen) reducido a harina y tratado posteriormente según se indica en las reivindicaciones anteriores.
20

25 13.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque parte de las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos se extraen de la mezcla de sémola o harina de embrión (germen) y de harina de albumen (endospermo) de la semilla del Algarrobo, en proporciones comprendidas entre una parte de las primeras y dos hasta cinco partes de la segunda o incluso de la harina de la semilla total decorticada o nó y eventualmente enriquecida en uno de sus componentes o por otras materias.
30

193259

-11.-



-1 JUN

5 14.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior y caracterizado además porque el nuevo medio de cultivo para la producción de antibióticos y cultivo de microorganismos en general, basado en la extracción de las sustancias necesarias para la biosíntesis de los antibióticos o promotores del crecimiento de los microorganismos, de la semilla del Algarrobo, se completa por la adición de sales minerales tales como carbonato cálcico, cloruro sódico, sulfato de zinc y análogos y de precursores de los antibióticos tales como fenil-acetato potásico, fenilacetamina, u otros adyuvantes.

10 15.- " Procedimiento de obtención de un nuevo medio de cultivo para la producción de antibióticos y cultivo de microorganismos en general ".

15 Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva.

Consta esta memoria de once hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 1º de Junio de 1.950.-