

222 583



222 583

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a

la solicitud de

una PATENTE DE INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA

a favor de

PACIFIC YEAST PRODUCTS, INC, de California, domiciliada en
CALIFORNIA (Estados Unidos de América), WASCO,

p o r

" UN METODO PARA PRODUCIR VITAMINA B-12 FISIOLÓGICAMENTE
ACTIVA "

(Prioridad de la sol. norteamericana Ser.445.948,
de 27 julio 1954)

//////

222583



5

10

15

20

25

30

El presente invento se relaciona con la producción de sustancias que tienen una alta actividad de vitamina B-12 mediante el cultivo de un tipo particular de propionibacterium en medios de cultivo del tipo y bajo las condiciones que se describen detalladamente más adelante. En sus realizaciones más específicas y particularmente importantes, comprende un método para la manufactura de suplementos y concentrados de vitamina B-12 mediante un procedimiento económico y simple que utiliza melaza como la fuente de origen de hidratos de carbono y levadura autolisada y de desperdicio de cervecería como los únicos componentes del medio de cultivo y agua amoniacal como el agente neutralizante, procedimiento que puede ser efectuado con un equipo común de fermentación.

Si bien se han sugerido con anterioridad numerosos métodos para obtener productos de vitamina B-12, en la actualidad sólo existen tres de estos métodos revelados para la producción primaria de vitamina B-12 que se hallan en uso comercial actual, es decir 1 el método de B. Megathorium (Ind. Eng. Chem, 45, 838 (1953), 2 el procedimiento olivaceo de Streptomyces (Ind. Eng. Chem. 46, 238 (1954), y el método de extracción de cieno de aguas servidas (patente estadounidense n°. 2.646.386). Todos estos métodos tienen una o varias limitaciones prácticas importantes que son resueltas con el presente invento. Todos estos métodos anteriores son deficientes, por ejemplo, en relación con los rendimientos de actividad de vitamina B-12 que son capaces de producir. Ninguno es capaz de producir productos a ser utilizados en preparados farmacéuticos sin recurrir a procedimientos de extracción que son costosos y

222583



35

largos. Los resultados obtenidos al llevar a la práctica los citados procedimientos comerciales se caracterizan por lo general por rendimientos del orden de aproximadamente 8,8 a aproximadamente 44 miligramos de actividad de vitamina B-12 por kilogramo, sobre la base del peso del producto de fermentación bruto secado.

40

Mediante la práctica del presente invento se alcanza la producción de productos estables de vitamina B-12 de calidad excepcional, con potencias desusadamente altas, lográndose este resultado por medio de un procedimiento simple de manufactura que utiliza sub-productos económicos como materia prima. Los productos fabricados según las enseñanzas del presente invento contienen, sobre la base de los productos de fermentación brutos secados, de 110 a 132 miligramos de actividad de vitamina B-12 por kilogramo y en muchos casos cantidades sustancialmente mayores, es decir de 176 a 440 miligramos y cantidades aun materialmente más altas.

45

50

Ya se ha propuesto la producción de un compuesto con actividad de vitamina B-12 mediante fermentaciones que comprenden la utilización de varias bacterias de ácido propiónico, incluso propionibacterium freudenreichii. Estos procedimientos anteriormente conocidos no han resultado sin embargo ser comercialmente practicables. Es importante comprender que en cualquier método comercialmente utilizable deben satisfacerse varios criterios. Uno de estos comprende la propiedad o características en las bacterias de permitir que todo el cultivo posea características que permitan que resulte posible efectuar la separación de las bacterias del medio mediante sistemas económicos, notablemente por la fuerza centrífuga. Otras consideraciones importantes para

55

60

222583



65 lograr un método comercialmente utilizable para obtener vitamina B-12 se refieren a los substratos y a los suplementos orgánicos utilizados en éstos. Aquí han fallado por ejemplo los procedimientos anteriormente sugeridos de fermentación con propionibacteria, en particular al considerar el aspecto económico del método en su totalidad. Además, un método que brinde una satisfacción comercial total debe ser capaz de producir/brutos ^{productos} iniciales de altas potencias de vitamina B-12 dentro de lapsos de fermentación razonables y, además, estos
70 productos brutos deben tener un carácter tal como para prestarse bien a ser utilizados en procedimientos de extracción en aquellos casos en los cuales se desee producir concentrados de vitamina B-12.

75 De acuerdo con el presente invento, la fermentación es efectuada por medio de una cepa particular de bacterias de ácido propiónico, es decir propionibacterium freudenreichii, conjuntamente con la utilización de tipos particulares de substratos y tipos particulares de suplementos orgánicos, todo lo cual se describe detalladamente más adelante, La práctica del presente invento, que ha sido demostrada mediante
80 procedimientos comerciales efectuados en escala industrial, origina una cantidad de ventajas importantes. En primer término, según se ha dicho precedentemente, se obtienen productos estables que tienen una actividad de vitamina B-12 de
85 alta potencia y que carecen sustancialmente de variantes inactivas o de pseudo vitamina B-12, y estos productos tienen un sabor, olor y color relativamente agradable, fluyen libremente y no son hidroscolópicos, se los puede mezclar directamente con alimentos para seres humanos y animales, se les
90 puede utilizar en preparados farmacéuticos sin un mayor tra-

222583



1932

95

100

105

110

115

120

tramiento y concentración, y se hallan idealmente adecuados para preparar vitamina B-12 cristalina y concentrados de vitamina B-12. En segundo término, la práctica del método del invento no requiere utilizar volúmenes grandes de aire tales como los que necesitan varios otros procedimientos, por lo que no se requiere los dispositivos costosos de dispersión de aire. En tercer lugar, no es necesario recurrir a etapas de evaporación, extracción y absorción para obtener un producto de alta potencia, y además no se requieren aparatos de secado por rociamiento. En cuarto término, se evita el inconveniente de la contaminación con bacteriófagos y actinófagos, comunes a muchos procedimientos conocidos. Otras ventajas adicionales que son logradas por el presente invento estriban en que no se requieren organismos simbióticos para aumentar el rendimiento de vitamina B-12 o para facilitar en otra forma el aspecto económico del método, y no es necesario agregar vestigios de minerales al medio para promover el desarrollo del citado propionibacterium y para desarrollar la actividad de vitamina B-12. Además, no es necesario recurrir a la utilización de azúcares costosos y refinados tales como dextrosa o lactosa. Además, es innecesario recurrir a productos solubles de destilería, evitando así la creación de problemas difíciles de control de la calidad. Dado que el método del presente invento es un procedimiento de fermentación primaria de un cultivo puro, la calidad de la actividad de vitamina B-12 es sumamente uniforme; y dado que el método del presente invento es un método intracelular, es decir, un método en el cual la actividad de vitamina B-12 existe y es recuperada de los ingredientes sólidos brutos de fermen-

222583



JUN 1932

tación a diferencia del caldo de fermentación, se simplifican mucho los procedimientos de recuperación.

125 El método del presente invento comprende la utilización de ciertos ingredientes y una serie de etapas correlacionadas de procedimiento que, en combinación, originan los resultados que se han descrito más arriba. La bacteria específica que se utiliza es *P. freudenreichii*, según se ha dicho precedentemente (véase el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, 6ª edición, Williams y Wilkins Co.).

130 El medio nutritivo consiste únicamente o esencialmente en melaza, que puede ser melaza de remolacha, melaza de residuos de refinación de azúcar, o melaza de zanahoria (derivada como un subproducto en el tratamiento de zanahorias para recuperar carotene), y un producto de levadura. El

135 producto de levadura puede comprender un extracto o autolisado de una levadura primaria pero resulta particularmente deseable preparar el extracto o autolisado de levadura líquida de desperdicio de cervecería. En este último caso resulta importante extraer las resinas de lúpulo mediante

140 procedimientos adecuados de lavado o por otro sistema similar, dado que interfieren con el procedimiento ulterior de fermentación. Resulta particularmente útil un autolisado preparado con levadura de desperdicio líquida y lavado de cervecería. El azúcar contenida en la melaza que se utiliza

145 debe ser convertida o invertida, y para esta finalidad el producto de levadura, tal como la levadura autolisada de desperdicio de cervecería, no debe ser sometida a tratamientos, tales como una pasterización a temperaturas indebidamente elevadas, que destruyen la invertasa que normalmente contiene. En aquellos casos en los cuales el pro-

150

222583



JUN 1953

155

ducto de levadura que se utiliza no contiene invertasa o contiene una cantidad insuficiente de invertasa, puede agregarse una fuente de origen externa de invertasa. La fermentación es efectuada bajo condiciones de suave agitación y con ciertos controles de la temperatura y el pH, según se indicará más adelante. Una vez que se ha obtenido una actividad sustancialmente máxima de vitamina B-12, todo el cultivo es centrifugado y la resultante crema de células bacterianas es lavada con agua y nuevamente centrifugada.

160

La crema lavada de células es secada, ventajosamente en un secador a tambor bajo presión atmosférica. El producto final, según se ha dicho precedentemente, contiene por lo general de 110 hasta varios centenares de miligramos de actividad de vitamina B-12 por kilogramo, determinado mediante el procedimiento de valoración de protozoarios descrito por J.E. Ford, British Journal of Nutrition (1953), valoración que diferencia la vitamina B-12 de los pigmentos biológicamente inactivos similares a la vitamina B-12.

165

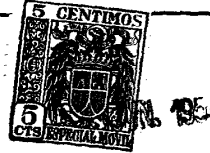
170

Además de la importancia de producir buenos rendimientos de vitamina B-12 de alta validez, sustancialmente carenente de pseudo B-12 y otras variantes inactivas, el método del presente invento también posee las ventajas vitales de su economía y simplicidad. Los extractos o autolisados derivados de la levadura líquida de desperdicio de cervecería y la melaza de remolacha o de residuos de refinación de azúcar, que comprenden ventajosamente los únicos componentes del medio nutritivo, son materiales económicos. La levadura líquida de desperdicio de cervecería es lavada, tamizada y autolisada, por ejemplo por calentamiento a aproximadamente 44°C durante unas 12 horas, y el auto-

175

180

222583



185

190

195

200

205

210

lisado es separado de las células residuales por centrifugación. En caso deseado pueden utilizarse varios métodos conocidos en la materia para producir el autolisado de levadura, pero se prefiere utilizar el procedimiento arriba descrito. Puede valorarse el autolisado de levadura por medio de una titulación del nitrógeno amínico. Un valor de 0,048% de nitrógeno amínico equivale a 1% de ingredientes sólidos de autolisado de levadura "YEASTAMIN" (vico Products Company). Puede utilizarse un autolisado primario de levadura y también es posible utilizar levadura de panadería o levadura primaria secada si se agrega una cantidad suficiente de levadura para que corresponda con un contenido de nitrógeno amínico del medio de aproximadamente 0,048% a aproximadamente 0,24%. También pueden utilizarse extractos de levadura preparados con aproximadamente 1% a aproximadamente 10% de levadura, sobre la base del peso del medio. Sin embargo, la fuente de origen especialmente preferida del suplemento orgánico es el autolisado de levadura de desperdicio de cervecería, dado que este material suministra todo el nitrógeno orgánico, la invertasa, los factores de crecimiento y las sustancias desconocidas, que se necesitan en forma simple y a un costo mínimo.

Sobre la base de la explicación precedente, se verá que el medio sólo necesita el substrato de melaza y el autolisado de levadura o lo similar. Si bien pueden agregarse materiales suplementarios, éstos son innecesarios para llevar a la práctica con éxito el presente invento. El autolisado y la melaza son mezclados, calentados a aproximadamente 45°C y su pH es ajustado a un valor de entre 5 y 5,5. El autolisado de levadura contiene una cantidad suficiente de invertasa para invertir los disacáridos existentes en la melaza

222 583



JUN 1950

215

220

225

230

235

240

pero, según se ha dicho precedentemente, si ésto no fuera así, puede agregarse invertasa externa. La inversión se completa sustancialmente en aproximadamente una hora en los casos habituales. El medio de cultivo consiste ventajosamente en aproximadamente 4% a aproximadamente 18% de melaza, constituyendo una cantidad de aproximadamente 5% a aproximadamente 12% un orden particularmente preferido; y de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% de ingredientes sólidos de autolisado de levadura, constituyendo una cantidad de aproximadamente 2% a aproximadamente 3% un orden particularmente preferido, debiendo considerarse dichas cantidades por ciento en peso sobre la base del medio de cultivo o del substrato como un total. El medio de cultivo, preparado en la forma precedentemente descrita, es esterilizado mediante el pasaje por una esterilizadora continua a una temperatura de aproximadamente 148°C durante unos 12 segundos, enfriado a aproximadamente 28 a 32°C, e introducido en un tanque de fermentación, ventajosamente un tanque de fermentación estéril, provisto con un agitador para mover suavemente al líquido. Se utiliza por lo general una inoculación de 5% a 10% y se efectúa la fermentación a una temperatura de 28 a 32°C, particularmente a 30°C, hallándose el pH ajustado a un valor de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,2 por medio de hidróxido de amonio. La fermentación se completa generalmente en un lapso de 72 a 96 horas con un resultante rendimiento de vitamina B-12 de 3 a 6 miligramos de actividad de vitamina B-12 por litro, según la cantidad y calidad de la melaza y del autolisado de levadura que se ha utilizado. Todo el cultivo es pasado por separadores centrifugos del tipo uti-

222 583



1953

245

lizado para levadura y las células bacterianas son recogidas. La resultante crema de células es diluida con agua para lavar, y se vuelve a separar a la suspensión. Este procedimiento de lavado puede ser efectuado tantas veces como sea necesario, según la cantidad del residuo de fermentación que queda con las células. Entonces la crema de células es secada, ventajosamente en un secador de tambor atmosférico, utilizando una presión de vapor de agua de entre aproximadamente 2,8 y aproximadamente 7 kg. por cm². Las escamas que se desprenden de los tambores son molidas y tamizadas hasta que las partículas tienen el tamaño deseado.

250

255

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la práctica del presente invento, pero no se los debe considerar como limitantes, dado que pueden efectuarse ciertos cambios en los mismos sobre la base de los principios básicos revelados en la presente solicitud sin apartarse del espíritu del invento.

260

EJEMPLO 1.- (a) 22.710 litros de levadura líquida y fresca de desperdicio de cervecaría que contenía 12,2% de ingredientes sólidos fueron tamizados por un tamiz vibratorio de malla Iram 149 para extraer las resinas de lúpulo y otros desechos. Los resultantes 22.615 litros de levadura tamizada fueron calentados a 44°C y almacenados, con una agitación suave, durante 10 horas para efectuar la autólisis. La resultante pasta líquida autolisada de levadura fué sometida a una separación al ser pasada por separadores de levadura donde se extrajo la materia residual y no disuelta de levadura. El autolisado límpido de levadura, que comprendía 15.140 litros que contenían 6% de ingredientes sólidos,

265

270

222583



23 JUN 1955

275

280

285

290

295

300

contenia 903.5 kg. de ingredientes sólidos de autolisado de levadura. Este autolisado fué mezclado con 3030 kg. de melaza de remolacha, el volumen fué ajustado con agua a 38.610 litros y el pH de la mezcla fué ajustado a 5,1 mediante la adición de ácido sulfúrido. Se inyectó vapor vivo para calentar a la mezcla a 45°C. Después de una hora, tiempo durante el cual se produjo una inversión completa del azúcar, la mezcla fué calentada a 80°C y pasada entonces por un esterilizados instantáneo continuo que mantuvo al medio a 143°C durante 12 segundos. Luego de pasar por un intercambiador térmico, la mezcla fué introducida en un tanque de fermentación de 56.775 litros de capacidad a 30°C. Se ajustó a un valor de 7,0 el pH de dicha solución o medio agregándole agua amoniacal y el tanque fué inoculado con 2270 litros de un cultivo de 48 horas de *P. freudenreichii*.

(b) Se dejó que la fermentación prosiguiera durante 96 horas a 30°C bajo condiciones de suave agitación, ajustando el pH mediante adiciones periódicas de agua amoniacal para mantenerlo entre 6,5 y 7,0. En el tanque se mantuvo en todo momento una presión interna de 0.35 kg/cm². Al término de las 96 horas todo el cultivo tenía por valoración 4.5 miligramos de actividad de vitamina B-12 por litro. La actividad total de vitamina B-12 producida fué de 194.000 miligramos. Entonces todo el cultivo fué centrifugado por medio de separadores de tipo de levadura. La crema de células tenía un volumen de 4240 litros. La crema de células fué secada en un secador atmosférico de tambor doble con una presión de vapor de 3,87 kg/cm² en el manómetro. El rendimiento final fué de 454,5 kg. de polvo que tenía por valoración 385,8 miligramos de actividad de vitamina B-12 por kilogra-

222583



3 JUN 1952

mo.

305 EJEMPLO 2.- (a) 100 gramos de un extracto de levadura
soluble secado autolisado de cervecería (v.gr. "YEASTAMIN",
Vico Products Company) y 120 gramos de melaza de remolacha
fueron disueltos en un litro de agua destilada. El pH de
310 la mezcla fué ajustado a 5,0 con ácido sulfúrico y se agre-
garon 5 ml. de invertasa (preparado técnico de Nutritional
Biochemical). La mezcla fué calentada a una temperatura de
45°C durante una hora para efectuar la inversión de la su-
crosa contenida en la melaza de remolacha. El pH de la
mezcla fué ajustado entonces a 7,0 con agua amoniacal. Se
suspendieron 40 gramos de tiza precipitada U.S.P. en la mez-
cla como un regulador del pH, y se agregó agua destilada pa-
315 ra diluir la mezcla a un volumen de 2 litros. La mezcla
fué transferida entonces a un fermentador de 4 litros que
se hallaba equipado con dispositivos adecuados para la agi-
tación aséptica, la adición de agentes neutralizantes y la
extracción de muestras. El fermentador y su contenido fue-
320 ron esterilizados por calentamiento a una presión de vapor
de 1,05 kg/cm² durante 90 minutos en una autoclave. Luego
de ser enfriado a 30°C, el fermentador fué inoculado con
100 ml. de un cultivo de 48 horas de *P. Freudenreichii*.

325 (b) Se dejó que prosiguiera la fermentación hasta haber-
se consumido todo el azúcar, lo que requirió un periodo de
aproximadamente 96 horas a 30°C bajo condiciones de agita-
ción suave. El pH fué ajustado a 7,0 a intervalos de 4 ho-
ras con agua amoniacal. Al término de las 96 horas todo el
cultivo tenía por valoración 4,5 miligramos de actividad
330 de vitamina B-12 por litro. Todo el cultivo contenía 7,4
gramos de ingredientes sólidos celulares por litro.

222583



JUN 1933

NOTA

En resumen: La Patente de Invención que se solicita, recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

335

1*.- Un método para producir vitamina B-12 fisiológicamente activa, que comprende proveer un medio acuoso que contiene, como ingredientes esenciales, melaza invertida y un producto de levadura, comprendiendo la melaza de aproximadamente 4% a aproximadamente 18%, y hallándose presente el producto de levadura en una cantidad suficiente para proveer un contenido de nitrógeno amínico de aproximadamente 0,048% a aproximadamente 0,24%, debiendo considerarse dichas cantidades por ciento en peso sobre la base del medio, inocular dicho medio con un cultivo de *P. freudenreichii* y fermentar durante un periodo de varios días para desarrollar una actividad de vitamina B-12.

340

345

350

355

2*.- Un método para producir vitamina B-12 fisiológicamente activa, que comprende proveer un medio acuoso que contiene, como ingredientes esenciales, melaza invertida y un autolisado de levadura, comprendiendo la melaza de aproximadamente 8% a aproximadamente 16%, y comprendiendo los ingredientes sólidos del autolisado de levadura de aproximadamente 2% a aproximadamente 3%, debiendo considerarse dichas cantidades por ciento sobre la base del peso del medio, inocular dicho medio con un cultivo de *P. reudenreichii*, y fermentar durante un periodo de varios días bajo condiciones de agitación para desarrollar una actividad de vitamina B-12.

360

3*.- Un método para producir vitamina B-12 fisiológicamente activa, que comprende proveer un medio acuoso que contiene, como ingredientes esenciales, melaza invertida y

222583



365

un autolisado de levadura de cervecería, comprendiendo la melaza de aproximadamente 8% a aproximadamente 16% y comprendiendo los ingredientes sólidos del autolisado de levadura de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, debiendo considerarse dichas cantidades por ciento sobre la base del peso del medio, inocular dicho medio con un cultivo de *P. freudenreichii*, y fermentar durante un periodo de varios días bajo condiciones de agitación para desarrollar una actividad de vitamina B-12, centrifugar todo el cultivo y secar la crema de células.

370

375

4^a.- Un método para producir vitamina B-12 fisiológicamente activa, que comprende proveer un medio acuoso que contiene, como ingredientes esenciales, melaza invertida y un autolisado de desperdicio de levadura de cervecería, comprendiendo la melaza de aproximadamente 8% a aproximadamente 12%, y comprendiendo los ingredientes sólidos del autolisado de levadura de aproximadamente 2% a aproximadamente 3%, debiendo considerarse dichas cantidades por ciento sobre la base del peso del medio, inocular dicho medio con un cultivo de *P. freudenreichii*, fermentar a una temperatura de entre aproximadamente 28 y aproximadamente 32°C a un pH de entre aproximadamente 6,5 y 7,2 durante un periodo de varios días bajo condiciones de suave agitación para desarrollar una actividad sustancial de vitamina B-12, centrifugar todo el cultivo, y secar la crema de células para producir así un producto que contiene por lo menos 110 miligramos de actividad de vitamina B-12 por kilogramo de producto secado.

380

385

390

5^a.- Un método para producir vitamina B-1a fisiológicamente activa, que comprende proveer un medio acuoso que

222588



395

contiene, como ingredientes esenciales, melaza invertida y un producto de levadura, comprendiendo la melaza de aproximadamente 4% a aproximadamente 18% y hallándose presente el producto de levadura en la cantidad necesaria para proveer un contenido de nitrógeno amínico de aproximadamente 0,048% a aproximadamente 0,24%, debiendo considerarse dichas cantidades por ciento sobre la base del peso del medio, inocular dicho medio con un cultivo de *P. freudenreichii*, fermentar a una temperatura de aproximadamente 30°C y a un pH de aproximadamente 6,5 a 7,2 durante un periodo de varios días bajo condiciones de suave agitación para desarrollar una actividad de vitamina B-12 y centrifugar entonces todo el cultivo.

400

405

6*.- Un método para producir vitamina B-12 fisiológicamente activa, que comprende proveer un medio acuoso que contiene, como esencialmente sus únicos ingredientes, melaza invertida y un autolisado de desperdicio de levadura de cervecería, comprendiendo la melaza de aproximadamente 8% a aproximadamente 12%, y comprendiendo los ingredientes sólidos del autolisado de levadura de aproximadamente 2% a aproximadamente 3%, debiendo considerarse dichas cantidades por ciento sobre la base del peso del medio, inocular dicho medio con un cultivo de *P. freudenreichii*, y fermentar durante un periodo de varios días bajo condiciones de cuave agitación para desarrollar una actividad sustancial de vitamina B-12.

410

415

420

7*.- Un método para producir vitamina B-12 fisiológicamente activa, que comprende proveer una solución acuosa que contiene, como esencialmente sus únicos ingredientes, melaza y un autolisado de desperdicio de levadura de cervec-

222583



JUN 1932

425

430

435

440

445

450

ría que contiene invertasa, invertir dicha melaza por medio de dicha invertasa para producir así un medio con melaza invertida que comprende de aproximadamente 4% a aproximadamente 10%, comprendiendo los ingredientes sólidos del autolisado de levadura de aproximadamente 2% a aproximadamente 3%, debiendo considerarse dichas cantidades por ciento sobre la base del peso del medio, inocular dicho medio con un cultivo de *P. freudenreichii*, fermentar a una temperatura de entre aproximadamente 28°C y aproximadamente 32°C a un pH de aproximadamente 6,5 a 7,2 durante un periodo de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 días bajo condiciones de suave agitación para desarrollar una actividad sustancial de vitamina B-12, centrifugar todo el cultivo, lavar las células bacterianas con agua, volver a centrifugar, y secar entonces dichas células bacterianas lavadas para producir un producto secado que contiene por lo menos 110 miligramos de actividad de vitamina B-12 por kilogramo de dicho producto secado.

8*.- Un método para producir vitamina B-12 fisiológicamente activa, que comprende proveer un medio acuoso que contiene, como esencialmente sus únicos ingredientes, melaza invertida y un autolisado de desperdicio de levadura de cerveza, comprendiendo la melaza de aproximadamente 8% a aproximadamente 12%, y comprendiendo los ingredientes sólidos del autolisado de levadura de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, debiendo considerarse dichas cantidades por ciento sobre la base del peso del medio, inocular dicho medio con un cultivo de *P. freudenreichii* y fermentar durante un periodo de varios días bajo condiciones de suave agitación y mientras el pH es mantenido entre aproximadamente

222583



6,5 y aproximadamente 7,2 y la temperatura entre aproximadamente 28 y aproximadamente 32°C para desarrollar una actividad sustancial de vitamina B-12.

455

9*.- Un método para producir vitamina B-12 fisiológicamente activa, que comprende proveer un medio acuoso que contiene, como esencialmente sus únicos ingredientes, melaza de remolacha invertida y un autolisado de desperdicio de levadura de cervecería, comprendiendo la melaza de

460

remolacha de aproximadamente 8% a aproximadamente 12% y comprendiendo los ingredientes sólidos del autolisado de levadura de aproximadamente 2% a aproximadamente 3%, debiendo considerarse dichas cantidades por ciento sobre la base del peso del medio, inocular dicho medio con un cultivo de P. freudenreichii, fermentar mientras se agita

465

suavemente al medio y mantenerlo a un pH que se halla dentro del orden de aproximadamente 6,5 a aproximadamente

470

7,2 y a una temperatura que se halla dentro del orden de aproximadamente 28 a 32°C durante un periodo de varios días para desarrollar una actividad sustancial de vitamina B-12, centrifugar todo el cultivo y secar la crema de células.

475

10*.- Se reivindica, por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN METODO PARA PRODUCIR VITAMINA B-12 FISIOLÓGICAMENTE ACTIVA".

480

Todo conforme queda descrito en la presente memoria, que consta de diez y siete páginas escritas a máquina.-

Madrid, 23 junio 1955

ALFONSO UNGRIA