

236386

L 5



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

por "PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR VITAMINA B₁₂", a favor de DON JUAN ABELLÓ PASCUAL, de nacionalidad española, domiciliado en Madrid, "Vinaroz, 5".

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir vitamina B₁₂.

El objeto principal de esta invención es suministrar métodos para producir dicha vitamina-cianocobalamina por el efecto sintético de un cultivo de Actinoplanes subtropicalis.

Como es sabido, la vitamina B₁₂ es esencial para la vida animal y se emplea ahora en forma cristalina para el tratamiento de la anemia perniciosa en los seres humanos, y además se añade como un concentrado crudo en el alimento de los animales, como un factor beneficioso para el crecimiento de aves, perros y cerdos.

Esta vitamina se ha aislado desde diversas fuentes naturales tales como hígado, riñones y algunos alimentos del mar. Se ha demostrado que cepas de distintos microorganismos, tales como Torula, Xeromothecium, Streptomyces, Bacillus, y myco-

236386



bacterium, tienen capacidad para biosintetizar la vitamina B₁₂. Sin embargo, hasta ahora esta capacidad no ha sido encontrada entre las cepas de Actinoplanes.

5. Se ha visto ahora que una cepa especial de Actinoplanes sub tropicalis biosintetiza, en su cepa novo, la vitamina B₁₂, y que esta cepa tiene facultad para ello sin necesidad de añadir una fuente de iones de cobalto al medio de cultivo, siendo única esta capacidad ya que la vitamina B₁₂ es un complejo ciano-cobalto, roja, cristalina y cuya fórmula empírica puede representarse mejor por C₅₁₋₆₄, n 89-92, Co/N 14, O13,-14 R. y se ha observado además que la citada capacidad biosintética solamente se demuestra bajo ciertas condiciones de cultivo cuyos detalles se dan a continuación.
- 10.

15. La cepa novo de la Actinoplanes sub tropicalis posee también la capacidad biosintética de convertir enzimáticamente los glucósidos-B a cianuro, lo cual hace posible la conversión de cobalamina a ciano-cobalamina, sin necesidad de añadir una fuente de iones de cianuro.

20. La presente invención abarca, formando parte íntegra del procedimiento de la misma, el método de convertir la cobalamina en ciano-cobalamina, así como la forma de realizar dicha conversión, que también será descrita ahora.

25. Como se ha dicho, en esta invención se emplea como organismo capacitado para el efecto biosintético buscado, una nueva cepa de Actinoplanes sub tropicalis, aislado de sedimentos tomados del río Amazonas. Esta cepa, además de biosintetizar la vitamina B₁₂, posee las siguientes características:

30. I.- Características morfológicas.- Micelio bien desarrollado, sin tabique, 0,3 a 0,7 u. en diámetro. Crece bien en el substrato pero no forma un verdadero micelio aéreo. Se mul-

236386

5J



tiplica por medio de conidio esférico producido al final de conidióferos ramificados, que surgen del micelio vegetativo. El conidio germina en las esporas movibles.

5. II.- Propiedades bioquímicas.- Aeróbico, hidroliza el almidón, liquida la gelatina, crece bién en la dextrosa de patata, agar nutritivo y en medio de dextrosa de asparagina. Crece a 20-25° C., y produce un pigmento marrón soluble en todos los medios de agar.

10. Las técnicas de cultivo en el procedimiento objeto de esta invención son similares a las que se emplean en la producción de antibióticos. Se lleva a cabo en recipientes aireados y agitados que, preferiblemente, son de acero inoxidable, mejor que de acero al carbono, para mayor facilidad de limpieza y control de contaminación. Si se emplearan las técnicas de cultivo en superficie habría que añadir los iones de cobalto y cianuro para producir esta vitamina B₁₂. Con la aeración y la agitación mecánica se tiene la ventaja de mayor eficacia y economía en la operación. Estos recipientes pueden equiparse con camisa o con serpentines para enfriar y esterilizar el contenido de los mismos, y tales medios conjuntados con adecuados aparatos de control, sirven para mantener la temperatura deseada en el medio durante la fermentación. Dichos recipientes se equipan con aparatos agitadores que entran en los tanques a través de prensaestopas a fin de disminuir la contaminación. Estos aparatos de agitación pueden ser propulsores de hoja lisa o de turbina y deberán rendir desde uno hasta 10 H.P. por cada 100 galones del medio.

25. Los organismos Actinoplanes subtropicalis tratados en estos recipientes necesitan oxígeno para su crecimiento pero a la vez debe estar exento de contaminación por microorganismos.
- 30.

236386



- Para ello el aire que bajo presión penetra en los recipientes se hace pasar a través de capas de filtro estériles, especialmente preparadas, hechas de algodón, carbón activo o lana de cristal. El aire esteril entra en los recipientes a través de regaderas colocadas directamente debajo del agitador con lo que el aire que se eleva se quiebra por el contacto con las hojas del agitador y es dispersado en pequeñas burbujas. La regadera, según la invención, puede ser un tubo abierto, o un anillo o tubo perforado del tipo regadera. Dentro de los tanques se mide el aire mediante rotámetros, u otros aparatos medidores adecuados. La cantidad de aire requerida variará con el tamaño y formato del tanque y con la fase del proceso. Sin embargo, el sistema habrá de poder rendir y medir desde 0.1 a 2.0 volúmenes de aire por volumen del medio, por minuto.
- Esta introducción de aire y el empleo de agitación crean espuma que es necesario deshacer y para ello se necesitan agentes o aparatos mecánicos despumadores. Entre los agentes pueden emplearse como despumadores algunos alcoholes mas altos, tales como el octadecanol, que pueden emplearse con aceite mineral, aceite de oliva o aceite de soja, o pueden emplearse emulsiones que contengan las siliconas.
- Para su crecimiento y biosíntesis, las Actinoplanes subtropicalis precisan fuentes de nitrógeno, carbono, energía y sales minerales.
- Como fuente de carbono y energía puede emplearse una gran número de carbohidratos, pudiendo citarse entre ellos la glucosa, la fructosa, la sacarosa, la maltosa y el almidón. En esta invención se ha observado que no es esencial la adición de compuestos individuales purificados, como fuentes de

233386

15J



energía y carbono. Se puede usar grano de azucar, invertir azucar y melazas de remolacha o caña en concentraciones desde 5 hasta 2% para un buen crecimiento, pero la cantidad preferida para producir vitamina B₁₂ es de un 1 a un 10%.

5. Como fuente de nitrógeno pueden emplearse tanto los materiales orgánicos como los inorgánicos. Entre otros se han empleado en esta invención cierto número de productos de la digestión de proteínas, de soja, de granos de café, granos de ricino, semillas de cacahuet y algodón. Igualmente eficaces como tales fuentes hay un número de compuestos inorgánicos que contienen nitrato y nitrógeno de amoníaco, tales como nitrato de sodio y potasio, sulfato de amonio y nitrato de amonio. En esta invención se ha observado que los nitritos no pueden ser utilizados por este organismo biosintetizador de la vitamina B₁₂. Para producirla pueden añadirse fuentes de nitrógeno, ya sean orgánicas o inorgánicas, con una concentración desde un 0.5 hasta un 5.0%.
10. Deben hallarse presentes nutrientes minerales que contengan los elementos esenciales, potasio, magnesio, fósforo y azufre. Estos pueden añadirse como sales de metales álcalis tales como sulfato o fosfato de sodio y potasio, en concentraciones que oscilan entre un 0.1 y un 1.0%. Los elementos indicadores, zinc, manganeso, hierro y cobre también se necesitan y pueden facilitarse al añadir al medio las sales de nitratos, sulfatos o cloruros para proporcionar esos elementos indicadores en concentraciones desde un 1.0 a un 10 ppm. para su crecimiento y producción de vitamina B₁₂. Tales elementos indicadores pueden omitirse cuando hay una alta concentración de melaza de remolacha u otro suplemento de nutrientes orgánicos.
15. Para la producción de vitamina B₁₂ la Actinoplanes subtro-
- 20.
- 25.
- 30.

236386

15



- picalis necesita esencialmente del níquel. En esta invención se ha observado que la adición de cobalto al medio no es necesaria, siempre que se sustituya con una fuente de níquel. Esta necesidad de níquel se observó en el curso de unos ensayos-rutina de los efectos de cierto número de iones de metal sobre la producción de vitamina B₁₂. Si se exceptúan el níquel y el cobalto, no se halló ningún otro ion metálico que, al añadirse separadamente o en combinación, pudieran satisfacer esta necesidad. Esto es lógico, ya que ambos están en el mismo grupo periódico y poseen casi idénticos pesos atómicos, 58,94 para el cobalto y 58,69 para el níquel.
- En el caldo obtenido durante el crecimiento del citado organismo Actinoplanes subtropicalis, y mediante técnicas espectrofotométricas de llama, se siguió la conversión de níquel a cobalto. Un descenso de la concentración de níquel es seguido por aumento paralelo en la concentración de cobalto. No se conoce exactamente en que se realiza esta conversión pero se supone la idea de que se produce un reajuste intra-atómico al añadir un electrón. Además se ha observado que este aparente reajuste intra-atómico solamente se produce en presencia de células de crecimiento activo del referido organismo, ya que no hay indicios de formación de cobalto en el medio sin inocular. Esta observación sugiere que hay una reacción enzimática catalizada. Igualmente se ha visto que para convertir el níquel en cobalto se necesita una temperatura de 40 a 50°C., así como condiciones alcalinas y una presión de aire en el tanque desde 10 hasta 25 libras. A continuación se describirá la manera de establecer estas condiciones. La necesidad de níquel puede ser satisfecha por la adición de cualquier número de sales solubles de níquel, tales como
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.



cloruro o sulfato de níquel amonio, cloruro de níquel o sulfato de níquel en concentraciones que oscilan entre 0,50 y 25 ppm. de ion de níquel. Concentraciones superiores a 25 ppm. inhiben el crecimiento de la Actinoplanes subtropicalis y la síntesis de la vitamina B₁₂.

5.

Para el control del pH durante la fermentación puede hacerse uso de una adición de apropiadas combinaciones de fosfato sódico dibásico y fosfato potásico monobásico, o la adición ya sea de hidróxido de amonio, hidróxido sódico o ácidos diversos, dependiendo del pH exigido. Sin embargo, en esta invención se prefiere emplear carbonato cálcico, tanto como "buffer" como considerado como fuente de ion de calcio, ya que el medio tiene una tendencia a acidificarse durante la fermentación y a experimentar otros cambios por la adición ya sea de ácidos o de álcalis.

10.

15.

Se ha observado en esta invención que el pH del medio en la inoculación debe estar entre 7.0 y 7.5. Este pH se logra mejor por la adición de un 0.2 a un 1.0% de carbonato cálcico y suficiente hidróxido sódico para llevar el pH a 8.3-8.6 antes de la esterilización. Para la fase que comprende la conversión del níquel a cobalto, el pH del medio debe ajustarse a 11.5-12.5, lo que se logra fácilmente añadiendo hidróxido sódico estéril y saturado desde los pequeños tanques de alimentación, directamente conectados a los tanques de fermentación. De igual manera, al añadir ácido clorhídrico concentrado, el pH del medio se reduce a 2.0-2.5 para provocar la lisis del micelio y la entrega de la vitamina B₁₂ por las células que están en el caldo.

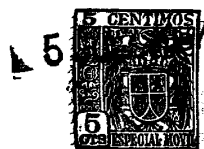
20.

25.

30.

La Actinoplanes subtropicalis crece a temperaturas comprendidas entre los 20 y los 50°C. En esta invención se ha

236386



- observado que para rendimientos máximos de vitamina B₁₂, hay que satisfacer ciertas exigencias especiales de temperatura durante períodos específicos del proceso. Tales exigencias se logran y mantienen introduciendo en los serpentines o camisas de los tanques mezclas de agua caliente y fría, cuyo ritmo y proporción se controla por válvulas adecuadas con diafragma de operación, activadas por electrodos debidamente colocados.
5. Durante las primeras 24 horas de crecimiento, durante las cuales el organismo crece rápidamente, son adecuadas temperaturas de 20 a 35°C, pero en la invención se ha preferido mantener una temperatura de 30°C. Durante las 5 horas siguientes, en que se produce la conversión de enzima catalizada del níquel a cobalto, las temperaturas de 40 a 50°C., resultan satisfactorias, pero en
10. la invención se ha preferido emplear la de 45°C. en combinación con un elevado pH y elevada presión de aire en el tanque. Una vez operada esta transformación se reduce la temperatura a 26-28°C., y se mantiene a este nivel durante las restantes fases del proceso.
15. La conversión de la cobalamina a cianocobalamina se realiza, por las Actinoplanes subtropicalis, sin añadir ion de cianuro al medio. Se ha visto en esta invención que ello se debe a la capacidad que tiene el citado organismo, en su cepa noyo, de producir enzimáticamente cianuro de los glucósidos beta. Esta reacción tiene como agentes intermediarios
20. dos enzimas extracelulares, que se ha observado son producidas en el caldo, a saber, B-glucosidasa y mandelonitrilasa, la primera de las cuales hidroliza los B-glucósidos, tales como la amigdalina, a mandelonitrilo, que es entonces enzimáticamente atacada por la mandelonitrilasa para producir
25. 30.

236386

5 JUL



- ácido hidrocianico. Como fuente de amigdalina se ha observado en la invención que tanto las almendras amargas trituradas, como las hojas de plátano secas trituradas, pueden usarse en concentraciones que oscilan entre un 0.01 y un 0.10%, prefiriéndose la concentración de 0.025 a 0.075%. Estas concentraciones darán un rendimiento suficiente de cianuro, de 10 a 100 ppm., para convertir toda la cobalamina producida a cianocobalamina, sin inhibir el crecimiento de las Actinoplanes subtropicalis.
- 5.
10. La producción de vitamina B₁₂ -cianocobalamina se midió empleando una modificación del procedimiento de valoración turbidimétrica, ideado por H.R. Kreggs et al. (Jor. Biol. Chem. Vol. 176:1459, 1948) usando Lactobacillus leichmannii (ATCC # 4797) como organismo de prueba y vitamina B₁₂ cristalina (Cobione-Merck & Co.) como standard. mediante este procedimiento se observó, que si se omitía la amigdalina conteniendo materiales del medio, esto daba como resultado una notable disminución en la producción de la vitamina B₁₂. Esto se atribuyó a la falta de ión cianuro. Esto se demostró por experiencias en las que se observó que el efecto de la amigdalina y del cianuro potásico sobre la producción de vitamina B₁₂, era idéntico.
- 15.
20. La identidad del material activo como vitamina B₁₂ fué luego establecida por experiencias alimenticias realizadas con pollitos criados de huevos puestos por gallinas mantenidas con una dieta deficiente en vitamina B₁₂. El suplemento de esta vitamina para dichas experiencias alimenticias fué preparado del caldo producido por las Actinoplanes subtropicalis, rico en vitamina B₁₂, cepa novo, que había sido filtrada, exenta de micelio, concentrada en vacío y
- 25.
- 30.

236386

5



rociada y secada para rendir un producto conteniendo a-
proximadamente 40 mg. de cianocobalamina por kilo de só-
lidos recuperados. Este concentrado se empleó como suple-
mento en todas las dietas proteínicas de vegetales en una
5. proporción de 2.0 microgramos de vitamina B₁₂ por 100 g.

de dieta. En un ensayo típico, los pollitos criados con un
suplemento de dieta consistente en concentrado de vitamina
B₁₂, pesaron 495 g., mientras que los alimentados sin vi-
tamina pesaron 250 g., y el grupo de pollitos alimentados
10. con una ración inicial típica pesaron 415 g.

A los fines de ilustrar la presente invención se citan
a continuación algunos ejemplos de realización, bien enten-
dido que sin caracter limitativo sino únicamente ilustra-
tivo.

15. Ejemplo 12.- A 5.000 galones de agua contenidos en un
tanque de fermentación se añadieron los siguientes elemen-
tos nutritivos:

	Melaza de remolacha	10.0%
	Harina de soja	2.0%
20.	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4%
	K ₂ HPO ₄	0.4%
	MgSO ₄ · H ₂ O	0.25%
	FeSO ₄ · H ₂ O	0.02%
	CaCO ₃	0.40%
25.	NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.01%
	harina de hojas de plátano	0.05%

El pH se ajustó a 8.3 con hidróxido sódico y se este-
rilizó el medio durante 30 minutos a 121°C. Después de en-
friar a 30°C. se observó que el pH era de 7.5 y entonces se
30. inoculó el medio con 250 galones de inóculo de 48 horas

236386 15 J



- previamente preparado en un tanque generador. La velocidad del agitador se ajustó a 100 r.p.m. y el ritmo del aire por volumen de medio por minuto, manteniendo el contenido del tanque por debajo de 5 libras de aire a presión. Con
5. intervalos de 6 horas se retiraron muestras para determinar el pH, el crecimiento, esterilidad, concentración de azúcar y valoración de vitamina B₁₂.
- Al cabo de 24 horas se observó que el pH era 7.0 y el crecimiento de las Actinoplanes subtropicalis, cepa novo,
10. había alcanzado casi un máximo, como indicaron las medidas de peso en seco de la masa de micelio. No se había verificado la producción de vitamina B₁₂ y, aproximadamente el 75% del azúcar y nitrógeno iniciales, que se añadieron, habían sido utilizados. Se añadió hidróxido sódico saturado estéril para llevar el pH a 11.8 y se aumentó la temperatura del
15. medio a 45°C, introduciendo agua caliente en la camisa y los serpentines. No se cambió el ritmo de aire pero su presión en el tanque se aumento a 25 psi. Al cabo de unos minutos pudo localizarse espectrofotométricamente la conversión del níquel a cobalto y se observó que se llevó a cabo en 5 horas.
20. Entonces se reajustó el pH a 7.0 con ácido clorhídrico estéril, se redujo la temperatura a 26°C. y la presión dentro del tanque se redujo a 5 psi. Una valoración turbidimétrica para la vitamina B₁₂ indicó que la síntesis de esta vitamina
25. se había iniciado y que la producción había alcanzado un máximo en 66 horas después de la inoculación.

Algunos de los resultados obtenidos fueron los siguientes:

236386

5 JUN 1954



Edad de la muestra Horas	pH	Crecimiento en mg./ litro	Vitamina B en mg./ litro
24	7.0	0.78	0.00
29	11.8	0.80	0.00
30	7.0	0.80	0.00
36	7.3	0.84	0.20
42	7.5	0.84	0.40
48	7.9	0.79	0.78
54	8.3	0.70	1.53
60	8.5	0.63	4.10
66	8.75	0.58	4.26

5. Se ajustó el pH del caldo a 2.5 con ácido clorhídrico concentrado y se cerró el aire. Al cabo de 3 horas esto dio como resultado un aumento del contenido en vitamina B₁₂ del caldo a 5.8 mg./litro, como resultado de la lisis del micelio y la levigación ácida de la vitamina B₁₂. El caldo con pH, rico en dicha vitamina, se ajustó dicho pH a 6.5 y se envió a recuperación para preparar la vitamina B₁₂ cristalina.

15. Ejemplo 2º.- Se preparó un medio de fermentación con la siguiente composición:

Melaza de remolacha	5.0%
Dextrosa	5.0%
Harina de granos de café	3.0%
20. K ₂ HPO ₄	0.3%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25%
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.02%
MnCl · 6H ₂ O	0.007%
CaCO ₃	0.80%
25. Harina de almendras amargas	0.025%

y se empleó en lugar del medio dado en el Ejemplo 1º. Bajo idénticas condiciones de operación se produjeron en 65 horas 3.8 mg. de vitamina B₁₂ por litro.

30. Ejemplo 3º.- Se empleó un medio con agua de grifo, compuesto por los siguientes ingredientes, en lugar de los

236386... 5



especificados en el Ejemplo 12:

	Melaza de remolacha	7.0%
	Almidón, patata, ñame	2.5%
	NH_4NO_3	2.0%
5.	$NaCl$	0.5%
	K_2HPO_4	0.4%
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2%
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05%
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001%
10.	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.004%
	$CuSO_4 \cdot H_2O$	0.002%
	$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	0.01%
	$CaCO_3$	1.0%
	Harina de hojas de plátano	0.03%

15. En este medio el crecimiento de la Actinoplanes sub-tropicalis, cepa novo, es algo mas lento y por consiguiente la conversión del níquel a cobalto no se inicia hasta 36 a 40 horas después de la inoculación. En este medio se produce 1.85 mg. de vitamina B_{12} por litro en 80 horas.

20. Dentro de la esencialidad del invento caben amplias modificaciones y variaciones que podrán ser llevadas a cabo en su realización por los peritos en la materia sin salirse por ello del espíritu y alcance de la invención.

236386 5



N O T A

Hecha la descripción del presente invento se declaran como nuevas y de propia invención las reivindicaciones siguientes:

5. 1ª.- Procedimiento para producir vitamina B₁₂, caracterizado porque en tanques de fermentación dotados de medios de aeración, agitación mecánica, regulación de presión y ritmo de aire y dispositivos de caldeo y refrigeración, se prepara un cultivo de la cepa noyo del microorganismo Actinoplanes subtropicalis, como elemento biosintetizador de dicha vitamina, en cuyo caldo, además de los ingredientes necesarios para el suministro de elementos de crecimiento y biosíntesis del citado organismo, se agregan sales de níquel y fuentes de amigdalina, combinando las temperaturas, presiones y volúmenes de aire introducido, con
10. 15. frecuentes reajustes del pH del caldo sometido a agitación mecánica, hasta que el examen de muestras acuse la máxima riqueza del mismo en vitamina B₁₂ la cual es ulteriormente cristalizada por los medios habituales.
20. 2ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la conversión de enzima catalizada del níquel a cobalto se produce en una fase del proceso en la que ya ha tenido lugar un máximo crecimiento de la cepa noyo, siendo entonces necesario forzar la temperatura del caldo y elevar al máximo la cifra del pH, sin cambiar el ritmo del
25. 3ª.- Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque, siendo apta la cepa noyo del microorganismo Actinoplanes subtropicalis para producir

236386 . . 53



enzimáticamente cianuro de los glucósidos beta, una de las enzimas intermedias producidas durante el proceso de fermentación del caldo de dicha cepa hidroliza la amigdalina convirtiéndola en mandelonitrilo que al ser entonces

- 5. atacada por la mandelonitrilasa da lugar a la producción del ácido hidrocianico necesario para convertir, cuando la concentración de fuentes de amigdalina es la conveniente, toda la cobalamina producida a cianocobalamina, sin inhibir el crecimiento del referido microorganismo, y sin
- 10. que haya de emplearse fuente alguna complementaria de iones de cianuro.

4ª.- Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el pH del cultivo durante la fase de conversión del níquel a cobalto debe ajustarse entre

- 15. 11.5 y 12.5 elevando la temperatura del medio, que hasta entonces no pasaba de los 30°C., hasta 45°C., aproximadamente.

5ª.- Procedimiento, según la reivindicación 3ª, caracterizado porque la concentración de fuente de amigdalina, para conseguir la conversión de toda la cobalamina en cianocobalamina, oscila entre un 0.01 y un 0.10%.

- 20.

6ª.- Procedimiento para producir vitamina B₁₂.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de quince hojas foliadas y mecanografiadas por una sola cara.

Madrid, a 5 de Julio de 1957.

JUAN ABEILÓ PASCUAL.

P. a.