

AÑO 1958

Expediente núm. 243617



REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

CERTIFICADO DE ADICION

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de
un **CERTIFICADO DE ADICION** en España,
a favor de

THE DISTILLERS COMPANY LIMITED, de nacionalidad
británica domiciliado en 12, Torphichen Street,
~~Edinburgh~~ Edinburgh, Escocia. ~~núm.~~

por:

Mejoras intro-
ducidas », en el objeto de la patente principal núm. 242240
que fué concedida en 3 de Junio de 1953 por :
« Un procedimiento para la producción de cobalaminas »

2 OCT. 1958



1958

243617

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

e n

E S P A Ñ A

1er. CERTIFICADO DE ADICION

a nombre de THE DISTILLERS COMPANY LIMITED, entidad britanica, establecida en 12, Torphichen Street, Edimburgo, Escocia, por:

"MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL"

Núm. 242.240, solicitada el 3 de Junio de 1.958, por: "Un procedimiento para la producción de cobalaminas".

La presente invención se refiere a un procedimiento perfeccionado para la producción de cobalaminas.

Por la denominación "cobalaminas" se alude al compuesto cianocobalamina (vitamina B₁₂) y compuestos análogos que se convierten en cianocobalamina por la acción de iones cianuro, por ejemplo, hidroxocobalamina (vitamina B₁₂^b).

Es sabido que tales compuestos pueden obtenerse por la fermentación de un medio nutriente adecuado por microorganismos, por ejemplo especies de los géneros Streptomyces y Propionibacterium.



43617

2 OCT 1958

En nuestra solicitud número 242.240, se describe y reivindica un procedimiento discontinuo mejorado para la producción de cobalaminas, según el cual se fermenta un medio nutriente adecuado con una capa productora de cobalamina de Propionibacterium bajo condiciones sustancialmente anaerobicas durante la primera parte del periodo de fermentación y, posteriormente, el medio de fermentación se pone en contacto con oxígeno durante el resto del periodo de fermentación. Por este procedimiento se obtienen rendimientos elevados de cobalaminas.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento continuo para la producción de cobalaminas que es una modificación de la invención reivindicada y descrita en la solicitud mencionada anteriormente.

De acuerdo con esto, la presente invención es un procedimiento continuo para la producción de cobalaminas que comprende fermentar un volumen de un medio nutriente líquido adecuado bajo condiciones sustancialmente anaerobias con una especie productora de cobalamina del género Propionibacterium en una primera zona y mientras se agregan nutrientes a esta zona hacer pasar medio que contiene células desde la primera zona a una segunda zona, a una velocidad tal que se mantenga la concentración de células y el volumen de medio en la primera zona prácticamente constante; poner en contacto el medio que contiene células en la segunda zona con oxígeno mientras se retira medio que contiene cobalaminas, de la segunda zona, a una velocidad tal que se mantenga la concentración de células y el volumen de medio en la segunda zona prácticamente constante, y posteriormente, concentrar o recuperar las cobalaminas contenidas en el medio que contiene células retirado de la segunda zona.

Por la expresión "un medio nutriente líquido adecuado" se



entiende un medio nutriente líquido que soportará el desarrollo de la especie productora de cobalamina, de Propionibacterium y la producción de cobalaminas por el organismo. Un medio de esta índole tiene que contener, además de nitrógeno y carbono asimilables, una fuente de cobalto asimilable, puesto que las cobalaminas contienen este elemento. Una fuente de cobalto asimilable debe añadirse, por tanto, al medio de fermentación, si la cantidad contenida en los otros constituyentes del medio es insuficiente. Son fuentes adecuadas de cobalto las sales inorgánicas acuosolubles de cobalto, por ejemplo, el cloruro o el nitrato. Pueden añadirse al medio nutriente para proporcionar una concentración de cobalto en el medio, por ejemplo entre los límites de 2,5 a 5 partes, aproximadamente, por millón de partes del medio.

Se ha encontrado que son medios particularmente adecuados para el procedimiento de la presente invención los que contienen líquido de maceración del maíz como fuente de nitrógeno en una concentración mayor de 140 mg., aproximadamente, de nitrógeno, por 100 mililitros de medio, y glucosa o lactosa en una concentración superior a 5 % en peso, aproximadamente, por volumen, como fuente de carbono.

Es preferible que la concentración de líquido de maceración del maíz en el medio sea tal que proporcione una concentración comprendida entre los límites de 200 a 400 miligramos, aproximadamente, de nitrógeno, por 100 mililitros de medio, y que la concentración de glucosa o lactosa esté entre los límites de 8 a 12 gramos, aproximadamente, por 100 mililitros del medio.

Además del nitrógeno añadido como líquido de maceración del maíz, puede haber presentes otras fuentes de nitrógeno. Por



DICT. 1936

243617

ejemplo, se ha encontrado conveniente controlar el valor del pH del medio durante el proceso, por medio de adiciones de amoniaco, preferiblemente en forma de una solución acuosa.

5 Cuando se utiliza glucosa como fuente carbonada, se añade esta preferiblemente al medio de fermentación como tal, pero, si se desea, puede añadirse en otra forma cualquiera; por ejemplo, como sacarosa. Pero, si este material se utiliza, puede ser necesario invertirlo ajustando el pH del medio y calentando, o bien por acción enzimica antes de que la glucosa contenida en la saca-
10 rosa esté disponible para el organismo. Hay que añadir suficiente cantidad del material para proporcionar glucosa en una concentración de, por lo menos, 5 gramos por 100 mililitros del medio, y preferiblemente en una concentración de 8 a 12 gramos por 100 mililitros de medio.

15 Puede añadirse también lactosa en cualquier forma, con tal que el carbohidrato sea asimilable por el organismo.

Es conveniente que la fuente de carbono se esterilice por separado, puesto que el calentamiento de carbohidratos en presencia de los otros constituyentes del medio tiende a originar un
20 medio que da menores rendimientos que otro en el cual el carbohidrato se esterilice por separado y se añada luego asepticamente a los otros constituyentes esterilizados del medio.

El procedimiento de la presente invención se realiza preferiblemente a unos 30° C. en cada zona, aunque, si se desea,
25 pueden usarse temperaturas menores o mayores, tales como las comprendidas entre los límites aproximados de 25 a 35° C.

El pH del medio durante el proceso se mantiene preferiblemente alrededor de 7 en ambas zonas. Se ha encontrado que el modo más adecuado de lograr esto es añadir al medio amoniaco acuoso según se necesita. Esto puede hacerse mediante adiciones con-
30

243617



tínuas o intermitentes, según se desee.

5 Por la expresión "una especie productora de cobalamina del género Propionibacterium" se entiende una especie o cepa del organismo que puede producir por lo menos dos microgramos, aproximadamente, de cobalaminas (según se determina por Ochromonas malhamensis) por mililitro de medio cuando se desarrolla bajo condiciones de fermentación favorables, por ejemplo una fermentación discontinua en el medio descrito arriba y bajo condiciones microaerobias durante toda la fermentación.

10 Son especies de Propionibacterium que se han encontrado particularmente convenientes para uso en el presente procedimiento, Propionibacterium freudenreichii, P. shermanii y P. technicum, puesto que producen rendimientos elevados de cobalaminas. Tambien se ha encontrado que es adecuado Propionibacterium inter-
15 medium, aunque este organismo puede dar rendimientos algo menores.

La primera zona del procedimiento está constituida convenientemente por una vasija de fermentación en la cual, cuando se comienza el proceso, el organismo productor de cobalamina
20 seleccionado del género Propionibacterium se deja desarrollar en un volumen de medio nutriente bajo condiciones anaerobias, con la adición de nutrientes y líquido controlador del pH, hasta que se consigue el volumen de medio deseado en la vasija. Luego se transfieren continuamente el medio que contiene células
25 desde la vasija a la zona segunda, mientras se continua la adición de nutrientes a la vasija.

Pueden conseguirse condiciones anaerobias en el medio de fermentación en la primera zona del proceso, bien sea haciendo pasar un gas no oxidante, por ejemplo, nitrogeno o dióxido de carbono, a través del medio y/o manteniendo una atmosfera
30

243617

- 2



de uno de estos gases encima del medio. En estas condiciones, puede agitarse el medio sin peligro de introducción de oxígeno en el mismo. Alternativamente, puede mantenerse el medio bajo una atmosfera que contenga oxígeno, sin agitar, o con agitación mínima, únicamente para minimizar el arrastre de oxígeno al medio. Este último método puede ser particularmente adecuado, una vez que ha comenzado la fermentación, puesto que generalmente se produce dióxido de carbono por el organismo y contribuye a mantener condiciones anaerobias en el medio.

10 El método preferido consiste en hacer pasar un gas no oxidante, tal como nitrógeno o dióxido de carbono, a través del medio, y mantener una atmosfera del mismo gas por encima del medio durante todo el proceso.

15 Mientras la fermentación en la primera zona está continuando bajo condiciones prácticamente anaerobias, se añaden nutrientes asepticamente, y preferiblemente de modo continuo al medio en esta zona, para mantener la concentración de nutrientes.

20 Los nutrientes añadidos, que comprenden fuentes de nitrógeno, carbono y cobalto, pueden añadirse por separado, si se desea; pero, es preferible, para mayor facilidad operatoria, añadir estas fuentes en forma de una mezcla que tenga la composición del medio nutriente antes de la fermentación; por ejemplo, en forma de una mezcla que contenga líquido de maceración del maíz en una concentración comprendida entre 200 y 400 miligramos de nitrógeno por 100 mililitros; glucosa o lactosa en una concentración comprendida entre 8 y 12 gramos de carbohidrato por 100 mililitros; y cobalto en una concentración comprendida entre los límites aproximados de 2,75 a 5 partes por millón de partes de la mezcla.

25

30

243617



1933

La velocidad con que se hacen pasar los nutrientes a la primera zona del proceso se regula en parte por el volumen deseado de producción de células y medio a partir del proceso y, por el contenido de cobalamina deseado de las células y medio así producido. Pero naturalmente, es fundamental que la velocidad de introducción de nutrientes líquidos en el proceso no pase de la "velocidad de lavado" del organismo; es decir, la cantidad de líquido aplicada no debe mantenerse en una velocidad tal que la concentración de células en el proceso continúe disminuyendo, aunque la velocidad de adición de nutrientes puede variar temporalmente durante la fermentación de tal manera que origine un incremento o disminución temporales en la concentración de células en las vasijas.

La velocidad con que se introducen los nutrientes en la zona se regula también en parte por las condiciones de la fermentación: por ejemplo, temperatura, pH, tipo de medio, cepa o especies de organismo; puesto que estas condiciones controlan la velocidad de desarrollo del organismo. Puede seleccionarse una velocidad conveniente de carga de nutriente por una persona experta en esta técnica, que mantendrá una producción de células y caldo fermentado que contenga la cantidad de cobalaminas deseadas dentro de la producción máxima de cobalaminas por el organismo que se use en cada caso particular, bajo las condiciones particulares de fermentación.

La velocidad de transferencia del medio que contiene células, desde la primera zona a la segunda, depende de la velocidad de adición de nutrientes a la primera zona, y se ajusta de tal manera que el volumen de medio y la concentración de células en la primera zona se mantenga en un nivel prácticamente constante cuando el proceso está en un estado de equilibrio, es

243617



1951

decir, la velocidad de transferencia se iguala con la velocidad de adición de nutrientes y adiciones controladoras de pH a la primera zona.

5 La segunda zona del proceso está constituida convenientemente por una vasija de fermentación en la cual, cuando se inicia el proceso, se transfiere medio que contiene células procedente de la primera zona, hasta que hay presente el volumen deseado para proporcionar el tiempo de retención promedio necesario para las células en la segunda zona. Este puede ser igual al tiempo de retención en la primera zona, o puede ser diferente. Cuando se alcanza este volumen, se retira continuamente medio que contiene células y se pasa a una zona de recuperación, bien sea para la preparación de cobalaminas puras o para la evaporación del medio, para proporcionar concentrados crudos de las cobalaminas.

10

15

La velocidad de remoción del medio que contiene células desde la segunda zona depende en parte de la velocidad de transferencia de medio que contiene células desde la primera zona, y de la velocidad de adición de nutriente y/o líquido controlador del pH a la segunda zona. La velocidad de remoción se ajusta para mantener una concentración prácticamente constante de células y un volumen de medio en la segunda zona del proceso.

20

Pueden añadirse nutrientes a la segunda zona de un modo análogo a las adiciones a la primera zona, junto con un líquido controlador del pH; por ejemplo, amoníaco acuoso. No obstante, pueden añadirse nutrientes a la primera zona en concentración tal que se pasen nutrientes no fermentados suficientes a la segunda zona para que sea innecesaria una nueva adición de nutrientes a esta zona.

25

El medio fermentado se pone en contacto con oxígeno en la

30



segunda zona del proceso para obtener rendimientos elevados de cobalaminas.

5 Cuando el medio se pone en contacto con oxígeno o un gas que contenga oxígeno en esta zona, se prefiere realizar esto de tal modo que se mantengan en el medio condiciones microaerobias mejor que aerobias, ya que la oxigenación excesiva tiene tendencia a disminuir el rendimiento de cobalaminas.

10 Pueden obtenerse las condiciones deseadas haciendo pasar un gas que contenga oxígeno, tal como aire, a través del medio, a una velocidad muy pequeña, si se utiliza un dispositivo de aireación eficaz, tal como un diafragma o una placa sinterizada de diámetro grande, o a una velocidad algo mayor, si se utiliza un dispositivo de aireación menos eficiente, tal como un tubo abierto o regadera anular. Si se agita el medio, puede ser suficiente
15 una velocidad menor de flujo gaseoso. Por ejemplo, en una zona no agitada sobre una escala de 36.320 litros, la aireación del medio pasando de 0,01 a 0,1 volúmenes, aproximadamente, de aire, por volumen de medio, por minuto, a través del medio, desde una regadera anular, es adecuada para proporcionar elevados rendimientos de cobalaminas.
20

La velocidad de flujo más conveniente del gas que contiene oxígeno dependerá, por lo menos en parte, del tipo de dispositivo a través del cual pase el oxígeno o el gas que contiene oxígeno al medio y de si se agita el medio. Esto puede determinarse
25 se fácilmente variando la velocidad de flujo gaseoso y analizando las cobalaminas en el producto fermentado.

Un método alternativo para conseguir el contacto del medio con oxígeno consiste en agitar vigorosamente dicho medio bajo una atmósfera de un gas que contenga oxígeno. De esta manera, el gas
30 penetra en el medio por la agitación y se distribuye íntimamente



por todo él. El grado de oxigenación dependerá de la velocidad de agitación y de la disposición de las paletas del agitador que pueden variarse según se necesite.

Las cobalaminas, por ejemplo cianocobalamina, pueden recuperarse a partir del medio que contiene células retirado de la segunda zona del proceso, separando las células bacteriales del líquido fermentado, tratando las células separadas con ácido acuoso para liberar las cobalaminas y purificando después las cobalaminas obtenidas por extracciones alternadas en soluciones orgánicas y acuosas. Si se necesitan las cobalaminas sólidas, pueden obtenerse por precipitación de solución acuosa mediante adición de un no-disolvente, tal como acetona.

Si se necesitan únicamente cobalaminas impuras, por ejemplo como suplementos para piensos, entonces puede secarse el producto fermentado y utilizarse en esta forma.

Estos procesos de recuperación pueden realizarse de modo continuo o discontinuo, si se desea.

Aunque es preferible realizar el proceso de la presente invención como proceso sustancialmente continuo, es decir, por adición continua de nutrientes y separación continua del medio que contiene células conteniendo cobalaminas, está dentro del alcance de la invención la adición de nutrientes y la remoción de medio que contiene células de modo intermitente. Análogamente, pueden hacerse pasar células y medio parcialmente fermentado desde la primera zona a la segunda, de modo continuo o intermitente según se desee.

Ejemplo 1

Se monta una fermentación que comprende dos vasijas de fermentación interconectadas, disponiendo la primera vasija de recur-



243617

5 sos para la carga continua de nutriente líquido de líquido de ma-
ceración de maíz (equivalente a 315 mg. de nitrógeno/100 ml. de
medio), glucosa, (10 gramos por 100 mililitros de medio) y cobal-
do (2,75 partes por millón de partes de medio) como cloruro de
cobalto. Se proporciona también a ambas vasijas de fermentación
una carga separada de solución de amoníaco acuoso para controlar
el pH de la fermentación.

10 Al comienzo de la fermentación se agrega a la primera va-
sija de fermentación medio nutriente estéril que tiene la misma
composición que la carga de nutriente indicada arriba, y se siem-
bra el medio con un cultivo de Propionibacterium freudenreichii.
Después se deja que el organismo se desarrolle durante 100 horas
a 30° C. Durante este tiempo, se mantiene el pH de la fermenta-
ción entre 6,7 y 7,0, mediante adiciones de amoníaco acuoso, se-
gún se necesite.

15 Al final del periodo, se comienza una carga continua de
medio nutriente según se ha descrito arriba, a la velocidad de
1/25 del volumen en la primera zona, por hora. Se añade también
amoníaco acuoso, cuando sea necesario, para controlar el pH.

20 El medio de fermentación se agita mecánicamente en presen-
cia de aire por encima del medio, para proporcionar condiciones
microaerobias en el medio contenido en esta vasija.

25 Cuando la fermentación ha alcanzado el volumen deseado,
se deja que rebosen continuamente hasta una segunda vasija de
fermentación, medio nutriente parcialmente fermentado y células.

 Esta vasija está provista de agitación mecánica y se airea
a razón de 5/6 del volumen de fermentación, por minuto, a tra-
vés de un tubo abierto en el extremo.

30 Cuando el volumen de la segunda vasija alcanza el mismo
nivel que la primera vasija, se deja que rebosen continuamente

243617



medio parcialmente fermentado y células, y se recoge este material.

5 No se proporcionan cargas de nutriente fresco a la segunda vasija, aunque se mantiene el control del pH por adiciones de amoníaco, según sea necesario, entre los límites de 6,7 y 7,0.

10 Los analisis del contenido de cobalamina del medio parcialmente fermentado y las células que pasan desde la primera vasija de fermentación a la segunda y los del medio y células que rebosan desde la segunda vasija de fermentación, se realizan usando Ochromonas malhamensis (como hay iones cianuro, en el metodo de ensayo utilizado los resultados se expresan como contenido de cianocobalamina (vitamina B₁₂). Las cifras que se dan en la tabla 1 (caso 1) corresponden a las de condiciones de equilibrio establecidas en la fermentación (como se muestra por 15 los resultados constantes de los análisis y las concentraciones constantes de glucosa durante el periodo de ensayo).

20 Las condiciones de fermentación se cambian luego pasando una corriente lenta de nitrogeno sobre el medio de fermentación contenido en la primera vasija de fermentación para proporcionar condiciones anaerobias en dicha vasija. Las demás condiciones permanecen inalteradas en ambas fermentaciones. Se realizan analisis como se ha descrito arriba y los valores obtenidos cuando se establecen de nuevo las condiciones de equilibrio se dan en la tabla (caso 2). 25

30 Se pasa entonces una corriente lenta de nitrogeno sobre el medio nutriente en fermentación contenido en la segunda vasija de fermentación, además de a la primera vasija, y se para la aireación en la segunda vasija, proporcionando así condiciones sustancialmente anaerobias en ambas vasijas. Luego se realizan

243617



los análisis. Los valores obtenidos cuando se establecen condiciones de equilibrio, se dan en la tabla 1 (caso 3).

Por las cifras de los ensayos que figuran en la tabla, puede verse claramente que hay un incremento considerable en la producción de cobalaminas (calculadas como cianocobalamina) por el proceso de la presente invención (caso 2) cuando se compara con los otros procesos descritos.

Tabla 1

	Condiciones de fermentación		<u>Resultados de análisis</u> (Cianocobalamina, g/ml.)	
	Vasija 1	Vasija 2	Vasija 1	Vasija 2
15	1. Agitada como se describe bajo atmosfera de aire.	Agitada como se describe con aireación	2,2	3,1
	2. Agitada como se describe bajo atmosfera de nitrogeno.	Agitada como se describe con aireación	0,5	9,0
20	3. Agitada como se describe bajo atmósfera de nitrogeno.	Agitada como se describe sin aireación y bajo atmosfera de nitrogeno.	0,9	1,8

Ejemplo 2

Se establece fermentación y se hace operar como se ha descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que se varían las condiciones de fermentación según se describe más adelante.

Quando se variaba una de las condiciones, continuaba la fermentación bajo estas condiciones hasta que se establecía el equilibrio, como se demuestra por los resultados constantes de los análisis y el consumo de glucosa. Las cifras que se dan en la



tabla 2, más adelante, son el promedio de un gran número de resultados analíticos obtenidos durante el periodo en que se habían establecido condiciones de equilibrio.

Condición A

5

La velocidad de alimentación nutriente a la primera vasija se mantuvo en 0,03 del volumen de esta vasija, por hora, y esta condición se mantuvo durante 164 horas después de haberse establecido condiciones de equilibrio en la vasija.

10

Condición B

La velocidad de alimentación nutriente a la primera vasija se redujo a 0,025 del volumen de esta vasija, por hora, y esta condición se mantuvo durante 170 horas después de haberse establecido condiciones de equilibrio en las vasijas.

15

Por los resultados de la tabla 2, se verá que la variación de la velocidad de alimentación nutriente dentro de estos límites ejerce poca influencia sobre la concentración de cobalaminas en el medio que contiene células retirado de la segunda vasija, aunque la velocidad de flujo bajo la condición A fué rápida que bajo la condición B.

20

Condición C

La velocidad de alimentación nutriente se redujo de nuevo a 0,015 del volumen de la primera vasija, por hora, y la velocidad de aireación a la segunda vasija se redujo a 0,1 volúmenes de aire por volumen de medio, por minuto. Se mantuvieron condiciones de equilibrio durante 84 horas antes de hacer nuevas variaciones.

25

Se verá, por la tabla 2, que no se producen cambios marcados en la concentración de cobalaminas en el medio que contiene células retirado de la última vasija, como consecuencia de esta

30

243617



variación, aunque la velocidad de flujo fué menor que bajo las condiciones A o B.

Condición D.

5 La velocidad de alimentación nutriente a la primera vasija se mantuvo como en la condición C. Se aumentó la velocidad de aireación a la segunda vasija a 0,3 volúmenes de aire por volumen de medio, por minuto.

10 Una alimentación nutriente de líquido de maceración del maíz únicamente se comenzó a la segunda vasija, a una velocidad aproximadamente 1/10 de la de alimentación a la primera vasija. El volumen de medio en la segunda vasija se aumentó en 1/10, teniendo en cuenta la carga de líquido de maceración de maíz a esta vasija, para proporcionar la misma velocidad de flujo de la segunda vasija, como en la condición C indicada arriba.

15 Por la tabla 2, se verá que la concentración de cobalaminas en el medio que contiene células retirado del proceso, aumenta por la adición de líquido de maceración de maíz a la segunda vasija.

20 Condición E

La velocidad de alimentación nutriente a la primera vasija se aumentó a 0,035 del volumen de la vasija, por hora.

25 Se aumentó la velocidad de aireación a la segunda vasija a 0,3 volúmenes de aire por volumen de medio, por minuto, pero el volumen de medio en esta vasija se aumentó otra vez en una mitad, proporcionando así un incremento análogo en el tiempo de retención promedio de las células en la segunda vasija.

Se verá, por la tabla 2 que, en estas condiciones, la concentración de cobalaminas en el medio que contiene células retirado del proceso disminuye ligeramente en comparación con la condi-

ción A.

243617-2016



Tabla 2

Condición	Velocidad de alimentación nutriente a la primera vasija (volumen de vasija/hora).	Concentración de cobalamina en la primera vasija (g/ml.)	Concentración de cobalamina en el medio retirado de la segunda vasija /ml)	
5	A	0,03	0,3	8,3
	B	0,025	0,4	8,9
	C	0,015	0,5	8,2
10	D	0,015	0,4	12,4
	E	0,035	0,4	7,7

Ejemplo 3

15 Se montó una fermentación en dos fases según se ha descrito en el Ejemplo 1, utilizando un medio análogo y cepa de Propionibacterium freudenreichii en la que el medio contenido en la primera vasija se fermentaba en condiciones anaerobias y en la segunda vasija bajo condiciones microaerobias, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

20 Inicialmente, se mantenían ambas vasijas a 30° C., y el contenido de cobalamina del medio en la primera y en la segunda vasijas, se determinaba cuando se habían establecido las condiciones de equilibrio en cada vasija.

25 Después se cambiaba la temperatura de las vasijas a 35° C., y se determinaba nuevamente el contenido de cobalamina del medio en cada vasija cuando se habían vuelto a establecer condiciones de equilibrio.

Se repetía después el proceso manteniendo la temperatura de las vasijas a 25° C.

30 Los resultados de los análisis en cada caso se dan en la



- 21

tabla 3:

43617

Tabla 3

Temperatura de la 1ª y 2ª vasijas	1ª vasija Cianocobalamina	2ª vasija Cianocobalamina (g/ml.)
30° C	0,8	9,8
35° C.	0,4	8,1
25° C.	0,6	7,4

Ejemplo 4

Se montó una fermentación en dos fases, como se ha descrito en el Ejemplo 1, pero usando el siguiente medio nutriente:

Micelio penicillium autolizado
(autolizado durante 14 días a
37° C.)

= 430 mg. nitrógeno por 100
ml. de medio.

Glucosa (anhidra, esterilizada
por separado)

= 10 gr. por 100 ml. de me-
dio.

Cloruro de cobalto

= 2,75 partes por millón,
como cobalto.

Se proporcionó una alimentación continua de este medio a la primera vasija a razón de 1/30 del volumen del medio en la primera vasija, y se realizó la fermentación en la primera vasija bajo condiciones anaerobias, y en la segunda vasija, bajo condiciones microaerobias, según se describe en el ejemplo 1.

Quando se habian establecido condiciones de equilibrio en las vasijas, se analizaba el contenido de cobalamina del medio en cada una de ellas.

Luego se cambiaban las condiciones de fermentación en la primera vasija a condiciones microaerobias, agitando y haciendo pasar aire a través del medio en esta vasija, a la velocidad de

243617 - 200



1/3 volúmenes, por volumen de medio, por minuto.

El contenido de cobalamina del medio en cada vasija se analizaba nuevamente cuando se habían establecido condiciones de equilibrio, a modo de comparación con el proceso de la presente invención. Los resultados de estos análisis se dan en la tabla 4.

Tabla 4

Condiciones de fermentación		Resultados de los análisis (Cianocobalamina g/ml.)	
Vasija 1	Vasija 2	Vasija 1	Vasija 2
Anaerobias	Microaerobias	0,6	12,2
Microaerobias	Microaerobias	2,8	4,0

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña el 13 de Septiembre de 1.957, con el número 28839/57 se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto 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 ler. Certificado de Adición en España, son los siguientes:

1º.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente Principal nº 242.240, por "Un procedimiento continuo para la producción de cobalaminas" que comprenden fermentar un medio nutriente líquido adecuado, bajo condiciones sustancialmente anaerobias, con

243617



una especie productora de cobalamina del género Propionibacterium, en una primera zona y mientras se añaden nutrientes a esta zona hacer pasar medio que contiene células desde la primera zona a una segunda zona, a una velocidad tal que se mantengan la concentración de células y el volumen de medio en la primera zona sustancialmente constantes; poner en contacto el medio que contiene células en la segunda zona con oxígeno mientras se retira medio que contiene células, conteniendo cobalaminas, desde la segunda zona, a una velocidad tal que se mantengan la concentración de células y el volumen de medio en la segunda zona sustancialmente constantes y, posteriormente, concentrar o recuperar las cobalaminas contenidas en el medio que contiene células retirado de la segunda zona.

2º.- Mejoras según se reivindican en la reivindicación 1, según las cuales el medio nutriente líquido en la primera zona contiene líquido de maceración del maíz en una concentración superior a 140 mg. de nitrógeno por 100 ml. de medio y un carbohidrato asimilable superior a 5 gramos por 100 ml. de medio.

3º.- Mejoras según se reivindican en la reivindicación 2, según las cuales el carbohidrato asimilable es glucosa o lactosa.

4º.- Mejoras según se reivindican en la reivindicación 3, según las cuales el medio nutriente líquido en la primera zona contiene líquido de maceración de maíz en una concentración suficiente para proporcionar nitrógeno entre los límites aproximados de 200 a 400 mg. por 100 ml. de medio y glucosa en una concentración entre los límites aproximados de 8 a 12 gramos por 100 ml. de medio.

5º.- Mejoras según se reivindican en cualquiera de las reivindicaciones anteriores según las cuales la especie produc-



243617 - 2 OCT 5
tora de cobalamina del género Propionibacterium es Propionibac-
terium freudenreichii, Propionibacterium shermanii o Propionibac-
terium technicum.

5 6º.- Mejoras según se reivindican en cualquiera de las reivindicaciones anteriores según las cuales se mantienen condiciones sustancialmente anaerobias en la primera zona, realizando la fermentación en esta zona bajo una atmosfera de un gas no oxidante, tal como nitrogeno o dióxido de carbono.

10 7º.- Mejoras según se reivindican en cualquiera de las reivindicaciones anteriores según las cuales el medio en la segunda zona se pone en contacto con oxígeno haciendo pasar oxígeno o un gas que contenga oxígeno, por ejemplo, aire, a través del medio contenido en la segunda zona.

15 8º.- Mejoras según se reivindican en la reivindicación 7, según las cuales se hace pasar aire a través del medio en la segunda zona, a una velocidad comprendida entre los límites de 0,01 y 0,1 volúmenes, por volumen de medio, por minuto.

20 9º.- Mejoras según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, según las cuales el medio en la segunda zona se pone en contacto con oxígeno, agitando mecánicamente el medio en la segunda zona bajo una atmosfera de oxígeno o un gas que contenga oxígeno, tal como aire.

25 10º.- Mejoras según se reivindican en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según las cuales la fermentación se realiza a una temperatura de unos 30º C.

11º.- Mejoras según se reivindican en cualquiera de las reivindicaciones anteriores según las cuales el pH del medio en las zonas se ajusta por adiciones de amoníaco.

30 12º.- Mejoras según se reivindican en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según las cuales el pH del medio

243617.2



en las zonas se mantiene entre 6, 5 y 7,5, aproximadamente.

13º.- Mejoras según se reivindicán en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según las cuales se añade a la segunda zona una fuente de nitrógeno asimilable.

5 14º.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal número 242.240.

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

10 Esta Memoria consta de veintiuna hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, - 2 OCT. 1958

P. A.

[Handwritten signature]
Alberto G. Cárdenas