



254882

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

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE COBALAMINA", a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE. Société Anonyme, domiciliado en BASILEA (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un procedimiento para la producción de cobalamina por fermentación con bacterias del ácido propiónico de un medio que contenga hidratos de carbono, aminoácidos y sales nutritivas, invento caracterizado particularmente por el empleo de *Propionibacterium shermanii* Cepa 33 como microorganismo específico.

El *Propionibacterium shermanii* Cepa 33 puede obtenerse a base de cuajo de leche o requesón de la manera siguiente:

10. Cultivo de enriquecimiento: En cada uno de una serie



de tubos de ensayo, se mezcla 1 g de leche cuajada (cuyas diversas porciones tienen varios orígenes) con 10 cc de un medio nutritivo que tenga la siguiente composición por litro:

5. 10 g de glucosa  
1,5 g de nitrógeno en forma de un proteolizato de caseína  
1 g de nitrógeno en forma de un hidrolizato de ácido caseínico
10. 1,6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
1,6 g de  $\text{K}_3\text{PO}_4$   
0,4 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
10 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
12 mg de  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
15. 4 mg de ácido pantoténico  
0,3 mg de biotina  
5 g de extracto de levadura  
c.s. hasta 1 litro - agua.
20. El pH de la solución se ajusta a 6,8 y se esteriliza el medio en la forma convencional. Se llena cada tubo de ensayo con 10 cc del medio nutritivo y luego se cubre con una delgada capa de aceite parafínico. Se mantienen los tubos de ensayo en un secador completamente evacuado, a 30°C, durante 4 a 5 días y en presencia de una cubeta que contenga solución al 10% alcalina de pirogallol. De este manera se suprime con eficacia la interferencia de otros gérmenes.
25. Cultivo puro: La obtención de un cultivo puro se logra ventajosamente desarrollando el cultivo en cepas profundas (10 cm. de profundidad en el tubo de ensayo) con el uso del mismo medio nutritivo descrito antes, el cual, sin embargo, se soli-
- 30.

254882



- difica con 2% en peso de agar. Cada uno de los diversos cultivos de enriquecimiento descritos antes se introduce individualmente en diluciones crecientes en el agar estéril licuefactado, a 40°C, y se distribuye bien por rotación de los tubos de ensayo. Luego se incuban las muestras individuales en un secador en la manera descrita antes. Se escogen para el aislamiento del material deseado, los tubos de ensayo que no presenten desarrollo excesivo, es decir, los que contienen colonias bacterianas bien separadas. Los tubos escogidos se calientan durante breve tiempo en baño maría para que pueda trasladarse la torta de agar a una cubeta Petri estéril. Se separan con una aguja de platino las colonias individuales que se hallan en el tercio inferior de la torta y que han crecido en condiciones extremadamente cercanas a las anaerobias, y se inoculan a una nueva cantidad del mismo medio empleado antes para obtener el cultivo de enriquecimiento. Los cultivos así obtenidos se cultivan luego en condiciones tan estrictamente anaerobias como sea posible, tal como se ha descrito antes para la obtención del cultivo de enriquecimiento.
5. 10. 15. 20. 25. 30.
- Las diversas muestras así obtenidas se ensayan de manera convencional para determinar su capacidad de producir actividad de vitamina B<sub>12</sub>. Se repite el procedimiento de selección tal como se ha descrito en el párrafo "Cultivo puro".
- Los cultivos puros recién obtenidos no producen al principio mucha fermentación. Solamente después de ulterior cultivo en medio líquido de capa profunda, con mantenimiento de condiciones estrictamente anaerobias, aumenta la capacidad de desarrollo y de fermentación; la producción de vitamina B<sub>12</sub> alcanza entonces un nivel de 15 mg por lo menos por litro de medio de fermentación.

-4- 254882



Otra modalidad de operación que se ha hallado ser deseable para obtener cultivos dotados de gran capacidad de fermentación es la siguiente:

Se inoculan muestras del medio nutritivo vertiendo sobre ellas 10% de su volumen del cultivo puro obtenido como se ha descrito antes. Se extrae el aire del medio por desplazamiento con anhídrido carbónico, a una presión de manómetro de una atmósfera en el recipiente de fermentación. Luego se incuban durante dos días a 30°C. Durante este tiempo la glucosa se agota y el pH desciende hasta 4,5. Se ajusta el pH a 6,6 por medio de solución saturada de carbonato sódico y se agrega 1% en peso de glucosa. La mezcla se efectúa por medio de gas anhídrido carbónico pasado por un filtro estéril de lana de algodón y se distribuye en el medio en forma finamente dividida. La incubación se efectúa durante un ulterior período de dos días a 28°C, manteniendo el medio bajo una presión de anhídrido carbónico de una atmósfera de manómetro. De esta manera se obtiene, finalmente, el cultivo de gran rendimiento de la Cepa 33.

El *Propionibacterium shermanii* Cepa 33 obtenido como se ha descrito antes, posee las siguientes características: las células del cultivo son de forma diploica y se presentan en cadenas cortas dotadas de cuatro miembros a lo sumo. Empleando el medio antes descrito, manteniendo la cantidad inoculada por debajo de 10% aproximadamente, efectuando la fermentación anaeróbicamente en cuanto sea posible, corrigiendo continuamente el pH y agregando azúcar, el tamaño de las células permanece inferior a 0,5 micras. Por otra parte, identificando de acuerdo con el "Manual of Determinative Bacteriology" de Bergey, se hallan todas las características ex-



- puestas en esa obra para el *Propionibacterium shermanii*. La Cepa 33 se distingue particularmente por su fermentación sobremenara satisfactoria, por ejemplo en medio glucósico. Sin embargo, fermenta la lactosa sólo moderadamente y con mucha lentitud, en contraste con las indicaciones para las especies expuestas en la obra referida de Bergey. El *Propionibacterium shermanii* Cepa 33 está depositado en la American Type Culture Collection con el No. 13 673 y se halla disponible en esta colección.
- 5.
10. Las características especiales de la Cepa 33, esto es, su gran capacidad para producir vitamina B<sub>12</sub>, el tamaño de las células bacterianas, que con más pequeñas de lo normal para las especies, y el rápido aumento de grosor de las colonias bacterianas aparecen solamente después de numerosos pasajes por el medio líquido, como se ha expuesto antes.
- 15.
20. Es ventajoso efectuar los procedimientos de fermentación del invento en condiciones anaerobias, a temperaturas de 28° a 32° C aproximadamente, por períodos de diez días a doce días aproximadamente, en un medio estéril que contenga un azúcar asimilable, una mezcla aminoácida obtenida por degradación proteolítica y/o hidrolítica de proteínas, sales nutritivas convencionales, una fuente de cobalto, ácido pantoténico, biotina y 5,6-dimetilbenzimidazol, añadiendo continuamente o de cuando en cuando cantidades adicionales de azúcar y manteniendo el pH entre 6 y 7 aproximadamente. Azúcares especialmente adecuados para ser empleados en este caso son la glucosa, el azúcar invertido y la maltosa. La mezcla aminoácida puede obtenerse de albúminas vegetales o animales, por ejemplo gluten de trigo o de maíz, proteínas de patata o de soja, caseína,
- 25.



- 6 -

214882

albúmina de la sangre, albúmina de pescado y similares.

Terminada la fermentación, la masa bacteriana puede separarse ventajosamente del caldo de fermentación, por centrifugación o filtración y las vitaminas del grupo B<sub>12</sub> contenidas en él pueden aislarse por métodos ya de sí conocidos.

5. Una modalidad, particularmente apropiada para llevar a cabo el invento, comprende (1) la preparación de un medio acuoso de fermentación que contenga de 1% a 2% aproximadamente, en peso de un azúcar fermentable, por ejemplo glucosa, azúcar invertido o maltosa; una mezcla aminoácida obtenida preferiblemente de la caseína, por degradación proteolítica mediante tripsina y por hidrólisis ácida, en una concentración correspondiente a 2,5 g aproximadamente de nitrógeno por litro de medio de fermentación; iones de fosfato, sulfato y cloruro de sodio, de potasio, de magnesio y de hierro, en concentración convencional; un poco de ácido pantoico, biotina y cobalto; todo ello a un pH de 6,6 aproximadamente y habiendo sido esterilizado; (2) inocular el medio con 10% en volumen de un cultivo preparado preliminarmente con 3 a 5 días de anticipación a base de *Propionibacterium shermanii* Ceps 33, en el mismo medio de fermentación que, además, contiene un poco de extracto de levadura; (3) incubar la mezcla a temperaturas de 28° a 30°C aproximadamente, por un período aproximadamente de 10 a 12 días, mientras se mantienen continuamente un porcentaje total en volumen de azúcar de 5 a 8 aproximadamente; (4) algo después del primer tercio del período total de incubación, el agregar 5,6-dimetilbenzimidazol, de preferencia en forma de una solución alcohólica al 70% aproximadamente, has-
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

254882



7. te una concentración de 20 mg aproximadamente por litro de medio de fermentación; (5) el separar la masa bacteriana del medio de fermentación y el suspender en agua la masa bacteriana separada; (6) el ajustar el pH de la suspensión a 6 aproximadamente y el calentar durante unos minutos a temperaturas de 35° a 120°C aproximadamente; y (7) el centrifugar, neutralizar los filtrados de centrifugación combinados, el adsorber sobre carbón activado las vitaminas contenidas en ellos, el eluir las mismas por medio de un alcohol acuoso, de preferencia isopropanol, y el aislar las vitaminas en forma cristalina de los eluidos combinados por procedimientos conocidos ya de por sí. Es conveniente extraer la masa bacteriana con pequeñas cantidades de agua (tres o cuatro veces a lo sumo) hasta que el último extracto esté escasamente coloreado.
10. El caldo de fermentación obtenido de acuerdo con el procedimiento expuesto, puede elaborarse como tal, por métodos conocidos, para proporcionar un concentrado que contiene vitaminas B<sub>12</sub> y es útil, por ejemplo, en la preparación de materias alimenticias. Sin embargo, la masa bacteriana que contiene vitaminas B<sub>12</sub> y se obtiene en la forma que se ha descrito antes, puede también emplearse como tal para los mismos fines.

15. El invento se aclara todavía más con el ejemplo que se da a continuación, el cual tiene por objeto ilustrarlo pero sin limitarlo. Las temperaturas están registradas en grados centígrados.

#### EJEMPLO

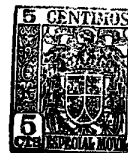
20. Se preparen 10 litros de un medio que contiene los siguientes ingredientes: una mezcla aminoácida obtenida por hidrólisis ácida de caseína, correspondiente a un contenido

- 5 - 254882



- de nitrógeno de 10 g; una mezcla aminoácida obtenida por digestión trípptica de caseína, correspondiente a un contenido de nitrógeno de 15 g; 16 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 16 g de  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ; 4 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 100 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 120 mg de  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 40 mg de ácido pentoténico; 3 mg de biotina; 100 g de glucosa industrial; y agua suficiente para componer el volumen total de 10 litros. Se ajusta el pH a 6,6 se esteriliza el medio y luego se inocula con un litro de un cultivo de *Propionibacterium shermanii* Cepa 33, que se ha desarrollado durante cuatro días a temperaturas de 28-30° en el mismo medio, al que se añaden, sin embargo, 5 g de extracto de levadura por litro.
- Después de la inoculación, se deja fermentar la mezcla, al principio durante dos días a 30° y luego a 28°, mientras que se ajusta el pH a 6,6 diariamente desde el segundo día de la fermentación. Cuando el contenido de azúcar ha disminuído a menos de 0,5%, se añade diariamente solución concentrada de glucosa estéril, para mantener la concentración al 1% en peso del medio. De esta manera se mantiene la fermentación durante diez días. Al quinto día de fermentación, se añade a la mezcla de fermentación 5,6-dimetilbenzimidazol en solución alcohólica al 70%, en una cantidad de 20 mg por litro.
- Después de fermentar durante 12 días, se centrifuga el caldo de fermentación, que ahora, según estimación microbiológica, contiene una actividad vitamínica  $\text{B}_{12}$  de 18,8 mg por litro, con lo que se obtienen 250 g de una masa bacteriana húmeda. Esta última se suspende en un litro de agua, se mezcla la suspensión con 0,1 g de sulfito sódico por litro, se ajusta el pH a 6,0 y se calienta la suspensión durante 15 minutos a 90°. Luego se enfría y centrifuga la suspensión y
5.  
10.  
15.  
20.  
25.  
30.

254882



- se repite el proceso de extracción cuatro veces más con cantidades menores de agua. Se obtiene así un extracto acuoso de color rojo ensarnejado que importe el 20% del volumen del medio primitivo de fermentación. Al extracto se añade  $1\frac{1}{2}$  en volumen de carbón activado y se agita la mezcla durante  $1\frac{1}{2}$  hora. Se centrifuga la suspensión y el adsorbato de carbón así separado se eluye ocho veces, empleando cada vez, durante 10 minutos, una mezcla de 70 volúmenes por ciento de isopropanol, 25 volúmenes por ciento de agua y 5 volúmenes por ciento de benceno, a temperatura de ebullición. De esta manera se obtiene un eluato rojo puro en cantidad correspondiente a 8 volúmenes por ciento del medio primitivo. Por destilación en vacío se concentra el eluato a una décima de su volumen, es decir, a 0,8 por ciento aproximadamente del volumen del medio primitivo.
- 5.
- 10.
- 15.

Este concentrado contiene, determinado por estimación espectrofotométrica, 2,2 mg de vitamina B<sub>12</sub> por cc, correspondiendo, por consiguiente, a 17,6 mg por litro del medio primitivo de fermentación. Prosiguiendo la elaboración de este eluato concentrado, se obtienen 15,3 mg de cobalamina cristalina por litro del medio primitivo.

20.

La invención, dentro de su esencialidad, puede ser desarrollada en otras formas de realización que difieren en detalle de las indicadas a título de ejemplo, a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recibe. Podrá, pues, realizarse con los medios y aparatos más adecuados, por quedar todo ello comprendido dentro del espíritu de las reivindicaciones.

25.

-10- 254889



N O T A

Descrito el invento, se declaran nuevas las siguientes reivindicaciones, con prioridad suiza nº 67 720, del 24 de diciembre de 1.958:

5. 1. Un procedimiento para la producción de cobalamina, que comprende el fermentar un medio nutritivo con *Propionibacterium shermanii* Cepa 33.
10. 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende el fermentar un medio nutritivo con *Propionibacterium shermanii* Cepa 33 en condiciones substancialmente anaerobias.
15. 3. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende el hacer crecer *Propionibacterium shermanii* Cepa 33 en un medio nutritivo que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y cobalto, en condiciones anaerobias y a temperaturas entre 28°C y 32°C aproximadamente.
20. 4. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende el hacer fermentar un medio acuoso que contiene un azúcar fermentable, una mezcla aminoácida y una fuente asimilable de cobalto con *Propionibacterium shermanii* Cepa 33 en condiciones substancialmente anaerobias y a temperaturas entre 28°C y 32°C aproximadamente, mientras se mantiene la concentración del pH entre 6 y 7 aproximadamente, y se mantiene la concentración de azúcar entre 1% y 2% aproximadamente en peso.
25. 5. Un procedimiento para la producción de cobalamina.

254889



Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, la cual consta de once hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras y acompañadas de la documentación correspondiente.

5. Barcelona, para Madrid, 23 Diciembre de 1.959.

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE. Société Anonyme.

p. a.

JAIIME IBERNARDALLES  
F.P.