



Case G.241

343773

343773

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

por "PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO PARA LA PRODUCCION DE LICOPENO", a favor de la firma italiana SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA, residente en MILAN (Italia), Largo G. Donegani 1-2.

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un nuevo procedimiento para la producción de licopeno. Más particularmente, objeto de este invento es un nuevo procedimiento biosintético para preparar el conocido carotenoida licopeno.

- 5. El licopeno está contenido en diversas especies de frutas maduras, y particularmente en el tomate. Fué aislado por primera vez en 1873, en forma de cristales rojos, por Hartsen que lo había obtenido de los frutos del *Tamus communis*. Sin embargo, el nombre de licopeno lo usó por
- 10. primera vez en 1913 Schunk, que reconoció la diferencia

**POOR
QUALITY**



entre el licopeno y el caroteno. El licopeno, que es un colorante de origen natural, se emplea extensamente en la industria alimenticia y en particular en la producción de margarina y de mantequilla (patente inglesa N° 838.925 de la 5. HOFFMANN LA ROCHE).

Más recientemente, a la sociedad norteamericana Miles Laboratories Inc. le ha sido cedida una patente que cubre, junto con el procedimiento, también el uso del licopeno como aditivo a piensos para las aves de corral, 10. para dar color amarillo tanto a su carne como a la yema de los huevos (patente francesa N° 1,333,942).

Se conocían ya de diversos tiempos procedimientos para la preparación del licopeno basados ya sea en su extracción de ciertas frutas que lo contienen, ya sea en 15. procedimientos químicos, ya sea, por último, en la fermentación.

Los procedimientos extractivos, dada la relativa exigüidad del contenido en licopeno de los materiales naturales (20 a 50 mg por kg) resultan antieconómicos.

Los procedimientos químicos, aún permitiendo mayor productividad que los procedimientos extractivos, se desarrollan a través de síntesis complicadas, con numerosos pasos a partir de sustancias relativamente costosas y empleando reactivos inestables, caros y con frecuencia peligrosos, hasta 25. el punto de hacer que toda la síntesis sea poco apta para la escala industrial.

³
343773



60. 1967

Los procedimientos de fermentación son los que más se prestan a una producción de licopeno en escala industrial y los más convenientes económicamente.

- Hace poco, E.J. Swarthout y col. (patente norteamericana Nº 3,097,146 del 9 Julio 1963, invocando prioridad estadounidense del 30 Junio 1961) han descrito un procedimiento que consiste en la fermentación de una asociación de dos cepas de tendencia sexual opuesta, perteneciente al grupo de las mucoríneas (en particular, cepas de la especie
5. Blakeslea trispora) en condiciones aeróbicas y en cultivo sumergido o en superficie.
- 10.

- Este procedimiento, aún constituyendo un progreso técnico respecto a los precedentes, presenta dos desventajas notables. En primer lugar, la productividad del sistema de
15. cepas acopladas es bastante baja (de 30 a 150 gammas/ml) y en segundo lugar la técnica de fermentación resulta notablemente complicada, porque prevé el uso de dos cepas contemporáneamente, lo que dobla la probabilidad de que surjan inconvenientes, como intoxicaciones, degeneraciones de los cultivos, creci-
20. miento asíncrono de las dos cepas, etc., con el consiguiente perjuicio de importancia para la producción.

- Si, en cambio, en el caso de dicho procedimiento en vez de usar dos cepas de la especie Blakeslea trispora en asociación se intenta usar una sola cepa de dicha especie,
25. la productividad desciende en más de una cuarta parte de los

343773



valores medios que se obtienen actuando con las dos cepas en asociación (Ejemplo 7 de la patente citada).

- Ahora se ha descubierto sorprendentemente, y este constituye el objeto del invento que aquí se expone, que
5. empleando solo una nueva cepa del genero *Streptomyces* se obtiene, en las condiciones ordinarias de cultivo sumergido, en matraces agitadas o en fermentadores, licopeno con rendimiento mucho más elevado.

- El nuevo microorganismo empleado en el procedimiento
10. de este invento se ha obtenido por medio de un tratamiento mutágeno del *Streptomyces chrestomyceticus* var. *aurantioideus* descrito en la patente inglesa Nº 1.014,589 de la peticionaria. La nueva cepa resultante se ha designado con el nombre de *Streptomyces chrestomyceticus* var. *rubescens*.

15. El *Streptomyces chrestomyceticus* var. *rubescens*, ha sido depositado en el Instituto of Microbiology de la Universidad Rutgers (EE.UU.), habiendo recibido el número de índice 3910, y en el Commonwealth Mycological Institute de Inglaterra, asignándole el número de índice IMI 126134.

20. El *Streptomyces chrestomyceticus* var. *rubescens*, llamado también cepa 2064 de la colección microbiológica de la Farmitalia, tiene las siguientes características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas.

Característica microscópica

25. En los terrenos de cultivo corrientes, el micelio vegetativo se presenta con hifas delgadas, de 0,5 a 1 micra

343773



de espesor, más o menos largas, ramificadas. Las hifas aéreas son raras y en general rectas, alguna vez incurvadas hasta formar ganchitos. Los conidios van de cilíndricos a ovoides y tienen dimensiones variables: 0,3 - 0,4 por 0,6 a 0,8 micras.

5. Aspecto macroscópico

En la Tabla 1 se resumen los caracteres de cultivo que se han observado en los terrenos que se indican, haciendo crecer el microorganismo a 28°C y realizando las observaciones a los 3, 8, 15, 21 y 30 días de la siembra.

10.

TABLA 1

| Terrenos | Crecimiento | Micelio aéreo | Micelio vegetativo | Pigmentos solubles |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| Agar-patata-glucosa (2) | patina delgada rugosa | escasísimo, blanco rosado | rojo frambuca | ausente |
| 15. Agar Bennett (1) | patina con pliegues muy densos | ausente | rojo cereza | - |
| Agar Emerson (1) | patina liquenosa, abundante | ausente | rojo | - |
| 20. Agar Czapek (1) | velo | ausente | rojo anaranjado | - |



343773

Tabla 1 (continuación)

| Terrenos | Crecimiento | Micelio aereo | Micelio vegetativo | Pigmentos solubles |
|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|
| 5. Agar-aspargarina (1) | pátina abundante fruncida | escasísimo, blanco sucio | Micelio vegetativo | - |
| Agar, almidón y sales de Pridham (3) | pátina delgada rugosa | escasísimo blanco rosado | rojo pardusco | - |
| 10. Agar-avena (2) | pátina opaca, granulada y rugosa | escasísima blanco rosado | rojo obscuro | - |
| 15. Agar-glicerina-aspargarina (1) | pátina rugosa | escasísimo, blanco amarillento | rojo intenso | - |

(1) Preparado según Waksman, "The Actinomycetes", Vol. II, 1961, páginas 328-333.

(2) Preparado según Baldacci y col., "Journal of microbiology" 1961, 9, pág. 39.

20. (3) Preparado según Pridham y col., "Antibiotics Annual", 1956-1957, páginas 947-953.

343773



3 AGO. 1967

Propiedades bioquímicas

Gelatina : hidrolizada

Almidón : hidrolizado

Nitratos : ninguna reducción a nitritos

5. Producción de H_2S : negativa

Tirosina : degradada

Leche : Peptonizada, no coagulada.

Utiliza : trehalosa, d-levulosa, d-sorbita, d-mannosa,
galactosa, lactosa, adonita, d-mannita, maltosa,

10. glicerina, dextrosa, dextrina y almidón.

No utiliza: ramnosa, l-arabinosa, d-xilosa y sacarosa.

Producción: produce licopeno en cultivo líquido sumergido.

Identificación de la cepa

15. La cepa 2064 difiere del Streptomyces chrestomyceticus (patente inglesa Nº 880,035 de la peticionaria; Canevazzi y Scotti, Journal of Microbiology 7, 1959, pág. 242-250) en que no reduce los nitratos, peptoniza la leche, tiene un micelio aéreo mucho más escaso, presenta un micelio vegetativo intensamente pigmentado de rojo y produce licopeno. La

20. cepa 2064 difiere del Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioideus (patente inglesa de la peticionaria, Nº 1,014,589) por el color del micelio vegetativo, amarillo anaranjado en la primera y rojo en el segundo.

25. Tanto por el origen como por sus características no muy diferentes de las del Streptomyces chrestomyceticus,



343773

concluimos en que el microorganismo en examen debe considerarse una variedad del Streptomyces chrestomyceticus y por tanto lo designamos como Streptomyces chrestomyceticus var. rubescens.

5. El Streptomyces chrestomyceticus var. rubescens se conserva mediante liofilización, utilizando como medio de suspensión leche o suero de leche, o bien por recogida y mantenimiento de las esporas en suelo estéril.

10. Además, se conserva también por cultivos sucesivos en un terreno sólido que contenga glucosa, u otro azúcar apropiado, y sustancias nitrogenadas complejas (extracto de levadura, peptona, hidrolizado de caseína).

15. La producción del licopeno se efectúa con los métodos normales ya de sí conocidos y consiste en hacer desarrollar en un terreno de cultivo líquido, previamente esterilizado y en condiciones aeróbicas, el Streptomyces chrestomyceticus var. rubescens, a temperatura variable entre 25 , y 35°C, pero de preferencia a 28°C, por un período de tiempo variable entre 4 y 8 días (de preferencia, 6 días), a pH de 6,5-6,0 en el inicio y de 6,0-5,5 al final del proceso fermentativo.

20. El terreno de cultivo consiste en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una fuente de sales. La fuente de carbono puede estar constituida por almidón, dextrina, glucosa, glicerina, mannita, maltosa, corn steep liquor,
25. solubles de los destiladores, aceite de soja, etc. La fuente



AGO. 36

343773

de nitrógeno puede estar constituida, aparte de las sustancias complejas que contienen nitrógeno, citadas antes, por levadura seca, peptona de carne y caseína.

- Se obtienen también buenos resultados utilizando
5. sales de amonio, como nitrato amónico, sulfato amónico o fosfato diamónico.

Las sales minerales útiles para la producción del licopeno varían según el terreno que se emplee y pueden ser las sales de K, Mg, Fe, Zn o Cu.

10. La fermentación puede realizarse en matraces de Erlenmeyer o en fermentadores de laboratorio o industriales de diversa capacidad.

- La cantidad de licopeno presente en los caldos se determina mediante lectura espectrofotométrica de pequeñas
15. muestras del caldo de cultivo, generalmente de 1 a 2 cc, y la lectura se realiza a 462 milimicras.

- Todo el licopeno producido está contenido solamente en el micelio, mientras que el líquido carece de producto. Por tanto, para el aislamiento del licopeno se separa el micelio
20. por filtración, sola o con ayuda de un material silicioso, del líquido de cultivo, que se desecha. La torta del filtro, que contiene todo el licopeno producido durante la fermentación, se suspende y se agita en un disolvente orgánico de punto de ebullición bajo, como éter etílico, acetona, cloruro de metileno o cloroformo.
 - 25.



343773

Pueden usarse con ventaja mezclas de los disolventes orgánicos citados. Los extractos orgánicos reunidos se evaporan en vacío y el residuo se recoge con éter de petróleo y se cromatografía en columna de anhídrido silícico, eluyendo con

5. una mezcla de éter de petróleo y acetona.

El licopeno bruto así obtenido se purifica por recristalización en éter de petróleo.

Los Ejemplos que siguen sirven para ilustrar el invento, pero sin limitarlo.

10. EJEMPLO 1

Se mantiene la cepa 2064 mediante pasadas sucesivas sobre slant de un terreno de la composición siguiente:

| | | |
|-----|--|---------|
| | Extracto de levadura | 5 g |
| | Glucosa | 10 g |
| 15. | MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,5 g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 1,4 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,4 g |
| | Agar | 25 g |
| | Agua destilada c.s. hasta | 1000 cc |

20. pH antes de la esterilización, 7

Esterilización: a 120°C durante 20 minutos.

Se incuba durante 6 días a 28°C y los cultivos así obtenidos se utilizan para inocular algunos matraces de 300 cc



343773

que contienen cada uno 60 cc del siguiente terreno vegetativo:

- | | | |
|-----|---|-------|
| | Dextrina | 30 g |
| | Cascina | 5 g |
| | CaCO ₃ | 4 g |
| 5. | Corn steep | 3 g |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 g |
| | K ₂ HPO ₄ | 0,1 g |
| | Agua de la fuente c.s. hasta 1000 cc | |
| | pH antes de la esterilización, 6,4 | |
| 10. | Esterilización: a 120°C durante 20 minutos. | |

Se incuba a 28°C durante 26 horas, en un agitador giratorio con 230 vueltas por minuto y 3,5 cm de excentricidad.

- Los cultivos así obtenidos sirven para inocular
15. matraces de 300 cc que contienen cada uno 30 cc de terreno productivo de la composición siguiente:

- | | | |
|-----|---|---------|
| | Almidón | 100 g |
| | Harina de soja | 80 g |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 3 g |
| 20. | CaCO ₃ | 3 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 7,5 g |
| | NaCl | 2,5 g |
| | MgSO ₄ . 7 H ₂ O | 1 g |
| | ZnSO ₄ . 7 H ₂ O | 0,010 g |
| 25. | FeSO ₄ . 7 H ₂ O | 0,010 g |



= 12 =

343773

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,001 g
Agua de la fuente c.s. hasta 1000 cc
pH antes de la esterilización: 5,8
Esterilización: a 120°C durante 20 minutos.

5. Se incuba a 28°C en un agitador giratorio con 230 vueltas por minuto y 3,5 cm de excentricidad. Al cabo de 6 a 7 días, el análisis espectrofotométrico revela la presencia en el caldo de 520 gammas de licopeno por cc.
- En este punto, se añade a la masa de fermentación material silicioso coadyuvante de la filtración y, filtrando, el micelio mezclado a este material se separa de la capa de líquido, que se desecha por no contener licopeno. La torta del filtro se sacude con acetona, sola o en mezcla con cloruro de metileno. Los extractos reunidos se evaporan en vacío hasta sequedad. Se recoge el residuo con éter de petróleo de punto de ebullición bajo y la solución de producto bruto así obtenida se cromatografía en columna de sílice, eluyendo con éter de petróleo que contiene 2% de acetona. Los eluatos, evaporados en vacío hasta sequedad, se recristalizan en éter de petróleo y se obtiene así el licopeno puro, fundente a 170-172°C.
10. 15. 20.

La identidad de este producto se confirma, ya sea comparando su espectro con el espectro de una muestra auténtica de licopeno, ya sea por examen cromatográfico, ya sea por determinación del punto de fusión en mezcla.

25.



343773

EJEMPLO 2

En las condiciones del Ejemplo 1 se efectua una prueba para averiguar la influencia del grado de aireación de los cultivos productivos en la producción de licopeno. Los diversos niveles de aireación se obtuvieron modificando el volumen del terreno productivo en los matraces.

Los resultados figuran en la Tabla que sigue, de la que resulta evidente que la producción de licopeno es directamente proporcional al grado de aireación.

| | Volumen de terreno, en cc | Licopeno producido al ca- bo de 7 días, en gammas/cc |
|-----|------------------------------|---|
| 10. | 20 | 580 |
| | 30 | 490 |
| | 40 | 410 |
| 15. | 50 | 220 |
| | 60 | 45 |

EJEMPLO 3

En las mismas condiciones del Ejemplo 1 se efectua una prueba para averiguar el efecto de la edad de los cultivos sobre el terreno vegetativo que se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados figuran en la Tabla que sigue.



343773

| Edad del cultivo del terreno vegetativo, en horas | Licopeno producido al cabo de 7 días, en gammas/cc |
|---|--|
| 22 | 350 |
| 26 | 530 |
| 30 | 518 |
| 5. 36 | 480 |

EJEMPLO 4

Se realiza la fermentación como en el Ejemplo 1, pero con la diferencia de que en vez de usar el terreno productivo que allí se describe se usa el terreno siguiente:

| | | |
|-----|--|---------|
| 10. | Solubles de los destiladores | 44 g |
| | Levadura seca | 5 g |
| | Corn steep | 3 g |
| | Dextrina | 80 g |
| | MgSO ₄ | 0,5 g |
| 15. | K ₂ HPO ₄ | 0,3 g |
| | FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,010 g |
| | ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,010 g |
| | CuSO ₄ · 5 H ₂ O | 0,001 g |
| | Agua de la fuente c.s. hasta | 1000 cc |

20. pH antes de la esterilización: 6,5

Esterilización: a 120°C durante 20 minutos.

Al cabo de 6 días de fermentación, el caldo de cultivo presenta una concentración de licopeno de 410 gramos/ml.

= 15 =

343773



AGO. 1967

EJEMPLO 5

5. En un fermentador de 10 litros se esterilizan por calentamiento a 120°C durante 40 minutos 6 litros de terreno productivo de la misma composición que el que se ha descrito en el Ejemplo 1. Después del enfriamiento del terreno, se le inocula con 600 cc de un cultivo vegetativo preparado tal como se ha indicado en el Ejemplo 1. Se incuba a 28°C con un grado de aireación correspondiente a una circulación de 6 litros de aire por minuto y con una agitación correspondiente a 380 vueltas de un agitador provisto de seis palas.

10. Al cabo de 6 días de incubación, se obtiene una producción de 450 gammas de licopeno por cc.



343773

REIVINDICACIONES

5 Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones, con prioridad de las solicitud de patente italiana nº 21083/66 del 4 de Agosto de 1966.

10. 1. Procedimiento microbiológico para la producción de licopeno, caracterizado por cultivarse el microorganismo Streptomyces chrestomyceticus var. rubescens en cultivo sumergido o en superficie y en condiciones aeróbicas, en un terreno nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono, de nitrógeno y de sales minerales, en un intervalo de temperatura entre 25º y 35º C, y preferiblemente a 28º C, por un período de tiempo que varía entre 4 y 8 días (de preferencia, 6 días), y por aislarse del micelio y purificarse de manera
15. ya de si conocida el licopeno formado.

2. Procedimiento microbiológico para la producción de licopeno.

20. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 16 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a -3 AGO. 1967.
p.a. JAIME ISERN