

96 JU



Este invento se refiere a medios de fermentación y más particularmente a medios especiales para la fermentación de neomicina.

5 La neomicina es un antibiótico importante para utilizarse en terapéutica y para ciertas aplicaciones industriales. La neomicina es elaborada por ciertos organismos del género *Streptomyces* cuando es hecho crecer en medios de cultivo que contienen carbohidratos, proteínas y sales inorgánicas asimilables. Las exigencias generales para dichos medios de fermentación están descritas por Waksman y otros en la patente USA 2.799.620. Un medio específico de fermentación de neomicina está descrito en la Patente USA 2.957.810 expedida el 25 de octubre de 1.960, en el que se logran concentraciones de neomicina dentro del margen de 6.000 unidades de base de neomicina por mililitro de medio. Este medio consiste en combinaciones de carbohidratos fácilmente asimilables, polisacáridos lentamente asimilables y cantidades restantes de proteínas procedentes de la harina de soja.

10

15

20 En general, se ha encontrado que la cantidad de carbohidrato en el medio limita el rendimiento de neomicina que puede ser cosechado desde dicho medio. Según aumentan las cantidades de carbohidrato, aumenta proporcionalmente la viscosidad del medio. Más allá de una concentración de 7 % de almidones, que son el manantial más barato, el medio se convierte en un gel semisólido y se requieren cantidades inmoderadas de energía para efectuar una agitación apropiada en dicho medio. Además, según aumenta la viscosidad del medio, la transferencia de calor por convección es limitada, y es difícil esterilizarlo.

25

30

16 JUN



lizar dichos medios antes de sembrar con el organismo de cultivo, Otra desventaja con dichos medios muy concentrados, ya que se utilizan principalmente en procedimientos de fermentación profunda, es la extremada dificultad de -
5 airear estos grandes depósitos de material viscoso sin -- excesivo borboteo y sin grandes volúmenes de gases ocluídos dentro del medio. La aireación en dichos medios viscosos es extremadamente ineficaz, y el volumen de los recipientes de fermentación es mal utilizado.

10 Un objeto de este invento es el de crear - medios de fermentación de neomicina que pueden ser fermentados para producir altas concentraciones de neomicina.

15 El presente invento está basado en el descubrimiento de que es posible fermentar neomicina en un medio en el que el almidón es el principal o el único nantial de carbohidrato asimilable, y en que el almidón está presente en cantidades superiores a 7 % en peso. Para realizar el objeto de este invento, el almidón es --
20 terado por la acción de un grupo específico de alfa-amilasas de acción rápida y estables térmicamente, que reducen la viscosidad de la suspensión de almidón y solubilizan - el almidón sin degradarlo o monosacáridos y disacáridos.

25 Se puede utilizar en la práctica de este invento, cualquiera de los almidones comerciales, tales - como almidones no modificados incluyendo almidón de tapioca, fécula de patata, fécula de maíz, harina de maíz desgerminada, amioca, almidón de trigo, almidón de sagú, -
30 arroz y almidón de arroz. También se pueden utilizar almidones que han sido modificados desde su estado natu- -



ral; incluyendo estos carboximetil-almidones "amila-
ceos de ebullición en capa delgada", almidones resis-
tentes a los ácidos y dextrinas. También se pueden utilizar
gomas en calidad de manantiales totales o parciales de --
5 carbohidratos para esta fermentación. Otros manantiales
no carbohidratados para algo del carbón para el medio de
fermentación pueden ser grasas tales como aceite de mante
ca de cerdo. Estos son útiles frecuentemente en pequeñas
cantidades ya que ayudan a controlar la formación de es--
10 puma durante la aireación del medio de fermentación.

En general, el manantial de proteínas y --
la cantidad de proteínas presentes en el medio no son --
críticos con la condición de que esta cantidad no se con-
vierta en un factor limitativo del metabolismo del organig
15 mo de fermentación. Se ha encontrado que la cantidad de
proteínas puede oscilar desde 30 % en peso de la cantidad
de carbohidrato hasta una cantidad igual o superior al pe
so del carbohidrato presente en el medio. Hasta 25 % de
la cantidad de nitrógeno proteínico necesario para la fer
20 mentación puede ser reemplazado por nitrógeno orgánico o
inorgánico de una naturaleza no proteínica. Los manantia
les de nitrógeno no proteínico orgánicos pueden derivarse
de urea y de aminas y amidas apropiadas. El nitrógeno --
inorgánico puede derivarse de nitratos y de sales de amo
25 nio. Entre los manantiales proteínicos pueden mencionarse:
Productos solubles de destilería, levadura de cerve
cero, extractos de carne de vaca, proteína de soja, pepto
na de soja, caseína, hidrolizados de caseína, harina de --
pescado, y los diversos residuos que contienen proteínas
30 del envasado de carne y del envasado de pescado. Otros --



manantiales útiles de proteínas son los concentrados de líquido de maceración de maíz.

Las sales inorgánicas que son útiles para los medios, distintas de las sales de amonio y de los nitratos mencionados como manantiales de nitrógeno, son cloruros, sulfatos, fosfatos y carbonatos, y los diversos iones metálicos que se necesitan para el crecimiento microbiano, tales como calcio, potasio, magnesio y los metales en muy pequeñas cantidades que incluyen cobalto, hierro, zinc y molibdeno.

Las enzimas que son el ingrediente crucial de este medio de fermentación son preferiblemente las alfa-amilasas estables térmicamente de acción rápida que convierten al almidón en polisacáridos solubles durante su etapa de gelatinización. La etapa de gelatinización es la etapa en la que los granos de almidón se hidratan y se hinchan con agua para formar los típicos geles de almidón viscosos. Las enzimas útiles en la práctica de este invento hidrolizan el gel de almidón antes de que esté completa la etapa de gelatinización, de manera que el medio jamás se convierte en el gel semisólido viscoso que es tan típico de las suspensiones de almidón hidratado que contienen más de 7 % en peso de almidón. Estas enzimas son el grupo de alfa-amilasas derivadas de bacterias ofrecidas comercialmente por Wallerstein Laboratories bajo el nombre de "RATIDASE"; por Rohm and Haas bajo el nombre de RHOZYME H-39; por Miles Chemical Company bajo el nombre TAKAMINASE HT-44 y 440 y que son vendidos en Europa por Novo Industri A/S en forma de Bacterial Amylase Novo y bajo las marcas comerciales TERMOZYME Y AQUAZYME.

16 JUN 1969

Estas enzimas son todas activas en los márgenes de pH de trabajo de 5 a 8 y a temperaturas de hasta 95° C. Son máximamente activas en el margen de temperaturas entre 50 - y 80° C. Se ha encontrado que estas enzimas convierten -
5 suspensiones de almidón sin completa gelatinización a una forma soluble, durante el tiempo que se necesita para elevar la temperatura de las suspensiones contenidas en recipientes de fermentación hasta las temperaturas de esterilización utilizadas normalmente para esterilizar el medio antes de la inoculación.
10

El presente invento favorece específicamente la utilización de alfa-amilasas que licuan el almidón estables térmicamente y de acción rápida a partir de m---
15 nantiales bacterianos, fungicos, animales o cereales. -- Las otras amilasas resulta que requieren un substrato de almidón completamente gelatinizado. Este es el estado -- que se evitará por la utilización de la alfa-amilasa de -- acción rápida. Una ventaja adicional de las alfa-amila--
20 sas derivadas de bacterias preferidas es que éstas tienen una buena estabilidad térmica y que continúan su actividad en los medios cuando estos son calentados para la esterilización, es decir, son elevados hasta un punto en -- que toda la acción microbiana es eliminada, antes de la -- inoculación con el deseado organismo generador de neomici--
25 na.

Se ha encontrado también que la utilización de estas alfa-amilasas impide la descomposición del medio para formar cantidades sustanciales de azúcares tales como maltosa, glucosa y otros azúcares. Se ha encontrado que dichos monosacáridos y disacáridos, cuando es--
30

tán presentes en cantidades sustanciales, tienden a afectar al color de la neomicina obtenida. La neomicina tiende a ser de color tostado en lugar de blanco. Los rendimientos de neomicina en los presentes medios de almidón modificado son menores en la presencia de cantidades sustanciales de azúcares, a saber mayores de 1 %.

El pH del medio deberá estar dentro del margen de 4 a 9. Parece que las alfa-amilasas preferidas de este invento actúan con la máxima rapidez y con la máxima eficacia dentro de este margen. Tienen una actividad máxima dentro del margen de 5,0 a 8,0. Después de la esterilización cuando la enzima es destruída, el pH del medio deberá estar dentro de este margen.

Resulta que la cantidad de enzima requerida no es crítica siempre que esté presente al menos 0,01 % en peso de enzima, basado en el peso del carbohidrato de almidón. Parece que la cantidad óptima depende en cierto grado de la superficie de los recipientes expuestos al medio. En matraces de agitación, se ha encontrado que se logran buenos rendimientos cuando hay presente aproximadamente 0,2 % de enzima. En fermentadores de 240 y 2.400 litros, se requiere menos enzima, y es adecuado 0,1 % para lograr buenos rendimientos. En el caso de recipientes mucho mayores, es decir dentro del margen de 40.000 a 200.000 litros, se ha encontrado que se obtienen buenos rendimientos cuando la concentración de las enzimas está dentro del margen de 0,02 a 0,04 % del peso del almidón, que oscila de 7 a 14 % del peso de la carga. Es suficiente una cantidad tan pequeña como 0,01 %, basado en el peso del almidón, para solubilizar hasta 11 %



de fécula de patata o de harina de maiz desgerminada.

La alfa-amilasa se diferencia de la beta-amilasa, que hidroliza los almidones gelatinizados o azúcares monosacáridos y disacáridos, tales como sacarosa, maltosa, glucosa, fructosa y lactosa. Las alfa-amilasas, aunque son de acción rápida, no descomponen los polisacáridos complejos a azúcares en ninguna cantidad apreciable (menos de 1 %) sino solamente a unidades de cadena menores que son solubles en agua y cuyas soluciones tienen bajas viscosidades.

Aunque el invento, tal como se describe específicamente aquí, está dirigido a la utilización de almidón modificado con alfa-amilasa sustancialmente como el único manantial de polisacáridos asimilables en el medio nutriente, en sus aspectos genéricos el invento está dirigido al método de aumentar los rendimientos de neomicina obtenidos por la fermentación aerobia sumergida de un organismo productor de neomicina, ordinariamente un hongo del género *Streptomyces*, que comprende la fermentación en un medio de fermentación sustancialmente libre de monosacáridos y disacáridos y que contiene inicialmente más de 5 % de una dextrina asimilable. El término "sustancialmente libre de monosacáridos y disacáridos" significa menos de 1 %, preferiblemente menos de 0,5 %, y lo más deseablemente no más de 0,25 %. La concentración de la dextrina asimilable es, inicialmente, preferiblemente al menos de 7 % (calculado con relación al medio líquido total) y, más deseablemente, al menos de 9 % (por ejemplo de 11 % o más). La dextrina asimilable puede ser almidón hidrolizado con ácido o con enzima, siempre que el produc

15 JUL 1969



to esté sustancialmente libre de monosacáridos y disacáridos. La combinación de cantidades despreciables de monosacáridos y disacáridos y la alta cantidad de dextrina da como resultado, inesperadamente, rendimientos de neomicina grandemente aumentados. El rendimiento de neomicina - aislada es mucho mayor, igual que la pureza y otras propiedades mejores de la neomicina que cuando se obtiene -- por técnicas de aislamiento convencionales.

El invento será descrito más específicamente en los siguientes ejemplos, que se pretende que ilustren métodos de trabajar dentro del alcance de este invento sin limitar de ninguna manera cualquiera de los aspectos generales ni modificar las ventajas peculiares derivadas de trabajar dentro de su alcance.

Ejemplo 1.-- Se preparó un medio nutriente con la siguiente composición:

	Harina de soja	2%
20	Proteína de semilla de algodón	1%
	Glúten de maíz	1%
	Sulfato de amonio	1%
	Fécula de patata	9%
	Carbonato de calcio	1%
25	Alfa-amilasa bacteriana (RAPIDASE)	0,2%

Este medio fué mezclado, fué subdividido en matraces y fué esterilizado por ebullición. En el tiempo en que el medio hubo alcanzado una temperatura de



90° C, se había solubilizado la cantidad total de almi-
 dón. En ningún momento superó la viscosidad del medio --
 a las viscosidades que se encontraron normalmente con con-
 centraciones de 5 % de medios de azúcar (cerelesa). La
 5 cromatografía en papel mostró menos de 1 % de azúcares. --
 Después que el medio fué esterilizado, éste fué inoculado
 con organismos productores de neomicina. La tabla si- --
 guiente ilustra el efecto del tiempo de fermentación so-
 bre la potencia del caldo de cultivo de fermentación, ex-
 10 presada en forma de microgramos de base de neomicina por
 mililitro de medio.

	<u>Tiempo</u>	<u>Potencia (mcg de ba- se/ml)*</u>
15	72	2,620
	96	4,960
	120	7,880
	144	10,580
20	168	14,350

(*) Todos los análisis de potencia de neomicina se reali-
 zaron en este caso por el procedimiento descrito en --
 U.S.P. XVI página 863-864 (método de cilindro y placa).

25 Ejemplo 2.-- La utilización del medio del
 ejemplo 1, pero variando el contenido de almidón, dió co-
 mo resultado las siguientes potencias de caldo de culti-
 vo de neomicina al final de 144 horas.

30



	<u>FECULA DE PATATA % (en peso/volumen)</u>	<u>POTENCIA DE CALDO DE CULTIVO (Ucg de base/ml)</u>
	5%	7,600
	7%	9,000
5	9%	11,000
	11%	10,700

10 Como testigo, los mismos medios utilizando 5 % de carbohidratos de azúcar (cerelosa) en el mismo periodo de tiempo, produjeron una potencia máxima de caldo de cultivo de 5.000 microgramos por ml de base.

15 Ejemplo 3.- Se repitió el medio del Ejemplo 1 pero se sustituyó por otra alfa-amilasa (Rhozyme-H-39) de otro fabricante. El rendimiento y la velocidad de formación de neomicina fueron comparables a los obtenidos en el Ejemplo 1.

20 Ejemplo 4.- Se preparó un medio nutriente de la siguiente composición.

	<u>INGREDIENTES</u>	<u>% en peso/volumen</u>
25	Harina de maiz molida (60-70% de almidón)	11
	Harina de soja	2,5
	Levadura de cervecero	0,25
	CaCO ₃	0,2
30	Sulfato de amonio	0,5



INGREDIENTES

% en peso/volumen

	Sales de potasio (cloruros y fosfatos)	0,45
5	Agente antileepumante	0,05
	Alfa-amilasa bacteriana	0,1

Los ingredientes fueron combinados con --
10 agua en un fermentador de 240 litros y el medio fué calen-
tado hasta las temperaturas de esterilización por la in-
troducción de vapor vivo. El medio permaneció fluido y --
no requería, para agitar, ningún exceso de energía por --
encima de la energía normalmente requerida para medios --
a base de monosacáridos. El medio estéril fué inoculado
15 con un organismo productor de neomicina. Después de 144
horas, el caldo de fermentación tenía una potencia de --
8500 mcg/ml. Un medio testigo basado en 5 % de una mez-
cla de maltosa y polisacáridos de acuerdo con la patente
USA 2.957.810, en calidad de manantial de carbohidrato, --
20 produjo solamente 4500 mcg/ml.

Ejemplo 5.-- Se preparó el medio del ejem-
plo 4. Se añadió un 2 % adicional de glucosa. Este me-
dio produjo solamente 4200 mcg/ml. Resulta que los azúca-
res interfieren con la asimilación por parte del organis-
mo de los productos de almidón alterados con enzimas en --
25 su conversión de neomicina.

Ejemplo 6.-- Se preparó un medio nutrien-
te que tenía la siguiente composición.
30

16 JUN 1969



INGREDIENTE

% en peso/volumen

	Harina de maiz desgerminada (contenido de almidón 85- 90%)	11
5	Harina de soja	2,5
	Levadura de cervecero	0,25
	CaCO ₃	0,2
	Sales de amonio	0,5
	Sales de potasio	0,45
10	Agente antiespumante	0,05
	Alfa-amilasa bacteriana	0,05

El medio fué preparado en un fermentador -
de 2.400 litros y fué esterilizado por vapor vivo. El --
15 medio estéril fué inoculado con un organismo productor --
de neomicina y fué fermentado de la manera usual. A las
144 horas, el caldo de cultivo tenía una potencia de - -
12000 mcg/ml. El medio preparado de acuerdo con la ante-
rior fórmula, pero sin la alfa-amilasa bacteriana, no po-
20 día ser agitado con la energía disponible en el motor de
agitación. Los intentos de agitar y esterilizar el medio
testigo por vapor vivo dieron como resultado excesivas --
pérdida por formación de espuma y borboteo en el fermenta
dor. La adición de más cantidad de agente antiespumante
25 no orilló suficientemente esta situación.

Ejemplo 7.- El medio de acuerdo con el
ejemplo 6, pero con el contenido de alfa-amilasa bacteria
na reducido a 0,01 % del peso del almidón, fué preparado
30 y esterilizado en un fermentador de 200.000 litros. El -



medio fué inoculado con el organismo productor de neomicina. El rendimiento a las 144 horas fué de 12500 mcg/ml, es decir dentro del margen obtenido en el fermentador menor.

5

10

- REIVINDICACIONES -

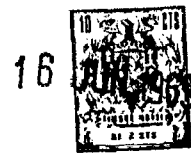
15

Los puntos de Invención, propia y nueva, - que se presentan para que sean objeto de esta solicitud - de Patente de Invención, en España, por VEINTE años, son los siguientes:

20

1.- Un procedimiento para preparar medios para la producción de neomicina, caracterizado por suspender un manantial de nitrógeno, sales y un almidón manantial de carbohidrato en agua, estando presente dicho manantial de carbohidrato en la cantidad de al menos 7 % en peso del medio, y someter a dicho almidón a la acción de alfa-amilasa a una temperatura por debajo de 90° C durante un periodo suficiente para licuar dicho almidón sin completa gelatinización del mismo, estando presente dicha alfa-amilasa en la cantidad de al menos aproximadamente -

30



0,01 % en peso de almidón.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la alfa-amilasa está presente en la cantidad de al menos aproximadamente 0,01% en peso y menos de 1% en peso del almidón.

3.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la temperatura de la mezcla licuada así obtenida es elevada hasta una temperatura de esterilización, para destruir los contaminantes indeseables y para interrumpir una acción enzimática adicional.

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

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

10 JUN 1969

Madrid,

P.A.

Alfredo...
Martínez