

3 8 3 9 8 3

P.- 45.886

SECCION TECNICA	67/605
CLASIFICACION IPC	PF/0j
CLASE	C12 C07
SUBCLASE	K

Memoria descriptiva



383983

para solicitar PATENTE DE INVENCION en ESPAÑA por 20 años

a nombre de RICHTER GEDEON VEGYÉSZETI GYÁR RT.

entidad / ~~de nacionalidad~~ húngara

con domicilio en Gyömrői u. 21, Budapest, Hungría

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE CONCENTRADOS DE VITAMINA B₁₂ SECOS, DE ELEVADO CONTENIDO EN PROTEINAS"
(Clase Internacional C12k C07g)

6.10.70

- 1 -



5 El invento concierne a la obtención o recuperación de vitamina B₁₂ y de otras cobalaminas microbiológicamente activas a partir de los líquidos de fermentación que contienen dichas sustancias activas, en la forma de un concentrado apropiado tanto para la preparación de vitamina B₁₂ cristalina como también para la preparación de un aditivo para piensos que contiene vitamina B₁₂, otras cobalaminas biológicamente activas y factores de crecimiento, así como grandes cantidades de proteínas.

10 Es sabido que la preparación de vitamina B₁₂ y de preparados que contienen vitamina B₁₂ tiene lugar en general descomponiendo o disgregando los cuerpos de bacterias en los líquidos de fermentación obtenidos por ejemplo por fermentación con metanobacterias o propionibacterias, y liberando de este modo la vitamina B₁₂ acumulada en los cuerpos de bacterias y llevándola a un medio líquido, llevando luego desde este medio a la vitamina B₁₂, por concentración o por adsorción, a un menor volumen, y transformando el concentrado obtenido de este modo, mediante operaciones de purificación adicionales en vitamina B₁₂ cristalina, o preparando a partir del concentrado citado preparados de aditivos para piensos. Tales procedimientos tienen on obstante la grave desventaja de que a la vitamina B₁₂, que originalmente se había obtenido incluida en los cuerpos de bacterias que constituyen aproximadamente 1% del líquido de fermentación, se la transfiere durante la descomposición a un gran volumen de líquido, después de lo cual se la debe transformar luego, mediante operaciones de concentración complicadas y ricas en pérdidas, de nuevo en un concentrado de pequeño volumen



5 con el fin de poder recuperar la vitamina B₁₂. Esta des-
ventaja es especialmente importante en el caso de los pre-
parados de aditivos para piensos, dado que el precio de
estos productos, mucho más bajo en comparación con la vi-
tamina B₁₂ cristalina, no puede cubrir los costos de las
operaciones de concentración citadas.

10 Con el fin de eliminar esta desventaja, ya
se ha introducido un procedimiento según el cual la masa
de microorganismos contenida en el líquido de fermentación
es precipitadamente la adición de diferentes sustancias
coaguladoras de proteínas o formadoras de precipitados, o
de aditivos floculadores o absorbentes, mediante ajuste
apropiado del valor del pH o mediante medidas similares,
se separa la bio-masa obtenida de este modo por filtración,
15 por decantación o centrifugación y se transforma la masa
de volumen relativamente pequeño, así obtenida, en el con-
centrado de vitamina B₁₂ (para la preparación de vitamina
B₁₂ cristalina o eventualmente de preparados de aditivos
para piensos que contienen vitamina B₁₂).

20 Estos procedimientos tienen la misión de
concentrar a un volumen lo más pequeño que sea posible,
mediante la precipitación, la masa de microorganismos que
contiene la vitamina B₁₂ y otras sustancias valiosas. Este
método de la concentración puede ser ventajoso en el caso
25 de la preparación de vitamina B₁₂ cristalina, dado que en
la disgregación o descomposición de la sustancia activa a
partir de un volumen pequeño se disminuyen también las pér-
didas y el trabajo necesario para el procedimiento ligados
necesariamente con la concentración a partir de un gran
30 volumen; no obstante, si se quiere preparar también aditi-

130



5

10

15

20

25

30

vos para piensos que contienen vitamina B₁₂ entonces, además de las ventajas citadas, aparecen también desventajas, dado que los productos químicos o agentes adsorbentes utilizados para la precipitación no pueden ser eliminados de manera rentable desde los preparados de aditivos para piensos, pero su permanencia en el producto acabado es no obstante indeseable desde el punto de vista de la nutrición, dado que los productos químicos tóxicos o perjudiciales para la salud de los animales (por ejemplo las sales de metales pesados utilizados para la precipitación de las proteínas) hacen enteramente inutilizable al producto para fines de nutrición, y también los agentes de precipitación o adsorbentes inertes, no tóxicos constituyen en los preparados de aditivos para piensos sustancias inactivas supérfluas y algunas veces también perjudiciales, no aptas para ser digeridas.

Se ha encontrado ahora que se puede llevar a cabo de modo muy ventajoso la concentración de la vitamina B₁₂ a pequeños volúmenes y que se puede preparar un concentrado excelentemente apropiado en primer lugar para la producción de preparados de aditivos para piensos, pero también bien utilizable para la obtención de vitamina B₁₂ cristalina, libre de sustancias inactivas no aptas para ser digeridas, e incluso otras sustancias nutricias proteínicas valiosas, si se mezclan los líquidos de fermentación obtenidos por la fermentación B₁₂, realizada con metanobacterias o con propionibacterias, con pequeñas cantidades de sustancias adsorbentes utilizables biológicamente, es decir con la suspensión acuosa de las sustancias de procedencia biológica cuyas par-



tículas tienen gran carga positiva y de este modo pueden adsorber por acciones electrostáticas y gravitatorias los pequeños cuerpos de bacterias de carga negativa (de 1 a 3 μ de tamaño) presentes en el líquido de fermentación y que contienen la vitamina B₁₂ producida. La adición de dichas sustancias adsorbentes orgánicas hace posible y favorece de este modo la separación o división de los cuerpos de bacterias que contienen vitamina y por consiguiente hace posible una concentración prácticamente total del contenido de vitamina B₁₂ en una llamada bio-masa acuosa.

Como "sustancias adsorbentes biológicamente utilizables" se entienden dentro del sentido del presente invento las sustancias orgánicas de estructura celular o granular que consisten principalmente en proteínas o en carbohidratos que son digestibles para los animales que consumen el aditivo para piensos y no son tóxicas, y también poseen de por sí un valor nutritivo y/o otras propiedades fisiológicamente ventajosas. Como tales sustancias adsorbentes biológicamente utilizables pueden utilizarse por ejemplo engrudo o suspensión de almidón, suspensión de levadura, suspensiones de micelios concentradas de otros hongos y suspensiones de células similares de procedencia natural, digestibles, libres de sustancias tóxicas. De acuerdo con los ensayos de la firma solicitante, estas sustancias adsorbentes utilizables biológicamente pueden ser añadidas en cantidades de 0,01 a 5,0%, ventajosamente de 0,01 a 1,0% con relación al líquido de fermentación. Estos porcentajes se refieren en cada caso al contenido de sustancia seca de la sustancia adsorbente utilizada.

30

Durante la separación se arrastran entonces

6.X.1970

- 5 -

383983

13 OG



5 los cuerpos de bacterias que contienen vitamina B₁₂ por
las partículas de la sustancia adsorbente utilizable bio-
lógicamente y de este modo se alcanza una sedimentación
fácil y rápida de toda la bio-masa; de este modo se obtie-
ne, a partir del líquido de fermentación que original-
mente contiene 1% de sustancia seca, una bio-masa acuosa
con un contenido de sustancia seca de 15 a 20%, que con-
tiene prácticamente toda la actividad B₁₂ del mismo, la
cual junto con la vitamina B₁₂, que procede del líquido
10 de fermentación, factores de crecimiento y proteínas de
cuerpos de bacterias, contiene también las sustancias or-
gánicas también valiosas de la sustancia adsorbente bio-
lógica. Esta bio-masa separada por sedimentación, decan-
tación, ventajosamente por separación o centrifugación,
15 puede ser secada luego en dispositivos apropiados para
ello, por ejemplo en un secador de tambor giratorio, y
de este modo se obtiene un preparado apto para el almacena-
miento, seco, con elevado contenido de vitamina B₁₂ y de
proteínas, que puede ser utilizado como aditivo para pien-
20 sos o puede ser llevado directamente al comercio.

El producto obtenido del modo anterior pue-
de ser tratado no obstante también para la obtención de
vitamina B₁₂ con una calidad apropiada para fines terapéu-
ticos humanos. Para este fin, el polvo seco es ajustado
25 en metanol al 70%, mediante la adición por ejemplo de le-
jía de sosa al 50-96%, convenientemente al 70%, a un valor
de pH de 8-9, y se agita durante 30-40 minutos a 40-50°C,
disolviéndose la vitamina B₁₂ en el metanol. Esta extrac-
ción se puede llevar a cabo ventajosamente en presencia
30 de 0,01 hasta 0,5% de tiocinato de amonio, de cianhidrina



de benzaldehído o de formiato de amonio. Luego la solución es separada por decantación o filtración y es evaporada, y la vitamina B₁₂ bruta obtenida como residuo de evaporación es purificada de la manera usual, por ejemplo por adsorción sobre una columna rellena con óxido de aluminio de Brockmann y es llevada a forma cristalina.

El invento es por lo tanto un procedimiento para la preparación de concentrados de vitamina B₁₂ con elevados contenidos de proteínas, secos, apropiados para la utilización como aditivo para piensos o para la obtención o recuperación de vitamina B₁₂ cristalina, el cual está caracterizado porque al líquido de fermentación que contiene vitamina B₁₂, obtenido por fermentación por ejemplo con metanobacterias o propionibacterias, se añaden sustancias adsorbentes biológicamente utilizables, convenientemente una suspensión de células de levadura, de micelios de hongos o de almidón, en cantidades de 0,01-5,0%, convenientemente de 0,01-1,0%, luego se separa la sustancia sólida suspendida por sedimentación, decantación o por separación y/o centrifugación, y se seca. El producto en forma de polvo seco obtenido de este modo puede ser utilizado en esta forma, directamente o después del mezclado con otras sustancias nutricias o piensos de por si conocidas, como un aditivo para piensos que contiene vitamina B₁₂ y proteínas, pero también puede ser tratado - como concentrado que contiene vitamina B₁₂ en grandes cantidades y de forma fácilmente recuperable - de modo muy ventajoso para la recuperación de vitamina B₁₂ cristalina.

El procedimiento de acuerdo con el invento muestra, en comparación con los procedimientos utiliza-

13 OCT



dos o conocidos hasta ahora para la recuperación de vitamina B₁₂ y/o para la producción de preparados de aditivos para piensos que contienen vitamina B₁₂, las siguientes ventajas:

5

1.- El nuevo procedimiento es esencialmente más sencillo que la tecnología utilizada hasta el momento, que exige una puesta en ebullición, una filtración, una precipitación y otras operaciones complicadas y ricas en pérdidas.

10

2.- Los dispositivos voluminosos y costosos utilizados en los procedimientos equivalentes, tales como reactores de descomposición o disgregación por calor, filtros prensa, etc no son necesarios; los dispositivos de este tipo que ya se encuentran a disposición en funcionamiento pueden ser empleados para otros fines.

15

3.- El nuevo procedimiento hace posible la preparación más rentable, en comparación con el procedimiento equivalente, de un preparado de aditivo para piensos resistente y estable, que contiene grandes cantidades de proteínas y vitamina B₁₂ u otros factores de crecimiento digestibles, con elevado valor nutritivo, buen sabor, buen olor y buen aspecto.

20

25

4.- El mismo producto, que es utilizable directamente como aditivo para piensos acabado, puede ser utilizado sin modificación del procedimiento como sustancia de partida para la preparación de vitamina B₁₂ cristalina, con lo cual el procedimiento puede ser ajustado de modo flexible y en proporciones cuantitativas cualesquiera, con mínimas necesidades de dispositivos, de personal de trabajo y de materiales, a las dos ramas de pro-

30

13 OCT



ducción.

5.- El procedimiento suministra una sustancia de partida para la preparación de vitamina B₁₂ susceptible de ser tratada ulteriormente de modo tecnológicamente ventajoso.

6.- El procedimiento se puede aplicar de manera igualmente ventajosa para el tratamiento de los líquidos de fermentación obtenidos por fermentaciones realizadas con metanobacterias o con propionibacterias, con utilización de sustancias de partida cualesquiera y sustancias nutriticias cualesquiera.

El procedimiento de acuerdo con el invento es explicado con más detalle mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: 10 litros de un líquido de fermentación obtenido por fermentación con metanobacterias, cuyo contenido global de vitamina B₁₂, medido por cromatografía en papel y cuyo factor III activo microbiológicamente era de 82.000 mcg/10 litros, fueron mezclados vigorosamente con 60 g de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) de 30% de contenido de sustancia seca suspendidos en 400 ml de agua, y con 20 g de fécula de patata suspendidos en 100 ml de agua. Luego la mezcla fue centrifugada durante 1-2 minutos con 5000 vueltas/minuto. Se obtuvieron 452 g de precipitado; este fue extendido sobre placas, fue secado en la estufa de secado a 120°C, fue desmenuzado y molido, y luego fue tamizado. De este modo se obtuvieron 92,0 g de producto final seco.

1 g de este polvo seco fue suspendido en 100 ml de agua, la suspensión fue ajustada a pH = 4,8-5,2

6.X.1970

- 9 -

383983

13 OCT 1968



5 y fue puesta en ebullición durante 10 minutos. Luego la suspensión fue centrifugada, el precipitado fue desechado, y en el líquido se determinó, por cromatografía en papel, la cantidad total de las cobalaminas microbiológicamente activas. El valor encontrado fue de 680 mcg; por consiguiente, el producto con un peso de 92,0 g contenía en total 62.320 mcg de sustancia activa, lo cual corresponde a un rendimiento de 86%.

10 Ejemplo 2: 10 litros de líquido de fermentación de una fermentación realizada con *Propionibacterium shermannii*, cuyo contenido de vitamina B₁₂ era de 100.000 mcg/l, fueron mezclados con las cantidades de levadura y de almidón indicadas en el Ejemplo 1; del modo allí descrito se obtuvieron 405 g de precipitado húmedo. El tratamiento y la determinación del contenido de cobalamina tuvieron lugar como en el Ejemplo 1; se obtuvieron 81,0 g
15 de producto de color gris claro con un contenido de vitamina B₁₂ de 890 mcg/g; el contenido total del producto con un peso de 81,0 g era por lo tanto de 72.000 mcg, lo cual
20 corresponde a un rendimiento de 72%.

25 Ejemplo 3: Por tratamiento de 10 litros de líquido de fermentación con metanobacterias del modo descrito en el Ejemplo 1, se obtuvieron 87,5 g de producto final seco, con un contenido total de vitamina B₁₂ de 50.700 g. Este producto en forma de polvo fue mezclado intensamente en un matraz de fondo redondo de 1 litro con 450 ml de metanol al 70%, el valor del pH fue ajustado a 8,5-9,0 con lejía de sosa al 30%, la mezcla fue mezclada con 1,0 g de tiocianato de amonio y fue mantenida en baño
30 María, con vigorosa agitación continua, bajo un refrigera-



130

5 dor de reflujo durante 35-40 minutos a 40-50°C. Después de
 la terminación de la extracción y después de sedimentar
 durante 10 a 15 minutos, se decantó la solución coloreada
 de rojo transparente en un matraz con succión de 500 ml,
 el precipitado fue llevado sobre el filtro, y la solución
 todavía remanente en el precipitado fue succionada bajo
 vacío de trompa de agua en la cantidad principal de la so-
 lución. Después de la filtración con succión, el precipi-
 tado que se encontraba sobre el filtro de succión fue la-
 10 vado ulteriormente de modo adicional con un total de 50
 a 60 ml de metanol al 70%, en pequeñas porciones.

15 Se obtuvieron en total 530 ml de filtrado. La
 solución fue liberada de metanol por concentración en va-
 cío, quedaron como residuo 150 ml de solución acuosa, cu-
 yo contenido global de vitamina B₁₂, determinado por cro-
 matografía en papel, era de 35.490 mcg. Rendimiento: 70%.

20 Esta solicitud, que corresponde a la presenta-
 da en Hungría el 26 de septiembre de 1969, bajo el número
 RI-377, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vi-
 gente estatuto sobre Propiedad Industrial.

25

REIVINDICACIONES

30 Los puntos de invención propia y nueva que se
 presentan para que sean objeto de esta Solicitud de Paten-
 te de Invención en España por VEINTE años, son los siguien-

[Handwritten signature]
 6.X.70

383983



tes:

5 1. - Procedimiento para la preparación de con-
centrados de vitamina B₁₂ secos, con elevado contenido de
proteínas, apropiados para la utilización como aditivos
a piensos o para la obtención de vitamina B₁₂ cristalina,
caracterizado porque al líquido de fermentación que con-
tiene vitamina B₁₂ obtenido por fermentación por ejemplo
con metanobacterias o propionibacterias se añaden sustan-
cias adsorbentes biológicamente utilizables, conveniente-
10 mente una suspensión de células de levadura, de micelios
de hongo o de sus almidones en cantidades de 0,01 hasta
5,0%, convenientemente de 0,01 a 1,0%, luego se separa la
sustancia sólida suspendida por sedimentación, decanta-
ción o separación y/o centrifugación, y se seca.

15 2. - Procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado porque (calculado con relación al peso de
la sustancia seca) se utiliza 0,01 hasta 1,0% de levadura
como adsorbente biológicamente utilizable.

20 3. - Procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado porque (calculado con relación al peso de
la sustancia seca) se utiliza 0,01 hasta 1,0% de almidón
como adsorbente biológicamente utilizable.

25 4. - Procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado porque se añade al líquido de fermentación
en calidad de adsorbente biológicamente utilizable una
suspensión acuosa que contiene en total (calculado con
relación al peso de la sustancia seca) 0,01 hasta 1,0% de
levadura y almidón, convenientemente fécula de patata.

30 5. - Procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado porque a partir del concentrado en forma de



polvo seco obtenido se extrae la vitamina B₁₂ con un disolvente que coagula las proteínas, ventajosamente con metanol al 50-96% y a partir de la solución se obtiene la vitamina B₁₂ de manera de por sí conocida.

5 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque la extracción de vitamina B₁₂ se lleva a cabo a 25 hasta 50°C, convenientemente en presencia de 0,01 hasta 0,5% de tiocianato de amonio, cianhidrina de benzaldehído o formiato de amonio.

10 7.- Procedimiento para la preparación de concentrados de vitamina B₁₂ secos, de elevado contenido en proteínas.

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

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

Madrid,

13 OCT 1970

P.A.

Alberto de Eizaburu
por Poderes

6.X.70

- 13 -

383983