

AÑO

Expediente núm.

241702



REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCION. 241702

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una PATENTE DE INVENCION por 20 años, en España

a favor de

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, entidad de nacionalidad
inglesa domiciliado en Imperial Chemical House,
Millbank, Londres, Inglaterra. núm.

por:

Procedimiento metabólico para la producción de ácido giberélico".

Nº 7574

Agente Sr. Gómez-Acebo y Modet.

PATENTE DE INVENCION

241702
I. I. Case No. PH. 12729.



Memoria Descriptiva **241702**

sobre:

"Procedimiento metabólico para la producción de ácido giberélico".

=====

Solicitante: IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, entidad inglesa, residente en Imperial Chemical House, Millbank, Londres, Inglaterra.

=====

Este invento se refiere a procedimientos metabólicos perfeccionados, en especial a procesos metabólicos empleados para la producción de ácido giberélico.

5.

El ácido giberélico es un estimulante del

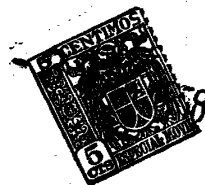
241702



- crecimiento de las plantas, que puede obtenerse de los filtrados de cultivos de algunas razas activas del mohó Gibberella fujikuroi "Fusarium moniliforme". Es conocida la preparación de ácido giberélico mediante el cultivo de
5. una raza activa de Gibberella fujikuroi en un medio nutritivo o caldo de cultivo adecuado, agitado y aireado, que contenga un origen de carbono por ejemplo glucosa; un origen de nitrógeno por ejemplo nitrato amónico; determinadas sales metálicas por ejemplo sulfato de magnesio
10. y fosfato monopotásico, y trazas de metales tales como hierro, cobre, cinc, manganeso y molibdeno. Es característica de este procedimiento metabólico, el que el ácido se produce, en su mayor parte, cuando se ha regulado o restringido la síntesis proteínica o crecimiento activo
15. del mohó. Esta restricción en el crecimiento activo, puede ser el resultado del agotamiento de uno de los componentes esenciales de la solución nutritiva, por ejemplo nitrógeno o carbono.

20. Cuando el crecimiento activo del mohó se restringe por agotamiento de un componente esencial del medio, se prefiere que este componente esencial no sea el origen de carbono; desde luego es preferible que el carbono permanezca disponible, para satisfacer las exigencias del mohó durante la etapa de producción de ácido giberélico.
25. Entre ciertos límites, cuanto mayor es la disponibilidad de carbono durante la etapa de producción del ácido, tanto mayor puede ser la producción de ácido giberélico. Sin embargo, una elevada concentración de carbono, especialmente cuando se halla en forma de azúcar, en la etapa
30. inicial del proceso metabólico, puede retardar el grado

241702



o ritmo de crecimiento del moho, y consiguientemente, tener un efecto contraproducente en la eficiencia total del procedimiento.

5. De acuerdo con este invento, en un proceso metabólico para la producción de ácido giberélico, por cultivo de una raza activa de Gibberella fujikuroi y la restricción del crecimiento activo para promover la producción de ácido giberélico, la disponibilidad de carbono se mantiene durante la etapa de producción de ácido giberélico añadiendo al medio un origen de carbono.

10. El origen de carbono puede añadirse continuamente o por partidas a intervalos, y un origen adecuado de carbono puede ser un azúcar, por ejemplo sucrosa o glucosa, un alcohol polihídrico por ejemplo glicerol o esteres del mismo, o un aceite vegetal.

15. El origen de nitrógeno utilizado en el medio, puede ser una sal amónica, un nitrato, el caldo de maceración del maíz, una maceración de proteínas tal como la peptona, u otros orígenes que contengan nitrógeno asimilable.

20. Por medio de este invento, se ha comprobado la posibilidad de iniciar un elevado crecimiento o desarrollo activo del moho y a la vez, satisfacer sus exigencias de carbono durante la etapa de producción de ácido giberélico.

25. Este invento se aclara con lo siguiente. Se prepararon dos recipientes de fermentación A y B, cada uno de los cuales contenía 30 litros de un medio formado por:
- 30.



3 MAY. 1958

241702

	<u>Recipiente A</u>	<u>Recipiente B</u>
Monohidrato de glucosa	10% p/vol.	10% p/vol.
Nitrato amónico	0,48% "	0,24% "
Fosfato monopotásico	0,5% "	0,5% "
5. Sulfato magnésico heptahidratado	0,1% "	0,1% "
Concentrado de elementos en pequeña cantidad †	0,2% vol/vol.	0,2% vol/vol.

† La composición del concentrado es la siguiente:

10. Sulfato ferroso heptahidratado	0.1 g.
Sulfato de cobre pentahidratado	0.015 g.
Sulfato de cinc heptahidratado	0.1 g.
Sulfato de manganeso heptahidratado	0.01 g.
Molibdato potásico (K_2MoO_4)	0.01 g.
Agua	100 ml.

15. Los medios se inocularon con una raza activa de Gibberella fujikuroi (muestras depositadas en las colecciones de cultivos del Instituto Micológico de la Commonwealth de Kew, Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, y la división de Investigación y Utilización y Desarrollo,
20. Septentrional del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Peoria, Illinois, U.S.A.) y se conservaron a una temperatura de 26,2°C. insuflándose aire en el medio a razón de 15 litros/minuto. Después de desarrollarse la fermentación durante 118 horas, al cabo de cuyo
25. tiempo el crecimiento activo se había restringido prácticamente por agotamiento del nitrógeno en el medio, se añadió asépticamente monohidrato de glucosa, en lotes de 150 g. para mantener la concentración de azúcar en los medios por encima de 2% peso/volumen.

241702



La tabla siguiente indica el azúcar total empleado por el moho y la concentración de ácido giberélico en los dos medios, durante el cultivo.

Tiempo (horas después de la inocula- ción)	Acido giberélico, mg/l.		Azúcar usado o consumido, g/l.	
	Recipiente de fermentación	Recipiente de fermentación	Recipiente de fermentación	Recipiente de fermentación
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
48			5	5
69			11	12
76			15	16
93			44	25
99			57	29
117			98	52
119			98	56
124			106	56
141		nada	129	68
148			135	69
166		48	153	78
171	nada		157	79
189	trazas	86	172	87
215	trazas	115	193	95
238	63	147	209	109
285	87	178	219	-
334	135	252	246	109
405	192	297	278	-
501	251	375	265	167
573	324	409	355	237



241702

- El medio usado en el recipiente A estaba prácticamente equilibrado con respecto al carbono y al nitrógeno, o sea, contenía estos dos principios nutritivos aproximadamente en las proporciones en que se consumen por el moho en crecimiento activo. Consiguientemente, el carbono se agotaría aproximadamente al mismo tiempo que el nitrógeno y, en ausencia de adiciones de principios nutritivos, el ácido giberélico a continuación obtenido no era de esperar que excediera de 120 mg./litro.
5. La tabla demuestra, sin embargo, que cuando después de la cesación del crecimiento activo se añade un origen de carbono, en este caso monohidrato de glucosa, la producción de ácido giberélico puede mantenerse por lo menos hasta que la concentración asciende a 324 mg/l.
10. En el caso del recipiente B, el medio primitivamente contenía carbono en exceso, que todavía se hallaba disponible cuando el contenido de nitrógeno se había consumido, y la producción normal de ácido giberélico podía esperarse que fuera de hasta 240 mg/litro.
15. Sin embargo, las adiciones de azúcar para mantener la disponibilidad de carbono, dieron por resultado que la concentración del ácido ascendiera a 409 mg/l.
20. El medio usado para la etapa de crecimiento activo del moho, es uno de los llamados medios equilibrados, en el que la concentración de nitrógeno puede estar comprendida entre 0,017 y 0,26% peso/volumen, por ejemplo en forma de 0,05 a 0,75% peso/volumen, de nitrato amónico, y con preferencia entre 0,07 y 0,17% peso/volumen de nitrógeno, por ejemplo en forma de 0,2 a 0,5% peso/volumen de nitrato amónico. La concentración
25. 30.

- 3 MAY. 1958

241702



- de carbono, por ejemplo en forma de sucrosa, glucosa o glicerol, se elige a continuación para proporcionar un medio en el que la relación de carbono a nitrógeno, esté comprendida con preferencia entre los valores de
5. 10:1 y 25:1. Un medio equilibrado clásico, para el crecimiento activo, puede contener por ejemplo 0,24% peso/volumen de nitrato amónico y 3,18% peso/volumen de monohidrato de glucosa, o sea una relación de C:N de 14:1, o puede contener 0,48% peso/volumen de nitrato amónico y 10% peso/volumen de monohidrato de glucosa, o sea una relación de C:N de 21:5.

15. Cuando el crecimiento o desarrollo activo se regula prácticamente por agotamiento de nitrógeno en un medio equilibrado, queda en éste un exceso de carbono muy pequeño o nulo, y por tanto, existe muy poco o ningún carbono a partir del cual el moho pueda producir ácido giberélico. Esta es la fase en la que se añade al medio un origen adicional de carbono, para mantener la producción de ácido giberélico.

20. La cantidad de origen de carbono añadida al medio al final de la fase de crecimiento activo, se controla con objeto de evitar la inhibición del moho en su producción de ácido giberélico. Un gran exceso de origen de carbono resulta desventajoso en la etapa de producción de ácido, y un exceso razonable puede ser,
25. por ejemplo, en forma de entre 0,1 y 10% peso/volumen de glucosa, y más especialmente, en forma de entre 1 y 4% peso/volumen de glucosa.

30. El procedimiento a que este invento se refiere, puede utilizarse en combinación con un proceso de etapas



241702

- múltiples, para la producción de ácido giberélico, como se describe en la solicitud pendiente nº 4.000/57. Así, el cultivo de la raza activa de Gibberella fujikuroi puede realizarse en dos o más etapas, con preferencia
5. en tres etapas por lo menos, la primera etapa es de crecimiento activo del moho en un medio aproximadamente equilibrado, o sea, la relación de C:N en el medio está comprendida entre 10:1 y 25:1, y la segunda etapa es tal que en ella continúa el crecimiento activo, en
 10. un medio que contiene una elevada relación de C:N, por ejemplo entre alrededor de 30:1 y 55:1 aproximadamente, y el crecimiento activo se regula o restringe por agotamiento de nitrógeno, que deja un exceso de origen de carbono, y la tercera etapa es tal que durante la misma se introducen en el medio cantidades adicionales de
 15. origen de carbono, manteniendo una concentración aproximadamente constante de origen de carbono en el medio, hasta que cesa la producción de ácido giberélico.
- Así, por ejemplo, la primera etapa puede reali-
20. zarse en un medio que contengan 3,18% peso/volumen de monohidrato de glucosa y 0,24% peso/volumen de nitrato amónico, o sea una relación C:N de 14:1 aproximadamente, y a continuación puede llevarse a cabo la segunda etapa en un medio desequilibrado de mayor relación C:N, por
 25. ejemplo un medio que contenga 16% peso/volumen a 10% peso/volumen de monohidrato de glucosa, y 0,4% peso/volumen de nitrato amónico, o sea una relación de C:N de 41:1 o 26:1 respectivamente. El crecimiento o desarrollo del moho continúa hasta que el origen de nitrógeno está
 30. completamente agotado y entonces queda un exceso del



241702

- origen de carbono y empieza la producción de ácido giberé-
lico. Durante esta producción de ácido giberélico, el
origen de carbono en exceso se consume crecientemente y,
cuando dicho origen llega a una concentración aproximada
5. de 0,5 a 10% peso/volumen del medio se empieza la
adición de nuevas cantidades de un origen de carbono,
que puede o no ser el mismo que se empleó en las primeras
etapas, con objeto de mantener una concentración cons-
tante de carbono en el medio, para sostener así la
10. producción continuada de ácido giberélico, con rendimientos
hasta ahora no conseguidos.

- El origen preferido de carbono es un azúcar,
por ejemplo la sucrosa o la glucosa, y la concentración
constante preferida de dicho azúcar durante la producción
15. continuada de ácido giberélico, es del orden de alrededor
de 1% hasta 4% aproximadamente, peso/volumen del medio.
La concentración constante preferida puede conseguirse
añadiendo al medio cantidades de azúcar en la etapa
final de producción de ácido giberélico, a intervalos
20. por ejemplo de 12 a 24 horas. Por este medio, puede
obtenerse un caldo de cultivo que contenga hasta alrede-
dor de 1.000 mg. de ácido giberélico por litro de medio,
y dicho ácido puede aislarse del medio por procedimientos
conocidos.

25. Este invento se aclara por los ejemplos siguien-
tes:

EJEMPLO 1.

Preparación del producto a inocular.

30. Se inoculan con un cultivo en agar de Gibberella
fujikuroi 5 litros de un medio nutritivo que contenga 8%



241702

de monohidrato de glucosa (peso/volumen), nitrato amónico 0,4% (peso/volumen), fosfato monopotásico, 0,5% (peso/volumen), sulfato magnésico heptahidratado 0,1% peso/volumen y un concentrado de elementos en poca cantidad, en proporción del 0,2% (peso/volumen), composición anteriormente descrita, con un pH de 3,47. El medio se conserva a 25°C. y se agita y airea con aire a razón de 2,5 litros de aire por minuto.

Fermentación de producción.

10. Al cabo de 80 horas, se inoculan 5 litros del cultivo indicado, en un recipiente de fermentación de 100 litros que contenga un medio nutritivo preparado como sigue:

	Monohidrato de glucosa	8% peso/volumen
15.	Nitrato amónico	0.24% "
	Sulfato magnésico heptahidratado	0.1% "
	Fosfato monopotásico	0.5% "
	Concentrado de elementos en poca cantidad †	0.2% volumen/volumen
	Agua hasta formar 75 litros	

20. † La composición de este concentrado es la antes indicada.

El medio se esteriliza y a continuación se enfría y se inocula con 5 litros del producto para inocular que acaba de describirse. El medio se agita y se mantiene a una temperatura de 26°C. y se airea con

25. una corriente de aire de 0,5 volumen de aire por volumen de medio de cultivo, por minuto. Cuando ha cesado el crecimiento activo del moho, o sea cuando el origen

de nitrógeno está completamente agotado, se inicia la producción de ácido giberélico, y el origen de carbono

30. restante (glucosa) disminuye rápidamente de concentración.



241702

A las 39 horas de empezar la formación de ácido giberélico en la etapa de producción de ácido, la concentración de glucosa es de 0,9%, peso/volumen aproximadamente y, por tanto, se agregan al medio nutritivo cantidades adicionales de azúcar, a intervalos de 12 horas, con objeto de

- 5. mantener una concentración de 2% peso/volumen de glucosa, aproximadamente, en el cable de cultivo, durante todo el resto de la etapa de producción de ácido en la fermentación. La tabla siguiente indica la concentración de
- 10. ácido giberélico en el medio, en relación con la glucosa consumida durante la fermentación.

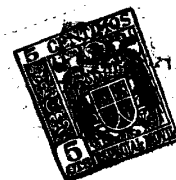
<u>Edad (horas/de la inoculación)</u>	<u>Acido giberélico (mg/litro)</u>	<u>Azúcar usado (% peso/volumen)</u>
48	23	4.9
71	105	6.8
144	268	10.6
191	352	12.1
336	489	16.5
359	618	17.1

- 15.
- 20. El contenido del recipiente se filtra, y una muestra del filtrado (58 litros) se extrae con acetato de etilo para separar el ácido giberélico que se recupera por medios conocidos. Así se obtienen 33,48 g. de ácido giberélico en forma de polvo cristalino incoloro, punto de fusión 233-235°C. con descomposición. Del filtrado de cristalización puede obtenerse una nueva cantidad de ácido giberélico.
- 25.

EJEMPLO 2.

- 30. Se repite el procedimiento descrito en el ejemplo 1, excepto que el 8% peso/volumen de monohidrato

24 1702



158

- de glucosa y el 0,24% peso/volumen de nitrato amónico del medio nutritivo usado para la etapa de producción de ácido giberélico en la fermentación, se sustituyen por 20% peso/volumen de monohidrato de glucosa y 0,4% peso/volumen de nitrato amónico. Durante la etapa de producción de ácido giberélico, el exceso de glucosa presente en el medio nutritivo, se gasta rápidamente y se añaden cantidades adicionales de monohidrato de glucosa a intervalos de 12 horas, después de unas 74 horas, con objeto de conservar una concentración de 4% peso/volumen de glucosa, aproximadamente, en el medio nutritivo, durante el resto de la etapa de producción de ácido giberélico en la fermentación. La tabla siguiente indica la concentración de ácido giberélico en el medio, en relación con la glucosa consumida en el curso de la fermentación:
- 5.
 - 10.
 - 15.

241702



	<u>Edad (horas después de la inoculación)</u>	<u>Acido giberélico (mg/litro)</u>	<u>Azúcar consumido (% peso/volumen)</u>
	76	6	6.5
	100	46	10.4
	112	79	12.3
5.	124	133	13.4
	136	138	14.6
	148	229	16.3
	160	245	17.9
	172	291	18.5
10.	184	306	19.1
	232	350	21.
	244	428	22.3
	268	453	23.9
	280	487	24.7
15.	292	520	25.4
	304	541	26.2
	316	559	27.1
	329	610	27.7
	341	624	28.7
20.	364	646	30.2
	376	640	30.8
	412	670	33.1
	460	768	34.2
	484	794	34.4
25.	508	826	35.0

EJEMPLO 3.

Se repite el proceso descrito en el ejemplo 1, excepto que el 8% peso/volumen de monohidrato de glucosa, y el 0,24% peso/volumen de nitrato amónico, del medio



241702

- nutritivo empleado en la fermentación de producción, se sustituyen por 20% peso/volumen de monohidrato de glucosa y 0,4% peso/volumen de nitrato amónico. Durante la etapa de producción de ácido giberélico, la glucosa en exceso que se encuentra en el medio nutritivo se consume rápidamente y a intervalos de 12 horas se añaden cantidades adicionales de monohidrato de glucosa, después de unas 26 horas, con objeto de mantener una concentración de, aproximadamente, 10% peso/volumen de glucosa en el medio nutritivo durante todo el resto de la etapa de producción de ácido giberélico en la fermentación. La tabla siguiente indica la concentración de ácido giberélico en el medio, en relación con la glucosa consumida, en el curso de la fermentación:

15.	<u>Edad (horas después de la inoculación)</u>	<u>Acido giberélico (mg/litro)</u>	<u>Azúcar consumido (% peso/volumen)</u>
	28	10	6.4
	30	22	8.1
	52	67	9.4
	64	100	11.2
20.	76	115	12.1
	88	121	13.7
	100	160	14.2
	112	192	14.8
	124	203	15.7
25.	136	249	16.8
	148	261	17.6
	184	272	19.0
	208	285	20.3

241702



	<u>Edad (horas después de la inoculación)</u>	<u>Acido giberélico (mg/litro)</u>	<u>Azúcar consumido (% peso/volumen)</u>
	220	350	21.0
	244	383	22.6
	256	445	23.2
5.	268	520	24.0
	293	541	25.6
	304	546	26.5
	328	583	28.3
	412	754	32.7
10.	460	794	33.7
	508	820	34.4
	532	840	34.6
	580	905	35.0

EJEMPLO 4.

15. Se repite el proceso descrito en el ejemplo 1, excepto que el 8% de monohidrato de glucosa peso/volumen, y el 0,24% de nitrato amónico, peso/volumen se sustituyen por 16% de monohidrato de glucosa peso/volumen y 0,4% de nitrato amónico peso/volumen. Durante la etapa de
20. producción de ácido giberélico en la fermentación, se consume el exceso de glucosa presente en el medio nutritivo, y se añaden cantidades adicionales de monohidrato de glucosa, después de 162 horas y a intervalos de 12 a 24 horas, con objeto de mantener una concentración de,
25. aproximadamente, 1 a 3% peso/volumen de glucosa en el medio nutritivo, durante el resto de la etapa de producción de ácido en la fermentación. La tabla siguiente indica
30. la concentración de ácido giberélico en el medio, con respecto a la concentración de glucosa, en el curso de la fermentación.

- 16 -
241702



	<u>Edad (horas después de la inoculación)</u>	<u>Acido giberélico (mg/litro)</u>	<u>Concentración de azúcar (% peso/ volumen)</u>
	16		15.95
	40		15.5
	46		14.16
5.	52		14:05
	64		12.36
	69		10.99
	75	10	9.35
	88	42	7.83
10.	93	60	8:70
	100	88	5.94
	111	107	4.77
	124	-	3.51
	136	198	2.59
15.	148	206	1.63
	160	253	0.75
	172	306	0.93
	184	311	0.94
	208	449	1.53
20.	232	449	3.2
	256	478	2.13
	280	507	1.78
	304	558	1.72
	328	642	1.72
25.	352	692	3.17
	376	765	3.31
	400	809	3.3
	424	-	2:35
	448	838	2.43
30.	472	864	1.43
	496	864	1.5
	520	956	1.41



24 17 02

El ácido giberélico se aísla por métodos conocidos, por filtración del medio de fermentación y paso del filtrado (63 litros) a través de carbono. El ácido giberélico adsorbido se elimina o separa por elución y se recupera y purifica por cristalización. Así se obtienen 63,0 g. de ácido giberélico en forma de producto cristalino incoloro, punto de fusión 233-235°C. con descomposición.

5.

EJEMPLO 5.

10.

Se repite el proceso descrito en el ejemplo 1, excepto que el 8% peso/volumen de monohidrato de glucosa y el 0,24% peso/volumen de nitrato amónico, se sustituyen por 20% peso/volumen de monohidrato de glucosa y 0,4% peso/volumen de nitrato amónico. Durante la etapa de

15.

producción de ácido giberélico de la fermentación, el exceso de glucosa presente en el medio de nutrición se consume y al cabo de 154 horas se añaden cantidades adicionales de monohidrato de glucosa y luego se siguen añadiendo a intervalos de 12 horas, con objeto de mantener una concentración de, aproximadamente, 1 a 4% peso/volumen de glucosa en el medio nutritivo, durante todo el resto de la etapa de producción de ácido en la fermentación.

20.

La tabla siguiente indica la concentración de ácido giberélico en el medio, con respecto a la concentración de glucosa durante el curso de la fermentación.

25.

241702



	<u>Edad (horas después de la inoculación)</u>	<u>Acido giberélico (mg./litro)</u>	<u>Concentración de azúcar (% peso/volumen)</u>
	9		18.25
	40		17.97
5.	44		16.98
	57		16.2
	63		15.43
	82	6	12.69
	106	46	8.73
10.	118	79	6.86
	130	133	5.76
	142	138	4.6
	154	229	3.84
	166	245	4.23
15.	178	291	4.07
	190	305	4.09
	202	-	4.06
	214	-	4.14
	226	-	4.09
20.	238	350	3.82
	250	427	3.86
	262	427	3.68
	274	452	3.4
	286	486	3.31
25.	298	519	3.13
	310	558	3.05
	322	591	2.79
	335	634	2.46
	347	623	2.54

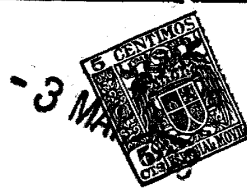
241702



	<u>Edad (horas después de la inoculación)</u>	<u>Acido giberélico (mg./litro)</u>	<u>Concentración de azúcar (% peso/volumen)</u>
	358	623	2.07
	370	645	1.88
	382	639	3.3
5.	394	660	1.5
	406	669	1.35
	418	669	0.21
	430	669	1.12
	442	669	0.84
10.	466	940	0.8
	490	792	0.13
	514	825	-
	538	-	-
	562	809	-
15.	586	812	-

EJEMPLO 6.

Se repite el proceso descrito en el ejemplo 1, excepto que el 8% peso/volumen de monohidrato de glucosa y el 0,24% peso/volumen de nitrato amónico se sustituyen por 10% peso/volumen de monohidrato de glucosa y 0,4% peso/volumen de nitrato amónico. Durante la etapa de producción de ácido giberélico de la fermentación, el exceso de glucosa que se halla presente en el medio de nutrición se consume, y al cabo de 60,5 horas, y luego a intervalos de 12 a 24 horas, se añaden cantidades adicionales de monohidrato de glucosa para mantener en el medio nutritivo una concentración de, aproximadamente 2 a 4% peso/volumen de glucosa, durante todo el resto de la etapa de producción de ácido en la fermentación. La tabla siguiente



241702

indica la concentración de ácido giberélico en el medio, en relación con la concentración de glucosa durante la fermentación.

	<u>Edad (horas después de la inoculación)</u>	<u>Acido giberélico (mg/litro)</u>	<u>Concentración de azúcar (% peso/volumen)</u>
5.	16		10.58
	40		8.39
	46		6.9
	52	5	5.44
	60	14	3.58
10.	64	29	4.87
	69	65	3.67
	75	93	2.86
	88	128	3.69
	93	154	2.83
15.	100	174	2.49
	111	195	2.54
	124	225	2.54
	136	276	2.54
	148	293	2.76
20.	160	323	2.95
	184	406	3.18
	208	491	3.77
	232	500	4.52
	256	569	4.6
25.	280	590	4.04
	304	-	3.96
	328	698	2.79
	352	762	2.84



241702

7

	<u>Edad (horas después de la inoculación)</u>	<u>Acido giberélico (mg/litro)</u>	<u>Concentración de azúcar (% peso/volumen)</u>
	376	825	2.41
	400	901	2.16
	424	-	0.84
5.	448	973	0.33
	472	1002	0.22
	496	989	0.26
	520	-	0.21

10. El ácido giberélico se aisla por medios conocidos, por filtración del medio de fermentación y paso del filtrado (60 litros) a través de carbono. El ácido giberélico adsorbido se separa o extrae por elución y se recupera y purifica por cristalización. Así se obtienen

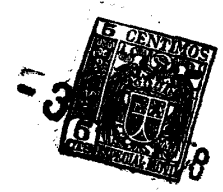
15. 63,6 g. de ácido giberélico en forma de sólido cristalino incoloro, punto de fusión 233-235°C. con descomposición.

N O T A

20. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarla en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en

25. España: "Procedimiento metabólico para la producción de ácido giberélico"; caracterizándose por lo siguiente:

1º.- Procedimiento metabólico para la producción de ácido giberélico, caracterizado por cultivarse una raza activa de Gibberella fujikuroi y controlar o



241702

restringir el crecimiento activo para fomentar la producción de ácido giberélico, y por mantenerse la disponibilidad de carbono durante la etapa de producción de ácido giberélico, añadiendo un origen de carbono al medio.

5. 2ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 1ª, caracterizado porque el origen de carbono se añade continuamente, o por partidas a intervalos.

10. 3ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 1ª y 2ª, caracterizado porque el origen de carbono es un azúcar, por ejemplo sucrosa o glucosa, un alcohol polihídrico, por ejemplo glicerol o esteres del mismo, o un aceite vegetal.

15. 4ª.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado porque el origen de nitrógeno en el medio es una sal amónica, un nitrato, un caldo de maceración de maíz o una maceración de proteína, tal como la peptona, u otros orígenes que contengan nitrógeno asimilable.

20. 5ª.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado porque la etapa de crecimiento activo se lleva a cabo en un medio equilibrado en el que la concentración de nitrógeno está comprendida entre 0,017 y 0,26%, peso/volumen, convenientemente en forma de un 0,05 a 0,75% peso/volumen de nitrato amónico y con preferencia entre 0,07 y 0,17% peso/volumen, convenientemente en forma de 0,2 a 0,5% peso/volumen de nitrato amónico.

30. 6ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 5ª, caracterizado porque la relación de carbono a nitrógeno, está comprendida entre 10:1 y 25:1.



241702

5. 7^a.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 6^a, caracterizado porque el carbono está en forma de 3,18% o 10% peso/volumen de monohidrato de glucosa, y el nitrógeno se encuentra en forma de 0,24% o 0,48% peso/volumen, respectivamente, de nitrato amónico.
10. 8^a.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones 1^a a 7^a, caracterizado porque la concentración de carbono en el medio durante la etapa de producción de ácido, está en la forma de entre 0,1% y 10%, peso/volumen de glucosa y con preferencia en forma de entre 1% y 4%, peso/volumen de glucosa.
15. 9^a.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones 1^a a 8^a, caracterizado por usarse en combinación con un proceso de etapas múltiples para la producción de ácido giberélico.
20. 10^a.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 9^a, caracterizado por aplicarse en dos o más etapas, con preferencia en tres; la primera etapa es de crecimiento activo en un medio equilibrado en el que la relación de carbono a nitrógeno es de 10:1 a 25:1; la segunda etapa es de crecimiento activo en un medio desequilibrado con una relación de carbono a nitrógeno de, aproximadamente, entre 30:1 y 55:1, hasta que se restringe por agotamiento de nitrógeno, y la tercera etapa,
25. en la que se añaden al medio cantidades de origen de carbono, es tal que se mantiene en el medio una concentración aproximadamente constante de origen de carbono.
30. 11^a.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 10^a, caracterizado porque la concentración aproximadamente constante de origen de carbono es de entre



241702

0,5% y 10% peso/volumen del medio.

12ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 11ª, caracterizado porque la concentración de origen de carbono está comprendida entre 1% y 4% peso/volumen del medio, con preferencia en forma de glucosa o sucrosa.

13ª.- Procedimiento metabólico para la producción de ácido giberélico; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria que consta de veinticuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, - 3 MAY. 1958

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED.

J. GOMEZ ACEBO Y MOJET
P. R.