

253827

P.- 18.919

A. 44.147 Case 17228 LJR(LJR)



253327

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

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

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL NUEVO ANTIBIOTICO
ASPARTOCINA"

5 Esta invención se refiere a un nuevo antibiótico denominado aspartocina y a su producción por fermentación, a métodos para su extracción y concentración a partir de soluciones brutas, a procedimientos para su purificación y a métodos para la preparación de sus sales.

10 La presente invención abarca dentro de su alcance el antibiótico en formas diluídas, como concentrados brutos y en formas cristalinas puras. Estos nuevos productos son activos contra varios microorganismos que incluyen bacterias grampositivas. Los efectos del nuevo antibiótico sobre microorganismos específicos junto con las propieda-

252327



des químicas y físicas del antibiótico le diferencian de los antibióticos anteriormente descritos.

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para la producción del nuevo antibiótico asparto-
5 cina que comprende cultivar un microorganismo seleccionado del grupo constituido por Streptomyces griseus var. spiralis y Streptomyces T-3910 en un medio nutritivo acuoso que contiene fuentes de carbohidrato, nitrógeno y sales inorgánicas asimilables bajo condiciones aeróbicas sumergidas.

10 A continuación se da una descripción general del organismo S. griseus var. spiralis basada en las características de diagnóstico observadas. Los colores descriptivos subrayados son los de Ridgeway: "Color Standards and Color Nomenclature".

15 Cantidad de crecimiento - Crecimiento moderado a bueno sobre muchos medios, desarrollo sobre medios que contienen almidón; desarrollo más pobre, restringido, sobre ciertos medios sintéticos.

20 Micelio aéreo y/o color de espora - Las esporas en masa son Pale Olive - Buff; micelio aéreo sin esporas incoloro a blanquecino.

Pigmentos solubles - Ninguno

Color reverso - En tonos de buff a amarillento sobre la mayoría de los medios.

25 Reacciones fisiológicas diversas - Sin crecimiento sobre celulosa; licuación completa de gelatina; formación de coágulo ácido y aclarado de leche púrpura; y reacción negativa H₂S sobre medio de agar hierro-peptona.

30 Morfología - Apéndices esporíferos surgen de micelio aéreo como espirales de pocas vueltas o espirales cortas.

253327



Esporas alargadas, de forma de bastones, truncadas, (1,0-1,2 μ x 0,6 μ) separadas regularmente en cadenas.

Influencia de la temperatura - Límites óptimos para crecimiento y esporulación 18° C, a 37° C. Temperatura máxima para crecimiento 42° C.; sin crecimiento a 48° C. Temperatura mínima 10° C.; sin crecimiento a 4° C.

Las características de cultivo de la nueva variedad S. griseus se dan en la tabla siguiente. Los colores descriptivos subrayados se han tomado de Ridgeway.

10

Tabla I

Streptomyces griseus var. spiveilis

Medio	Crecimiento	Micelio aéreo y color de esporas	Pigmento soluble	Color reverso	Observaciones
Agar almidón de Weisman	Buena; extendido	Pale Olive - buff Esporangulación intensa	Ninguno	Deep Colonial buff	Almidón no demorado
Agar extracto de carne dextrosa asparagulina	Moderado	Pale Olive - buff Esporangulación moderada	Ninguno	Colonial buff	Extendido incoloro limitado.
Agar extracto de carne dextrosa asparagulina ácido	Moderado restringido	Pale Olive - buff Esporangulación muy limitada	Ninguno	Colonial buff	
Agar sintético (agar de Czapek)	Restringido; delgado	Micelio aéreo muy abundante blanco; bordes filamentosos	Ninguno	blanco	
Agar de Emerson	Moderado	Pale Olive - buff Esporangulación ligera; te hendidas	Ninguno	Colonial buff	
Agar nutritivo	Pobre, delgado.	Ninguno	Ninguno	Incoloro	
Agar melato cálcico	Moderado; restringido	Pale Olive - buff Esporangulación ligera	Ninguno		Jena moderna - de de cultura - de malatq.

10
4
27



Tabla 1 (continúa en el otro lado)

Medio	Crecimiento	Micelio aéreo y color de espesa	Pigmento soluble	Color reverso	Observaciones
Agar Anidea cobaltito	Bueno; extendido	<u>Olive buff & Pale Olive Buff; esporulación intensa</u>	Ninguno	<u>Honey Yellow</u>	Muy abundante zona de
Agar dextrosa patata	Moderado	<u>Pale Olive - Buff esporulación intensa</u>	Ninguno	<u>Colloidal Buff</u>	
Agar de Bennett	Moderado	<u>Pale Olive - buff esporulación intensa</u>	Ninguno	<u>Honey Yellow</u>	Exudado incoloro limitado.
Agar licor de mace-ración de raíz	Moderado	<u>Pale Olive - buff esporulación moderada</u>	Ninguno	<u>Green</u>	
Agar maltosa de Sabouraud	Moderado	Micelio aéreo blanco; sin esporulación; zonas colonia central es tóxicas	Ninguno	<u>Colraceous-Buff</u>	
Agar malta-levadura	Moderado	<u>Pale Olive - Buff esporulación intensa</u>	Ninguno	<u>Colraceous-Buff</u>	Incoloro moderado.

151

253327





253327

A primera vista, esta nueva cepa se asemeja mucho a varias cepas de S. griseus. La coloración de espora, los colores reversos y los hábitos de crecimiento son semejantes. Sin embargo, cuando los esporóforos se comparan al microscopio, todas las cepas de S. griseus tienen cadenas entre rectas y flexuosas de esporas globosas a elípticas, en contraste con las cadenas enrolladas y en espiral de las esporas truncadas, análogas a bastones, de la nueva cepa. La combinación de esporóforos helicoidales y esporas de tipo bacilar justifica el estado varietal para esta cepa en el complejo S. griseus. El nombre S. griseus var. spirales se ha elegido para describir las estructuras esporíferas del organismo. El nuevo organismo aislado, cuando se clasifica según Waksman y Lachevalier. "Actinomycetes and their antibiotics", cae dentro de la subdivisión III (sin pigmento soluble en medios orgánicos), y encaja del modo más conveniente en la categoría (g) - crecimiento incoloro a amarillento a oliváceo - buff - en la que S. griseus es la especie representativa.

Se sobrentenderá que, para la producción del antibiótico aspartocina de esta invención, la presente invención no se limita a este organismo particular o a organismos que respondan por completo a las características anteriores de crecimiento y microscópicas que se dan con fines ilustrativos. En realidad, se desea y se trata de incluir el uso de mutantes producidos a partir del organismo descrito por varios medios, tales como radiación x, radiación ultravioleta, mostaza nitrógeno, exposición a fagos y análogos.

Además, se ha encontrado que la aspartocina puede producirse también por una especie no identificada de Streptomyces que nosotros hemos designado cultivo T-3910.

El cultivo de la nueva cepa de S. griseus var. spiralis,



25301
25301

5 asi como el cultivo T-3910 puede producirse en varios medios de cultivo líquidos. Entre los medios que son útiles para la producción de aspartocina figuran una fuente asimilable de carbono tal como almidón, azúcar, melazas, o glicerol, una fuente
10 asimilable de nitrógeno, tal como proteína, hidrolizado de proteína, polipéptidos, aminoácidos, o licor de maceración de maiz, y aniones y cationes inorgánicos, tales como potasio, sodio, calcio, sulfato, fosfato o cloruro. Se suministran elementos traza, tales como boro, molibdeno y cobre, según se
15 necesite, en forma de impurezas por otros constituyentes del medio. La aireación en tanques y botellas se proporciona forzando aire estéril a través de la superficie del medio de fermentación o sobre la misma. Se suministra una agitación adicional en tanques por un impulsor mecánico. Si se necesita,
20 puede añadirse un agente antiespumante, por ejemplo 1% de octadecanol en aceite de manteca de cerdo.

Para fermentaciones en frasco con agitación, se inoculan porciones de 100 mililitros del siguiente inculo líquido en frascos de 500 mililitros, con una placa inclinada de agar
25 del cultivo.

Inculo líquido

Harina de soja	20 gramos por litros
Almidón	20 gramos por litro
Líquido de maceración de maiz	5 gramos por litro
Carbonato cálcico	3 gramos por litro

25 Los frascos se incuban sobre un agitador de vaivén y se agitan vigorosamente durante 48 horas.

Para la producción del antibiótico en fermentadores de tanque, es preferible emplear el siguiente medio de fermentación:

30



253327

Medio de fermentación

Melazas	20 gramos por litro
Fécula de maíz	10 gramos por litro
Bactopeptona	10 gramos por litro
Carbonato cálcico	1 gramo por litro.

5 cada tanque se inocula con 1 % de un caldo de cultivo fermentado según se ha descrito arriba para la fermentación en frasco de agitación. Se suministra aireación a la velocidad de 0,2-2,0 volúmenes de aire estéril por volumen de caldo, por minuto, y el caldo se agita por un impulsor accionado a
10 unas 120-160 r.p.m. La temperatura se mantiene a 20-35° C.; generalmente a 28° C. La fermentación puede continuarse durante 24-240 horas en cuyo momento se recoge la sustancia activa.

15 Después de completada la fermentación, el caldo de cultivo que contiene el antibiótico de esta invención se filtra preferiblemente a pH 5,0 para separar el micelio del caldo. Puede emplearse tierra de diatomeas o cualquier otro agente auxiliar de filtración corriente para ayudar a la filtración que se realiza utilizando equipo normal. Posteriormente, puede recuperarse aspartocina a partir de la torta micelial por procedimientos de extracción adecuados.
20

La aspartocina puede extraerse de la torta de filtración con agua a pH 1-2 o 9-10 y extraerse por retorno en un disolvente inmiscible tal como butanol a pH 1-3. En la torta de filtración hay aproximadamente 80-90% de la actividad.
25

Cuando la solución butanólica se concentra (1/25 a 1/50 de su volumen) a butanol anhidro, precipita el antibiótico. La mezcla de butanol-precipitado se agita con acetona o éter de petróleo y el precipitado se separa por centrifugación. El antibiótico se lava después con acetona y se seca
30



253327

dando un producto amorfo.

Igualmente, puede añadirse cloruro cálcico u otras sales en esta etapa de la operación, o antes, si se desea, para facilitar la precipitación y/o la cristalización.

5 La purificación de aspartocina puede conseguirse cristalizando aspartocina cálcica de mezclas disolventes tales como butanol-agua o metanol-agua, de la manera corriente.

10 La nueva aspartocina de esta invención está constituida por los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno. El análisis elemental de la aspartocina acusa valores que prácticamente son de las siguientes proporciones en peso:

	Carbono	53,58
	Hidrógeno	7,58
15	Nitrógeno	13,58
	Azufre	0,36
	Oxígeno (por diferencia)	24,90

20 El producto tiene una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} = +26,4^{\circ}$ (c, 2,1 % de solución en metanol). El producto no muestra absorción ultravioleta característica. Es soluble en agua por debajo de pH 3,0 y por encima de pH 3,6. El punto isoeléctrico está próximo a 3,3. El ácido libre de aspartocina es soluble en metanol, etanol, butanol, ácido acético glacial, agua
25 y butanol húmedo. Es soluble en la proporción de 0,6 mg./ml. en acetona y 0,1 mg./ml. en acetato de etilo y éter.

30 Se ha preparado un espectro de absorción infrarrojo del ácido libre de la aspartocina de una manera corriente mezclando con cristales de KBr y comprimiendo en forma de un disco. El compuesto presenta absorción característica en la re-



253327

gión infrarroja del espectro a las siguientes longitudes de onda expresadas en micrones: 3,07; 3,45; 6,53; 6,89; 7,15; 8,10 y 9,82. La curva infrarroja se reproduce en el dibujo adjunto.

5 Los análisis microbiológico y cromatográfico en papel de hidrolizados de ácido de aspartocina indican los siguientes contenidos de aminoácidos:

	<u>%</u>	<u>Relación molar</u>	
10	Acido D o L-aspartico	35	4
	L-prolina	8	1
	L-Valina	8	1
	Glicina	10	2
	Acido glutámico	10	1

La aspartocina presenta los siguientes valores R_f en los sistemas disolventes que se indican a continuación:

	<u>Valor R_f</u>	<u>Sistema disolvente</u>
15	0,25	5% NH_4Cl
	0,38	s-colidina saturada con agua
	0,14	fosfato 0-2M pH 6,0
	0,01	100 acetato de amilo normal 30 éter dibutílico 5 ácido acético 50 agua
20	0,90	100 cloroformo 35 fenol de 90% 4 ácido acético 2 piridina 50 agua
25	0,01	200 benceno 100 ciclohexano 15 ácido acético 50 agua
	0,95	200 m-cresol 1 ácido HO 1 piridina 100 agua
30	0,05	200 butanol normal 50 piridina 200 agua

253327



<u>Valor R_f</u>	<u>Sistema disolvente</u>
0,30	200 m-cresol 100 fosfato 0,1M pH 7,0 5 % NaCl
0,48	200 m-cresol 100 fosfato 0,1M pH 6,0
0,80	200 butanol normal 50 piridina 50 ácido acético 100 agua
0,01	Agua ajustada a pH 2,3 con ácido tartárico
0,01	200 butanol normal 100 % NaHCO ₃
0,01	100 1,2-dicloroetano 100 tetracloruro de carbono 25 ácido acético 50 agua
0,01	100 CHCl ₃ 40 piridina 40 ácido HO 50 agua
0,97	200 fenol 90 % 50 m-cresol 8 ácido HO 50 agua.

La aspartocina se distingue claramente de otros antibióticos por sus propiedades físicas y químicas según se comprueba por las arriba descritas, por su espectro antimicrobiano y por cromatografía en papel. La actividad antimicrobiana específica del antibiótico de esta invención se presenta en la tabla que figura a continuación, que muestra la concentración de aspartocina necesaria para inhibir el desarrollo de microorganismos representativos en caldo de soja tripticasa:



253327

TABLA 2

<u>Organismo</u>	<u>Concentración inhibitoria mínima, mcg./ml.</u>
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538	15.5
<u>Staphylococcus aureus</u> 209P	15.5
<u>Streptococcus pyogenes</u> C-203	2.0
<u>Streptococcus pyogenes</u> NY-5	4.0
<u>Corynebacterium xerosis</u> NRRL B-1397	1.0
<u>Bacillus cereus</u>	4.0
<u>Sarcina lutea</u>	2.0
<u>Bacillus polymyxa</u>	4.0
<u>Bacillus megatherium</u>	0.25
<u>Erysipelothrix rhusopathiae</u>	0.5
<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	4.0
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	> 250
<u>Pasteurella multocida</u>	> 250
<u>Salmonella gallinarum</u>	> 250
<u>Escherichia coli</u>	> 250
<u>Proteus vulgaris</u>	> 250
<u>Candida albicans</u>	> 250
<u>Mycobacterium ranae</u>	62.0
<u>Mycobacterium</u> 607	62.0

La aspartocina es muy activa in vitro contra estafilococos ensayados incluyendo S. aureus y S. albus, coagulasa positivos y negativos. Los estreptococos incluyendo cepas α -hemolíticas, β -hemolítica y no hemolíticas, son sensibles al nuevo antibiótico. Muchos de los organismos antes mencionados son productos ais-



238327

5 lados de fuentes clínicas y son hasta cierto punto resistentes a la penicilina o a la tetraciclina. La aspartocina es también muy activa por vía subcutánea contra las infecciones normalizadas en ratón, Streptococcus U203, Diplococcus pneumoniae SV1 y Staphylococcus aureus.

10 Se ha encontrado también que la aspartocina es sustantiva a los tejidos tales como los de algodón y puede añadirse a los tejidos de algodón para hacerlos bacteriostáticos de una manera prácticamente igual a como se ha encontrado útil con el antibiótico neomicina.

15 La aspartocina es especialmente valiosa por sus propiedades favorecedoras del crecimiento en las aves, por ejemplo, en los pollos. Este antibiótico puede agregarse a una dieta purificada para pollos que contenga caseína como fuente de proteínas y sacarosa como fuente de carbohidratos suministrada con todas las vitaminas y elementos minerales conocidos. Se ha encontrado que la aspartocina puede agregarse convenientemente a tales dietas en cantidades tan pequeñas como 5 ó 10 partes por millón por kilogramo de dieta. Puede añadirse más, si se desea pero, hasta ahora, no se ha encontrado necesario añadir más de 500 miligramos por kilogramo de dieta. El incremento en peso por ciento de los pollos con relación a los controles está comprendido entre 25 y 30 %, aproximadamente. La aspartocina no ha resultado hasta ahora útil en 20 terapia humana.

25 La invención se describirá con mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos específicos.

EJEMPLO 1

Preparación del inoculo

31 Un medio típico utilizado para el desarrollo del ino-

253327



culo primario se prepara de acuerdo con la siguiente fórmula:

Harina de soja	20 gramos
Almidón	20 gramos
Licor de maceración de maiz	5 gramos
Carbonato cálcico	3 gramos

5 Agua hasta 1000 mililitros

Se incuba durante una semana una placa inclinada de agar malta-
levadura de un cultivo de la especie S. griseus var. spiralis.
En este tiempo las esporas y el micelio se pasan a dos frascos
de 500 mililitros que contienen 100 mililitros del medio indi-
10 cado arriba. Los frascos se colocan en un agitador de vaivén
y se agitan enérgicamente durante 48 horas a 28° C. Los inócu-
los del frasco se pasan a botellas de 9 litros que contienen
6 litros del medio líquido anterior. Estas botellas se airean
durante 24 horas para activar más el desarrollo. Al final de
15 este tiempo, las botellas de 9 litros se usan para sembrar tan-
ques de fermentación.

EJEMPLO 2

Fermentación

20 Se prepara un medio de fermentación de acuerdo con
la siguiente fórmula:

Melazas	20 gramos
Almidón de maíz	10 gramos
Bactopeptona	10 gramos
Carbonato cálcico	1 gramo

Agua hasta 1000 mililitros.

25 El medio de fermentación se esteriliza a 120° C. con vapor
de agua a 1,05 kg. por centímetro cuadrado de presión durante
60 minutos. El pH del medio antes y después de esterilización
es 6,75. Se inoculan 1500 litros del medio esteril en fermenta-
dores de 3780 litros, con 12 litros del inóculo de botella des-
crito anteriormente y se realiza la fermentación a 28° C. duran-
30 te 90 horas. Se agita el medio por un impulsor que trabaja a 100

253327



revoluciones por minuto. Al final de la fermentación se ensaya el mosto.

EJEMPLO 3

Aislamiento

5 Se mezclan 200 litros de mosto fermentado con 6.000
gramos de tierra de diatomeas, se ajusta a pH 5,0, se filtra
y se desecha el filtrado. La torta de mosto se lava dos veces:
primero, con 40 litros de H₂O a pH 5,0 y luego con 40 litros
de acetona. Se desechan ambos líquidos de lavado. La torta de
10 mosto se extrae dos veces con 50 litros de H₂O a pH 2,0, ajus-
tado con H₂SO₄, y una vez con 45 litros de H₂O a pH 9,5 ajus-
tado con NaOH. Los extractos acuosos alcalinos y ácidos se ex-
traen cada uno con 1/2 volumen de butanol normal a pH 2-3. Los
15 extractos butanólicos separados se ajustan a pH 5-6 y se con-
centran a 1/25-1/50 de su volumen con lo cual precipita el an-
tibiótico. El concentrado butanólico del extracto acuoso ácido
se agita con tres volúmenes de acetona, y el precipitado se
separa por centrifugación, se lava con acetona y se seca. El
rendimiento de producto es 151 gramos. El concentrado butanó-
20 lico del agua alcalina se agita con 3 volúmenes de éter de
petróleo, se separa el precipitado por centrifugación, se la-
va con acetona y se seca. El rendimiento de producto es 41 gra-
mos.

EJEMPLO 4

Aislamiento de Aspartocina cálcica

25 Se añaden 10 gramos de cloruro cálcico y 300 gramos
de tierra de diatomeas sobre 10 litros de mosto fermentado.
La mezcla se agita, se ajusta a pH 5,0 y se mantiene a este
pH durante 10 minutos mientras se agita. La aspartocina cálcica
30 precipitada se filtra con la torta de mosto y el filtra-

253327



do agotado se tira. La torta de mosto se lava por agitación
en 2 litros de H₂O a pH 5,0. Después de filtración, se tira
el lavado acuoso inactivo. La torta de mosto se sigue lavan-
do por agitación con 2 litros de acetona. La torta de mosto
se filtra y se tira el líquido de lavado acetónico inactivo.
Se extrae la torta de mosto dos veces por agitación durante
10 minutos con 2 litros de H₂O a pH 1,0 ajustado con HCl. El
agua ácida enriquecida con antibiótico se extrae con 1/2 vo-
lúmenes de butanol normal. El extracto butanólico se ajusta
a pH 5,0 y se concentra bajo presión reducida con adición
de H₂O para mantener una solución butanólica húmeda. La so-
lución se concentra a aproximadamente 500 mililitros y se
añade una solución butanólica húmeda de CaCl₂ a pH 5,0 has-
ta que no hay más precipitación. La aspartocina cálcica pre-
cipitada se separa por centrifugación, se lava con butanol
húmedo, seguido de un lavado con acetona, y se seca. El ren-
dimiento de producto cristalino bruto es 6 gramos. El aná-
lisis de este producto acusa una pureza de 90 % aproxima-
mente.

EJEMPLO 5

Cristalización de aspartocina cálcica

Se disuelven en 200 mililitros de agua 40 gramos de
producto preparado de acuerdo con el procedimiento del Ejem-
plo 3. Se añade una solución acuosa de 40 gramos de CaCl₂
y se ajusta la solución a pH 9,0 con NaOH y se filtra. La
solución filtrada se reajusta a pH 5,0 con HCl y la aspar-
tocina cálcica precipitada se elimina por centrifugación.
El precipitado se disuelve en 400 mililitros de H₂O a pH
2,5 y se añaden 200 mililitros de metanol. La solución se
filtra y la solución metanol-agua se ajusta a pH 5,0 y se



2589

guarda a 5° C. La aspartocina cálcica cristalina se separa por centrifugación. El producto cristalino se disuelve en 200 mililitros de metanol a pH 3,0 ajustado con HCl. La solución se agita con 4 gramos de carbón y se filtra. La solución filtrada se ajusta a pH 5,0 utilizando NH₄OH. Se forma inmediatamente un precipitado cristalino que se elimina por filtración, se lava con metanol y se seca. La primera cosecha de aspartocina cálcica cristalina da 3,85 gramos. Las aguas madres de la primera cosecha de cristales se conservan a 5° C. durante 16 horas. Una segunda cosecha de aspartocina cálcica cristalina se separa por filtración, se lava con metanol y acetona y se seca. La segunda cosecha da 3,37 gramos. Se obtienen cosechas adicionales concentrando las aguas madres bajo presión reducida y conservando a 5° C.

EJEMPLO 6

Preparación del ácido libre de aspartocina

Se disuelve un gramo de aspartocina cálcica, análoga a la preparada por el procedimiento del Ejemplo 5, en 25 mililitros de H₂O, ajustando con HCl a pH 1,5. La solución acuosa se ajusta a pH 3,0 y se mezcla con 15 mililitros de una solución acuosa saturada con NaCl. El ácido libre precipitado se lava abundantemente con agua. El precipitado se disuelve en 50 mililitros de metanol, se filtra y se concentra a aproximadamente 10 mililitros. Se añaden 40 mililitros de agua sobre la solución metanólica con lo que precipita el ácido libre. El precipitado se lava con H₂O, seguido de un lavado con acetona, se separa por centrifugación y se seca. El rendimiento de ácido libre de aspartocina es 340 miligramos. El análisis químico de este producto y sus otras propiedades químicas, físicas y biológicas se han descrito ya.

253327



EJEMPLO 7

Preparación del picrato de aspartocina

Se disuelven 10 gramos de producto preparado por el procedimiento del Ejemplo 3 en 250 mililitros de agua a pH 2,0. Se añade una solución acuosa saturada con ácido pícrico hasta que no se forma más precipitado. El precipitado se separa por centrifugación y se lava con agua. El picrato se disuelve en 200 mililitros de acetona, se concentra a presión reducida hasta unos 100 mililitros, y se precipita el picrato añadiendo agua hasta que la precipitación es completa. Se decanta el producto que sobrenada y el picrato se disuelve en 200 mililitros de acetona. Se añade butanol y se concentra la solución a presión reducida hasta 100 mililitros aproximadamente de una solución butanólica anhidra. La solución en butanol se mezcla con 3 volúmenes de éter, el picrato precipitado se separa por centrifugación, se lava con éter y se seca. El rendimiento de picrato es 8,5 gramos.

EJEMPLO 8

Preparación de sales sódica y potásica de aspartocina

Se disuelven 100 gramos de aspartocina cálcica análoga a la descrita en el ejemplo 4, en un litro de agua a pH 2,0, ajustado con HCl. La solución acuosa se ajusta a pH 3,3 y se extrae dos veces con un litro, aproximadamente, de butanol cada vez. El extracto butanólico, después de lavar con agua a pH 3,4, se seca sobre Na_2SO_4 y se filtra.

Se agita una porción de 1/3, 777 mililitros, de la solución butanólica con 200 mililitros de agua, ajustada con NaOH a pH 8,5 y se concentra hasta aproximadamente 200 mililitros de una solución en butanol anhidro. Se separa por centri-



253327

fugación una sal sódica cristalina que precipita, se lava con butanol, etanol, y acetona y se seca. El rendimiento de sal sódica cristalina es 3,0 gramos. Se recoge una segunda cosecha de sal sódica agitando las aguas madres con 10 volúmenes de acetona y separando el precipitado por centrifugación. El precipitado se lava con acetona y se seca dando 13,1 gramos de material.

Se prepara una sal potásica partiendo de una segunda porción de 1/3 de la solución butanólica por el mismo procedimiento, a excepción de que se usa KOH para ajustar a pH 8,5.

Se disuelven 500 miligramos del ácido libre aspartocina en 5 mililitros de etanol. Se agrega gota a gota una solución etanólica saturada de KOH sobre la solución etanólica de aspartocina hasta que no se forma más precipitado. La sal potásica precipitada se separa por centrifugación, se lava con 8 mililitros de etanol y 10 mililitros de acetona. La sal se seca en vacío dando 220 miligramos.

La sal sódica se prepara como se ha descrito arriba usando la misma concentración del ácido libre y añadiendo una solución etanólica saturada de NaOH para formar la sal. El rendimiento de sal sólida seca es 185 miligramos.

EJEMPLO 9

Producción de aspartocina por el cultivo T-3910

Las condiciones de preparación del inóculo y de fermentación son las mismas que se han descrito anteriormente en los Ejemplos 1 y 2 de esta solicitud. El cultivo T-3910 se fermenta en dos tanques utilizando 100 litros de medio de fermentación en cada tanque.

253327



Tanque 1

Tanque 2

<u>Medio de fermentación</u>	<u>Gramos por litro</u>	<u>Medio de fermentación</u>	<u>Gramos por litro</u>
Peptona	25,0	Harina de soja	40,0
Fécula de maíz	10,0	Fécula de maíz	10,0
Melazas	20,0	Melazas	20,0
Lactalbumina	5,0	CaCO ₃	3,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,0		
CaCO ₃	1,0		

Al cabo de 137 horas de fermentación, se recogen los mostos del tanque, se reúnen y se tratan de la manera siguiente: Aislamiento y purificación de aspartocina a partir del cultivo T-3910.

Se añaden 190 gramos de cloruro cálcico y 5700 gramos de tierra de diatomeas sobre 190 litros de mosto fermentado. La mezcla se ajusta a pH 5,5, se agita durante 20 minutos y se filtra. El antibiótico precipitado se separa por filtración con la torta de mosto y el filtrado agotado se tira. La torta de mosto se lava con 60 litros de agua a pH 5,0-5,5 y se filtra. El lavado acuoso inactivo se tira, la torta de mosto se extrae dos veces agitando 20 minutos con 60 litros de agua a pH 9,8-10,0. Después de filtración, se reúnen los extractos acuosos alcalinos, se ajustan a pH 1,0-3,0 con HCl y se extraen dos veces con 1/4 volúmenes de butanol normal. Los 65 litros de extracto butanólico reunido se ajustan a pH 5,0-7,0 y se concentran bajo presión reducida a aproximadamente 4 litros de butanol anhidro. El antibiótico precipita y se separa por centrifugación y el butanol que sobrenada se tira. El precipitado se disuelve en unos 500 mililitros de agua a pH 1,5 y la solución se filtra. La solución acuosa se extrae tres veces con porciones de 300 mililitros de butanol normal. El extracto butanólico, 950 mililitros, se ajusta a pH 5,0-5,5 y se agita con 50 mililitros de una solución butanólica húmeda que contiene tres gramos de cloruro cálcico a un pH de 5,0-5,5. La aspartocina cálcica precipi-



25 33 27

tada se separa por centrifugación, se lava con butanol húmedo, se lava nuevamente con acetona y se seca. El rendimiento de producto es 7,2 gramos.

Esta Solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 14 de Noviembre de 1.958, bajo el núm. 773.957, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

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:

1º.- Un procedimiento para la producción del nuevo antibiótico aspartocina caracterizado por cultivar un microorganismo seleccionado del grupo constituido por Streptomyces griseus var. spiralis y Streptomyces T-3910 en un medio nutritivo acuoso que contiene fuentes asimilables de carbohidrato, nitrógeno y sales inorgánicas en condiciones aeróbicas sumergidas.

2º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el cultivo se realiza durante un periodo de 24 a 240 horas y a una temperatura de 20 a 35º C.

3º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó la 2, caracterizado por el hecho de que hay presente en dicho medio una sal de metal alcalinotérreo, tal como una sal cálcica, de manera que se produce una sal correspondiente de aspartocina.



253327

4º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por el hecho de que se recupera aspartocina por filtración del medio fermentado y se extrae aspartocina de la torta de filtración.

5 5º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por el hecho de que incluye la extracción de aspartocina a partir de la torta de filtración, con agua, nueva extracción de la aspartocina en un disolvente inmiscible, y separación de aspartocina del mismo.

10 6º.- Un procedimiento para la producción del nuevo antibiótico aspartocina.

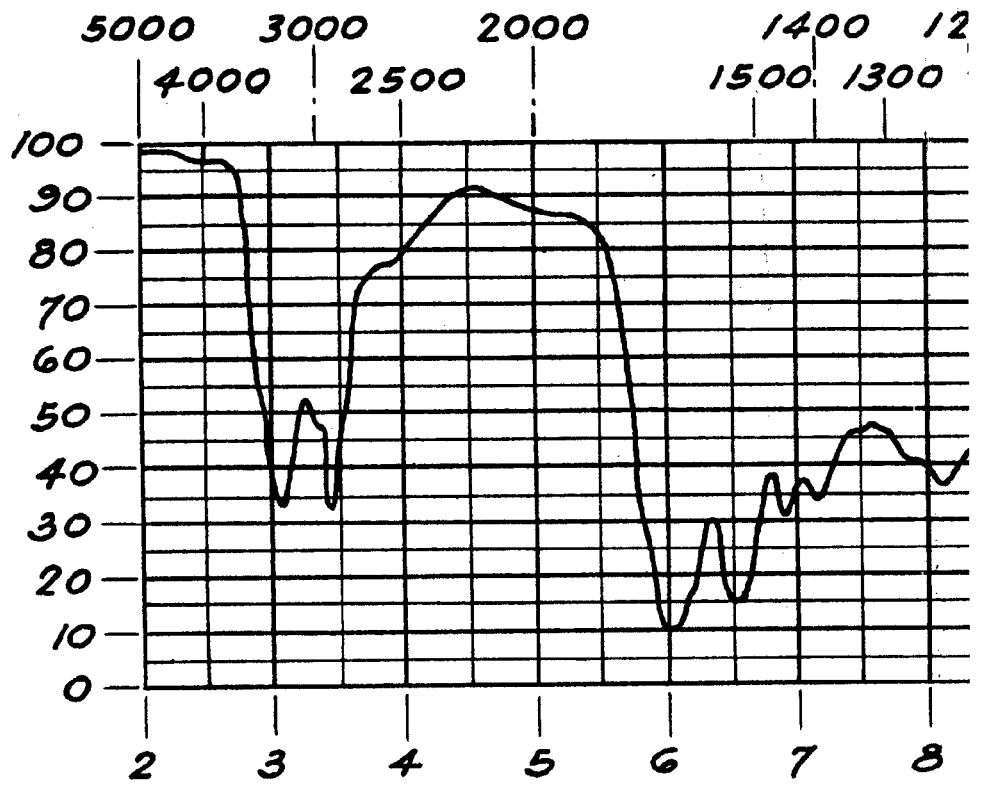
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en dibujo que se acompaña, y con los fines que se han especificado.

15 Esta Memoria consta de veintidos hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 3 FEB 1960

P.A.

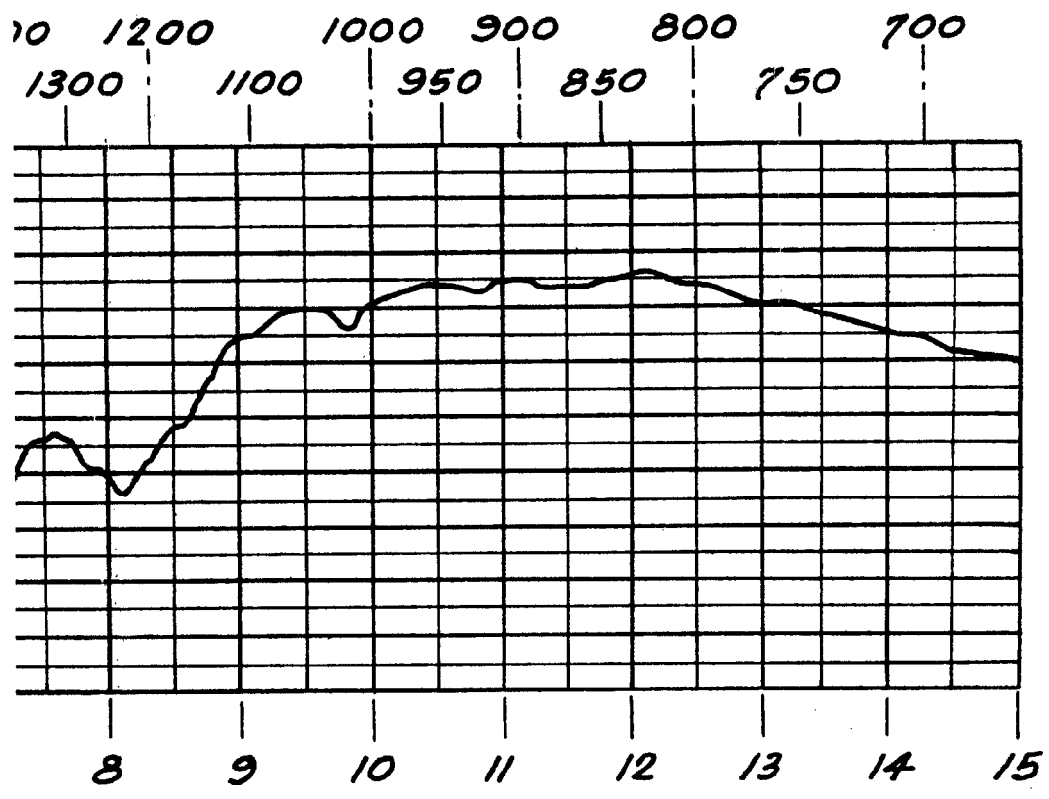
M.M. - *[Handwritten signature]*



Escala variable.



1917



1917
M. P. S.