

260287

PATENTE DE INVENCION

Le A 5643-Sp

260287



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la obtención de preparados
enzimicos disociadores de penicilina".

Solicitante:

FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad
alemana, residente en Leverkusen-Bayerwerk, Alemania.

Para la obtención del ácido 6-aminopenicilánico
se ha propuesto el dejar reaccionar sobre las penicilinas
suspensiones o extractos de aquellas bacterias disocia-
doras de penicilina, que preferentemente atacan la
5. unión amídica en la posición 6 de la molécula de la peni-



cilina.

Para la aptitud de las masas de bacterias para la disociación de la penicilina no es desde luego igual bajo que condiciones se han cultivado los organismos.

5. Si un caldo del pH 7,0, que además de los iones necesarios para el cultivo de microorganismos como fuente de N contiene iones de aluminio, hidrolisato caseínico o peptona de carne y como fuente de energía y de C glucosa, lactosa o sacarosa, se inyecta con una cepa de bacterias
10. adecuadas, entonces, después de cultivar bajo ventilación a unos 30°C, si bien se obtiene un rendimiento bastante elevado en material de células bacteriales, sin embargo, la capacidad disociadora de penicilina de estas células es muy reducida. Un cierto aumento de la actividad
15. enzimática deseada se obtiene al emplear glicerina o sales de ácidos orgánicos, tal como por ejemplo ácido láctico o ácido succínico como fuente de energía y de C.

- Se ha descubierto, que se puede aumentar la actividad disociadora de penicilina de bacterias si, antes
20. de dejarlas reaccionar sobre penicilinas, se cultivan según métodos en si conocidos, bajo ventilación, en tales caldos, que como máximo contengan insignificantes cantidades de hidratos de carbono fermentables y a los cuales se le ha agregado ácido fenilacético o sus
 25. derivados en cantidades de 0,002 hasta 2%, donde, en caso dado, durante el crecimiento se introduce dióxido de carbono.

- De acuerdo con la presente invención, se puede obtener una masa de célula de bacterias con buena
30. capacidad disociadora de penicilina, sin, como fuente



principal de energía y nitrógeno, se emplean mezclas de ácido amínico en forma de hidrolizados de albúmina o mezclas de pepturos en forma de peptonas o proteínas de mayor molecularidad para la preparación del caldo. Es conveniente agregarles a tales caldos, además de iones inorgánicos usuales, tales como SO_4^{--} , PO_4^{--} , Mg^{++} , K^+ , Na^+ , Cl^- , aún una mezcla de vitamina y material de crecimiento, tal como por ejemplo agua de levadura, en reducidas cantidades.

5.

10.

Mediante la adición de ácido fenilacético, sus sales y derivados al caldo se puede incrementar la actividad enzimática deseada de las bacterias. Además, se puede aumentar más aún la capacidad disociadora de penicilina de la masa de bacterias introduciendo en tales cultivos durante el crecimiento de las bacterias, además de aire, también dióxido de carbono.

15.

De acuerdo con la invención, como componente principal del caldo se emplea agua de remojo de maíz.

Esta contiene fuentes de energía y nitrógeno bien

20.

adecuadas, vitaminas y materias de crecimiento y además los iones inorgánicos arriba indicados. A este caldo base se le agregan, según la presente invención, ácido fenilacético, amida fenilacética, ácido fenacetúrico, ácido fenacetilglutamínico u otros derivados del ácido

25.

fenilacético. El dióxido de carbono se puede mezclar bien al aire empleado para el suministro de oxígeno a los cultivos o introducirse por separado de la ventilación dentro de los cultivos en crecimiento. La temperatura de los cultivos puede ser de 20 - x 40°C.

30.

Convenientemente se dejar crecer los cultivos durante



durante 12 horas a 37°C y después de este tiempo solo contiene 4200 u.i. de penicilina G por suspensión. El filtrado de una muestra de esta suspensión se reacciona según métodos conocidos con cloruro fenilacetílico y de esta manera se puede reactivar hasta a 4850 u.i. de penicilina G/cm³.

5.

EJEMPLO 2.

160 litros de solución de agua de remojo de maiz, esteril, preparada como en el ejemplo 1, pero sin la adición de glucosa, se inyectan con 400 cm³ de un cultivo de agitación de 18 horas de E.coli ATCC 11105. El preparado se ventila con 150 litros/minuto de aire a 150 revoluciones del mecanismo de agitación por minuto y se cultiva 17 horas a 31°C.

10.

15.

Las células de las bacterias se centrifugan del caldo, se lavan en 16 litros de solución de fosfato 1/15 m del pH 6,0 y después de centrifugar se suspende en 16 litros de solución de fosfato de compensación 1/5 m del pH 7,0. En esta suspensión se disuelve penicilina G seca hasta una concentración de 5000 u.i./cm³ y se agregan 0,4% de tolueno. El preparado se mantiene durante 5 horas a 37°C y después de este tiempo solo contiene 600 u.i. de penicilina G por cm³ de suspensión.

20.

25.

El filtrado de una muestra de esta suspensión se reacciona según métodos conocidos con cloruro fenilacetílico y de esta manera se puede reactivar hasta 4650 u.i. de penicilina G/cm³.

30.

En los ejemplos 1 y 2 no se adicionó ácido fenilacético al caldo. Por lo tanto los rendimientos eran malos. De los ejemplos a continuación se desprende ahora

250287



- 6 -

los elevados rendimientos que se logran si se trabaja en presencia de ácido fenilacético y sus derivados.

EJEMPLO 3.

5. 160 litros de solución de agua de remojo de maiz, obtenida según el ejemplo 2, pero con adición de 0,2% de acetato potasiofenílico se inyectan con 400 cm³ de un cultivo de agitación de 18 horas de E.coli ATCC 11105. El preparado se ventila con 150 litros de aire/minuto a 150 revoluciones del mecanismo de agitación por minuto y se cultiva durante 17 horas a 31°C.

10. Las células de bacterias se centrifugan del caldo, se lavan en 16 litros de solución de fosfato 1/15 m del pH 6,0 y después de centrifugar se suspenden en 16 litros de solución de fosfato de compensación 1/15 m del pH 7,0. En esta suspensión se disuelve penicilina G seca hasta una concentración de 10.000 u.i./cm³ y 0,4% de tolueno. El preparado se mantiene durante 5 horas a 30°C y después de este tiempo solo contiene 1500 u.i. de penicilina G por cm³ de suspensión. El filtrado de una prueba de esta suspensión se reacciona según métodos conocidos con cloruro fenilacetílico y de esta manera se pueden reactivar hasta a 9500 u.i. de penicilina G/cm³.

EJEMPLO 4.

25. 160 litros de solución de agua de remojo de maiz, obtenida como en el ejemplo 2, esteril, pero con adición de 0,2% de acetato potasiofenílico se inyecta con 400 cm³ de un cultivo de agitación de 18 horas de E.coli 11105. El preparado se ventila con 150 litros de aire/minuto a 150 revoluciones del mecanismo de agitación por minuto y se cultiva durante 17 horas a 31°C sin



sobrepresión. Durante todo el tiempo del crecimiento se introducen a través de una tubería separado de la tubería de aire del fermentador, 5 litros de dióxido de carbono por minuto en el cultivo.

5. Las células de bacterias se centrifugan del caldo, se lavan en 16 litros de solución de fosfato 1/15 m del pH 6,0 y después de volver a separar se suspenden en 16 litros de solución de fosfato de compensación 1/5 m del pH 7,5 que contienen 100 000 u.i. de penicilina G/cm³ y 0,4 % de tolueno. El preparado se mantiene durante 7 horas a 30°C. Durante este tiempo se mantiene el pH, que por el ácido fenilacético disociado encimáticamente de la molécula de penicilina baja a la zona ácida, mediante repetidas adiciones de solución de Na CO₂ 3 concentradas entre 7.0 y 7,5. Después de una reacción de 7 horas, el preparado contiene solo 12 000 u.i. de penicilina G/cm³ de suspensión. El filtrado de una muestra de esta suspensión se reacciona según métodos conocidos con cloruro fenilacetílico y de esta manera se puede reactivar hasta a 91 000 u.i. de penicilina G/cm³. El ácido 6-aminopenicilánico formado en este preparado se puede aislar con buen rendimiento como polvo incoloro, cristalino.
15. EJEMPLO 5.
25. 160 litros de caldo de agua de remojo de maiz, obtenido según el ejemplo 2, esteril, pero con adición de 0,2 % de acetato potasiofenílico se inyectan con 400 cm³ de un cultivo de agitación de 18 horas de E.coli ATCC 9637. El preparado se ventila con 150 litros de aire/minuto
30. a 150 revoluciones del mecanismo de agitación por minuto

260287



- 8 -

y se cultiva durante 17 horas a 31°C sin sobrepresión. Durante todo el tiempo de crecimiento se introducen a través de una tubería separada de la tubería de aire del fermentador 10 litros de dióxido de carbono por minuto en el cultivo.

5.

Las células de bacterias se centrifugan del caldo, se lavan en 16 litros de solución de fosfato 1/15 m del pH 6,0 y después de volver a separar se vuelven a suspender en 16 litros de solución de fosfato de compensación 1/5 m del pH 7,5 que contiene 50 000 u.i. de penicilina G/cm³ y 0,4 % de tolueno. El preparado se

10.

mantiene durante 3 horas a 30°C. Durante este tiempo se mantiene el pH, que por el ácido fenilacético disociado encimáticamente de la molécula de penicilina baja a la

15.

zona ácida, mediante repetidas adiciones de solución de Na CO₂³ concentrada, entre 7,0 y 7,5. Después de 3 horas de reacción el preparado contiene solo 4700 u.i. de penicilina G/cm³ de suspensión. El filtrado de una prueba

20.

de esta suspensión se reacciona según métodos conocidos con cloruro fenilacetílico y de esta manera se pueden reactivar hasta 46500 u.i. de penicilina G/cm³.

El ácido 6-aminopenicilánico, formado en este preparado, se puede aislar como polvo cristalino incoloro en buen rendimiento.

25.

N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se

30.

260287



- 9 -

hace constar que el invento corresponde a la solicitud de patente presentada en Alemania con fecha 24 de septiembre de 1959, nº F 29 458 IVa/30h, acogíendose por

5. lo tanto, a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor y siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España: "Procedimiento para la obtención de preparados encínicos disociadores de penicilina"; caracterizándose por lo siguiente:
- 10.

1º.- Procedimiento para la obtención de preparados encínicos disociadores de penicilina, caracterizado porque las bacterias disociadoras de penicilina se cultivan, según métodos en si conocidos, bajo ventilación en tales caldos, que como máximo contengan insignificantes cantidades de hidratos de carbono fermentables y a los cuales se les ha agregado ácido fenilacético o sus derivados en cantidades de unos 0,002 - 2%, conduciéndose, en caso dado, dióxido de carbono durante el crecimiento.

15.

20.

2º.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque como base del caldo principal se emplea agua de remojo de maíz.

- 25.
- 3º.- Procedimiento para la obtención de preparados encínicos disociadores de penicilina; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta memoria consta de nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

J. GÓMEZ ACEBO Y MODER