

MG.

Caso 8436

289.074

#5



289074

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

a favor de

MERCK & CO., INC. - de nacionalidad norteamericana - domiciliada en RAHWAY (New Jersey, E.U.) 126 East Lincoln Avenue.

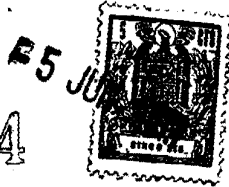
por:

"Procedimiento para preparar 5'-fosfatos de guanosina".

-----:oOo:-----

M e m o r i a D e s c r i p t i v a

Este invento se refiere a la preparación de 5'-fosfatos de guanosina, y más concretamente, al método de preparar estos 5'-fosfatos cultivando cepas adecuadas de microorganismos en medios de fermentación.



Los 5'-fosfatos de los diversos nucleósidos, tales como ácido guanílico y ácido inosínico, son aromatizantes valiosos para alimentos, bebidas y condimentos. La adición de pequeñas cantidades de estos nucleósidos mejora mucho el sabor de diferentes productos de las clases citadas.

Los 5'-fosfatos de nucleósidos se pueden preparar por hidrólisis enzimática del ácido ribonucleico. Sin embargo, este método de preparar tales productos resulta relativamente caro, y se han buscado otros más adecuados para producirlos a escala industrial.

Un objeto del presente invento es proporcionar un método económico para preparar 5'-fosfatos de guanosina por fermentación. Otro, proporcionar un método para obtener 5'-fosfatos de nucleósidos a partir del caldo de fermentación, Y otros más se deducirán de la descripción detallada siguiente del mismo.

De conformidad con el presente invento, se ha comprobado que pueden producirse 5'-fosfatos de guanosina cultivando cepas de B. subtilis con poca nucleotidasa en medios acuosos adecuados. El cultivo de estas cepas en medios adecuados de fermentación produce una acumulación de 5'-fosfatos de guanosina en el caldo de fermentación, del cual puede recuperarse el producto así obtenido.

La fermentación de la cepa de B. subtilis se efectua en medios acuosos que contienen generadores de carbono y nitrógeno asimilables por el organismo. Son generadores adecuados de carbono para uso en tales fermentaciones los carbohidratos como almidón, y maltosa; y como generadores de nitrógeno asimilable pueden emplearse harina de semillas de soja e hidrolizado de caseína.

289074



Se ha comprobado que la producción de los 5'-nucleótidos se estimula por la presencia de una pequeña cantidad de adenina, aunque esto no es esencial para la producción de los 5'-fosfatos de guanosina que interesan.

5 Los 5'-fosfatos de guanosina obtenidos de acuerdo con este procedimiento de fermentación son mezclas de monofosfato y difosfato de guanosina. Es posible también que el producto de fermentación contenga otros fosfatos, como el trifosfato de guanosina. El difosfato y el
10 trifosfato de guanosina recuperados de los caldos de fermentación pueden convertirse en monofosfato de guanosina por la acción del calor.

Las cepas de B. subtilis que sirven para llevar a cabo los procedimientos del presente invento comprenden
15 las que tienen poca nucleotidasa. Pueden obtenerse cepas adecuadas de B. subtilis con poca nucleotidasa por mutación según métodos muy conocidos en esta especialidad. Las cepas mutadas se ensayan del modo aquí descrito para determinar si producen los 5'-fosfatos de guanosina que interesan.

20 Una cepa de B. subtilis particularmente útil para producir tales compuestos se conserva en el Departamento de Agricultura de Peoria, Illinois, donde está disponible bajo el número de registro NRRL B-2911.

Los siguientes ejemplos ilustran métodos para
25 obtener los 5'-fosfatos de guanosina conforme al presente invento.

EJEMPLO 1º.-

Un medio de fermentación que contiene los componentes aquí enumerados se prepara como sigue:



289074

Extracto de harina de soja [*]	1 litro
Almidón soluble	80 g.
Citrato sódico	11,7 g.
Sulfato de adenina	0,015 g.
(NH ₄) ₂ HPO ₄	19,8 g.
KCl	1,5 g.
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,493 g.
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,147 g.

5

^{*} Se tratan al vapor 50 g. de harina de soja pulverizada durante una hora, en un litro de hidróxido sódico 0,025n, se filtran a través de tres capas de estopilla, y se completan con agua hasta un litro.

10

Se ponen 40 ml. de este medio en matraces de Erlenmeyer de 250 ml. y se esterilizan recipientes y contenidos quince minutos en autoclave, a 120°C.

15

A continuación se inocular el medio con 0,01 volumen de una suspensión diluida de un cultivo inclinado de B. subtilis NRRL B-2911 en amortiguador de fosfato 0,01m (pH 6). Los matraces inoculados se incuban luego a 28°C en un agitador giratorio, a 280 rpm. durante once días. Después del periodo de fermentación, el caldo se extrae con ácido perclórico al 7%, y el extracto neutralizado se valora microbiológicamente con B. subtilis G295 por el procedimiento que luego se describe.

20

La extracción con ácido perclórico se efectúa añadiendo 0,1 volumen de ácido perclórico al 70% al caldo de fermentación, centrifugando para retirar las proteínas precipitadas, y neutralizando la capa de encima con un álcali.

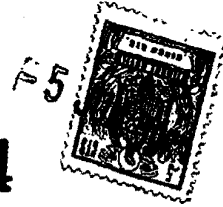
25

Una valoración del extracto perclórico reveló que el caldo contenía 255 mcg de equivalentes de guanina por mililitro. Alternativamente, pueden retirarse por centrifugación las células, y se valora el caldo que sobrenada.

30

La valoración se hace en un tubo microbiológico empleando B. subtilis G295, un mutante que requiera guanina y reaccione a ella, y nucleósidos y nucleótidos que contengan

289074



guanina. El medio de valoración biconcentrado contiene por litro:

5

Glucosa	20 g.
Hidrolisado de caseína NBC sin vitamina (ácido), exento de sales	20 g.
K ₂ HPO ₄	6 g.
KH ₂ PO ₄	2 g.
NH ₄ Cl	1 g.
NH ₄ NO ₃	0,2 g.
Na ₂ SO ₄	0,2 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,02 g.
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,002 g.
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0016 g.
CaCl ₂	0,0010 g.

pH = 6,8-7,0

10

Para valorar, el caldo centrifugado o el extracto perclórico neutralizado se pone en 20 tubos de ensayo de

175 mm. y se añade agua hasta 5 ml. y luego 5 ml. de reactivo 2X; los tubos se cierran con tapas de acero inoxidable. Se llevan los tubos a la autoclave y se inoculan con una gota

15

de una suspensión diluida de esporas de B. subtilis G295 (dos gotas de suspensión de esporas por 10 ml. de agua). Se

incuba durante 15 horas a 37°C en un agitador giratorio (220 rpm). Se incluye una serie de tubos que contienen de

0 a 100 mcg/ml. de monofosfato disódico de guanosina

20

(Na₂MPG·2H₂O), que corresponden a 0-34 mcg/ml. Después de la

incubación, se leen las densidades ópticas en el colorímetro Lumetron a 660 mμ. Los resultados se anotan en mcg/ml de

equivalentes de guanina. (Si toda la actividad proviniera

del MPG, el peso del Na₂MPG·2H₂O se obtendría multiplicando

25

los mcg/ml de equivalentes de guanina por 2,93).

Una porción del extracto perclórico, después de neutralizar como queda dicho, se sometió a cromatografía

sobre hojas circulares de papel Whatman n° 1, empleando sistemas

de disolventes 1 (n-propañol-NH₃-H₂O, 6:3:1), 2 (ácido

30

isobutírico-NH₄OH conc.-H₂O, 66:1:33) y 3 (ácido isobutírico

2890745



NH₄OH conc.-H₂O, 57:4:39]. En los tres sistemas, una de las bandas absorbentes de UV dió un R_f similar al de MPG (5'). El extracto neutralizado se examinó por cromatografía mixta con MPG (5') y con "ácido guanílico" comercial - mezcla presunta de MPG(2') y MPG(3') - en el sistema 1. El extracto dió una banda con MPG (5') pero no con ácido guanílico del comercio.

5

Las diversas bandas y las zonas intermedias, tras cromatografía del extracto neutralizado en el sistema de disolventes 1, se recortaron, se eluyeron con agua, se pusieron en tubos de bioanálisis y se inocularon con B. subtilis G295. Unicamente la banda de R_f 0,12 mostró bioactividad. Esta banda, en cromatografía mixta, coincidió con MPG(5') en sistemas 1, 2, 3 y 4 [(NH₄)SO₄ en amortiguador de fosfato 0,1m (pH 7)-n-propanol, 50:1], pero no al mezclar con ácido guanílico comercial.

10

15

El extracto neutralizado se aplicó a una columna de Dowex-1-X2, resina de intercambio aniónico. La columna, se lavó con HCl 0,005m. que separa la guanina y la guanosina; luego se eluyó con HCl 0,1m. que elimina los nucleótidos. Se valoraron las muestras, y el cálculo demostró que el caldo original contenía 50 mog/ml de guanina y guanosina, calculados como guanina, y 570 mog/ml de 5'-fosfatos de guanosina, calculados como Na₂MPG.2H₂O.

20

25

El eluato de resina con HCl 0,1m. se concentró por liofilización, y se sometió a cromatografía circular mixta con MPG(5') y ácido guanílico comercial en sistemas de disolventes 3 y 4. Solo con MPG(5') coincidió una de las bandas del eluato con la conocida.

30

El eluato de resina y la banda eluida del papel



289074

que duró diez días a 28°C se centrifugó el caldo, y el líquido sobrenadante se valoró como queda descrito. La valoración reveló la presencia de 200 mcg/ml de equivalentes de guanina.

5 Una porción del caldo clarificado se sometió a cromatografía sobre papel; se recortaron las bandas, se eluyeron con agua, y se cromatografiaron sobre Dowex-1-X2, según la técnica expuesta en el ejemplo 1°. La valoración de las muestras del eluato obtenidas lavando con HCl 0,005M y con HCl 0,1, sirvió para calcular que el caldo primitivo
10 contenía 270 mcg/ml de equivalentes de guanina y guanosina, y 380 mcg/ml de guanin-nucleótidos en forma de Na₂MPG.2H₂O.

EJEMPLO 4 2.-

En otra serie de experimentos, se cultivó
15 B. subtilis NRRL B-2911 en el medio descrito en el ejemplo 1°, con adición de 15 mcg/ml y 30 mcg/ml de sulfato de adenina, durante diez días a 28°C. En estos experimentos, el volumen del medio era de 20 ml por matraz de 250 ml. Terminada la fermentación, se centrifugó el caldo, y la capa
20 sobrenadante se valoró como queda descrito en el ejemplo 1°. La tabla siguiente expone los resultados:

<u>Sulfato de adenina</u> <u>mcg/ml.</u>	<u>Equivalentes de guanina</u> <u>mcg/ml</u>
15	240
30	295

EJEMPLO 5 1.-

25 Se preparó un medio como se ha descrito en el ejemplo 1°, empleando 80 g de maltosa en vez de almidón soluble. Se esterilizaron 20 ml del medio en un erlenmeyer de 250 ml, y se agregó sulfato de adenina a razón de 15 mcg/ml. El medio esterilizado se inoculó con B. subtilis NRRL B-2911

289074



y los matraces inoculados se incubaron en un agitador giratorio durante diez días. Terminada la fermentación, se centrifugó el caldo, y se valoró la capa sobrenadante conforme se expuso en el ejemplo 1º. Los resultados de la valoración constan en la siguiente tabla:

5

Equivalentes de guanina mcg/ml	Guanina y guanosina como guanina (mcg/ml)	Guanin-nucleótidos como $\text{Na}_2\text{MPG}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mcg/ml)
205	40	480

Los caldos de fermentación obtenidos cultivando una cepa particular de B. subtilis pueden ensayarse como se describe a continuación, para averiguar si contienen poca actividad de nucleotidasa y sirven por ello para producir 5'-fosfatos de guanosina de conformidad con este invento.

10

En este procedimiento, el caldo de fermentación se centrifuga, y 0,5 ml. del líquido que sobrenada se mezclan con 0,5 ml. de una solución acuosa de monofosfato dihidratado de guanosina disódica y con unas gotas de tolueno, y la mezcla se incuba durante 16 horas a 28° C. Se salpican con 10 microlitros de la muestra incubada resultante unas hojas circulares de papel (Whatman nº 1), y se someten a cromatografía en el sistema de disolventes 1 (n-propanol-NH₃-H₂O, 6:3:1), durante cuatro horas a temperatura ambiente. Luego se examinan los papeles a la luz UV, para hallar la intensidad de las bandas de 5'-fosfato de guanosina (R_f 0,14 y de guanosina más guanina (R_f 0,40). Las cepas de B. subtilis con poca nucleotidasa dan una banda de guanosina más guanina menos intensa que la de 5'-fosfatos de guanosina.

15

20

25



N O T A

Se reivindica como objeto de esta patente de invención:

5 1.- Procedimiento para preparar 5'-fosfatos de guanosina, el cual comprende el cultivo de una cepa de B. subtilis con poca nucleotidasa en un medio nutritivo acuoso que contenga generadores de nitrógeno y carbono asimilables, durante un lapso suficiente para acumular estos fosfatos en el caldo de fermentación.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cepa es de B. subtilis NRRL B-2911.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio nutritivo acuoso contiene una pequeña cantidad de adenina.

15 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se emplea harina de soja como generador de nitrógeno asimilable.

20 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se emplea hidrolizado de caseína como generador de nitrógeno asimilable.

6.- Procedimiento según la reivindicación, en el que se emplea maltosa como generador de carbono asimilable.

25 7.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se emplea almidón como generador de carbono asimilable.

30 8.- Procedimiento para preparar 5'-fosfatos de guanosina, el cual comprende el cultivo de una cepa de B. subtilis con poca nucleotidasa en un medio nutritivo

289074

25 JUN 1963



acuoso que contiene generadores de nitrógeno y carbono asimilables, y la recuperación de dichos fosfatos del caldo de fermentación resultante.

5

9.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la cepa es de B. subtilis NRRL B-2911.

10.- Procedimiento para preparar 5'-fosfatos de guanosina.

Esta memoria consta de once páginas escritas por una sola cara.

BARCELONA, 25 JUN 1963