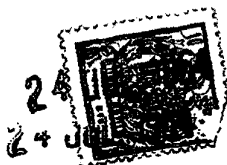


P- 26.958

Pos - 5089 kyowa

24 JUL 1964



300587

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

PATENTE D E INVENCION

formulada el 4 de Junio de 1964, con el Nº 300.587

e n

E S P A Ñ A

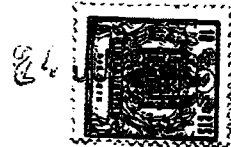
por VEINTE años

a nombre de KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD., entidad japonesa, establecida en 4, Ohtemachi -1- ohome, Chiyoda - ku, Tokyo, Japón, por:

" UN METODO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO 5'-INOSINICO "

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ácido 5'-inosínico en una escala industrial, es decir, a bajo costo y alto rendimiento.

El ácido 5'-inosínico, junto con el ácido cuanílico, ácido xantílico y otros nucleótidos de purina, ha encontrado rápidamente crecientes aplicaciones como condimento químico. De acuerdo con esto, se han propuesto un número de procedimientos para su fabricación en escala industrial. Estos métodos incluyen fermentación directa con microorganismos, conversión de bases nucleicas, obtenidas por síntesis química, en nucleótidos



por acción microbiana, y fosforilación del nucleótido formado por acción microbiana, a través de un tratamiento químico. Sin embargo, ninguno de los procedimientos hasta ahora propuestos está libre de dificultades técnicas, y se ha señalado que se requiere mucho trabajo y una inversión extensiva en equipo para la recuperación y refinado del nucleótido, porque se forma en bajas concentraciones.

La presente invención se refiere al descubrimiento de un procedimiento para acumular una gran cantidad del producto deseado, combinando eficazmente ciertos microorganismos que liberan enzimas singulares en su medio de cultivo.

La presente invención, por lo tanto, tiene como objetivo la provisión de un método aceptable industrialmente para la producción del preciado ácido 5'-inosínico, que está libre de las desventajas presentes en los procedimientos conocidos.

El procedimiento comprende (1) cultivar una mezcla de (a) un microorganismo que acumula una cantidad notablemente grande de Hipoxantina, y (b) un microorganismo que produce un sistema enzimático para la conversión directa de la base nucleica en nucleótido, o (2) cultivar separadamente dichos microorganismos y después mezclarlos juntos. El cultivo se lleva a cabo en un medio que contiene un sacárido no caro (hidrato de carbono), fuente de nitrógeno, sal inorgánica, y sustancias similares.

El mecanismo exacto del procedimiento por el que se forma el ácido 5'-inosínico no se conoce. Sin embargo, sin desear comprometerse con esto, parece que el proceso puede explicarse de la siguiente manera.

Como es sabido, la hipoxantina es una base que es

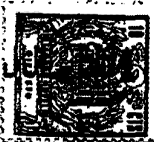
24 Jul



una parte constituyente del ácido 5'-inosínico, y puede ser un precursor del ácido. Pirofosforilasa de nucleótido es un término genérico para las enzimas que sintetizan nucleótidos sometiendo bases de ácido nucleico a la acción de pirofosfato de fosforribosilo o trifostato de adenosina y ácido riboso-5-fosfórico. Los microorganismos que poseen alta actividad de fosforribosil-pirofosforilasa producen ácido 5'-inosínico en presencia de hipoxantina y ácido D-riboso-5-fosfórico. Un procedimiento para la producción industrial de la sustancia deseada a bajo costo deberá entonces suministrar las unidades constituyentes del ácido 5'-inosínico, esto es, hipoxantina, ácido D-riboso-5-fosfórico, y un sistema de enzima que combine dichos constituyentes, de una manera barata y a cubierto de riesgos.

Los microorganismos convenientes en la presente invención como acumuladores de gran cantidad de hipoxantina son Brevibacterium ammoniagenes N° 7209-1 (ATCC N° 15454) y Brevibacterium ammoniagenes ATCC N° 15187 (raza mutante del ATCC N° 6872 obtenido por tratamiento con agentes químicos).

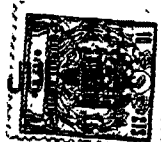
El microorganismo se cultiva en un medio de cultivo que permite a dicho microorganismo almacenar grandes cantidades de hipoxantina. A este medio de cultivo se hace referencia aquí como la semilla y los principales medios de cultivo. Se compone de materiales hidrocarbonados (sacarina) tales como glucosa, amilodextrina y otros sacáridos o melazas residuales; fuentes de nitrógeno tales como amoníaco o sales de amonio; sales inorgánicas tales como fosfato dibásico de calcio, fosfato monobásico de calcio, sulfato de magnesio, sulfato de potasio, cloruro de sodio, y cloruro de calcio. Si es necesario, el medio contiene extracto de



levadura, caseato, hidrolizao de glicina, peptona, licor de infusión de maiz y otros ingredientes que contienen factores para promover el crecimiento de dichos microorganismos y la acumulación de hipoxantina. El medio puede contener también 5 pequeñas cantidades de biotina, adenina y similares, que sirven para el propósito anterior.

Las antedichas razas se inoculan en el medio de cultivo de siembra de la composición precedente; y se cultiva a 30°C durante de unas 16 a unas 24 horas, con lo cual las células crecen bien. Después de esto, las células cultivadas se trasladan a los medios de cultivo principales, de tales composiciones que son adecuados para acumular hipoxantina. En estos medios principales, las razas se cultivan posteriormente mientras se airean con agitación a desde 28 hasta 40°C, durante de unos 2 hasta unos 4 días. Durante el cultivo, es deseable ajustar el pH a 6,0 hasta 8.0 con amoníaco o urea. La hipoxantina se acumula gradualmente con el consumo de sacáridos hasta que la producción de hipoxantina sube hasta 3 a 8 mg. por ml. de los medios. El líquido resultante se denomina líquido de cultivo A para el propósito de esta especificación.

Como microorganismos que poseen actividad para producir enzima sintetizante, es decir pirofosforilasa de nucleótido, pueden usarse razas mutantes de ambas especies de microorganismos citadas arriba, como capaces de acumular hipoxantina. Cultivando dichas razas mutantes de la misma manera que en el caso de los microorganismos acumuladores de hipoxantina, se obtiene un líquido de cultivo que tiene una alta actividad de pirofosforilasa de nucleótido. Esto es, se observa una aparición gradual de actividad de pirofosforilasa de nucleótido en unas 24 horas de cultivo aireado con agi



tación. La actividad alcanza el máximo en 54 a 66 horas cuando el azúcar en los medios se consume hasta el punto en que el porcentaje cae hasta 4 a 2%. El flúido preparado de esta manera se denomina flúido de cultivo B para los propósitos
5 de aquí.

Los medios empleados para el cultivo de este organismo son los mismos o similares a los empleados en cultivar los microorganismos acumuladores de hipoxantina, y el método de cultivo puede también ser el mismo, es decir, el cultivo
10 en un medio de cultivo de siembra seguido del cultivo en el medio de cultivo principal.

Los flúidos de cultivo A y B se obtienen de los cultivos de los microorganismos acumuladores de hipoxantina y de los microorganismos activos en pirofosforilasa de nucleótido, respectivamente. Estos flúidos de cultivo se mezclan en una adecuada relación, y se someten posteriormente al cultivo de aireación con agitación. La relación en la que los flúidos están presentes (A:B) puede ser desde 1:1 aproximadamente hasta 2:1 aproximadamente. Se prefiere sin embargo
15 que los flúidos se empleen en iguales proporciones aproximadamente.

En los medios de cultivo combinados, la hipoxantina se combina con ácido D-riboso-5-fosfórico acumulado en los medios, para formar ácido 5'-inosínico. El tiempo requerido
25 por la reacción es normalmente de unas 24 a 36 horas, aunque depende de las cantidades de precursor y enzima acumuladas en los flúidos de cultivo A y B. Esta reacción enzimática puede estimularse y estabilizarse posteriormente añadiendo diferentes sacáridos u otros nutrientes a los flúidos de cultivo A y B continuando la mezcla de estos.
30



Una vez observada acumulación completa de ácido

5'-inosínico en el medio combinado de cultivo, las células se separan por centrifugación por ejemplo. El líquido resultante se somete a tratamiento por intercambio iónico de la siguiente manera: Se deja pasar el líquido libre de células a través de Dia-ion SK1A (copolímero sulfonado de estireno y divinil benceno), se hace fluir con agua sobre resina de intercambio iónico, de modo que la sección por debajo de pH 2.0 sea adsorbida en Dia-ion SA21A (resina de intercambio de poliestireno y amonio cuaternario fuertemente básica), y después la sección del ácido inosínico se obtiene por extracción con ácido clorhídrico 0,5 N. El ácido 5'-inosínico puro se obtiene a partir de esta sección, una vez neutralizada con sosa cáustica y concentrada seguidamente.

Además del anterior procedimiento de cultivar dos flúidos de cultivo diferentes A y B en vasijas separadas, y después de esto mezclarlos juntos, es también posible inocular dos razas distintas en el mismo medio de cultivo al mismo tiempo o bien una un poco antes que la otra, y con esto dejarlas almacenar ácido 5'-inosínico a través de un cultivo simbiótico perfecto. En el flúido mezclado de cultivo, se ha teorizado que la hipoxantina producida por una raza A es convertida sintéticamente en ácido 5'-inosínico por una raza B que tiene actividad en pirofosforilasa de nucleótido u otra actividad en oxígeno. Este es un ejemplo típico de fermentación simbiótica por dos tipos de razas diferentes. En este caso, el ácido 5'-inosínico se recupera y se refina con una combinación de resinas de intercambio catiónico y aniónico, de la misma forma que el método previamente descrito. Se obtienen agujas de 5'-inosinato de sodio.



Siguiendo con este aspecto de la invención, es posible, por ejemplo, cultivar preliminarmente las diferentes razas de microorganismos en distintas porciones del medio de cultivo de siembra durante el período de tiempo deseado.

5 Continuyendo el acabado del cultivo preliminar, las respectivas células cultivadas pueden llevarse al medio de cultivo principal, donde el cultivo se lleva en forma simbiótica. La composición de los medios empleados en este aspecto de la invención es la misma que la empleada en los aspectos previamente señalados.

Habiendo así descrito la invención, ésta será ilustrada por los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no han de considerarse como limitativos de la invención, sino como meramente ilustrativos de ella.

15 Ejemplo 1

Preparación del fluido de cultivo A:

1) Cultivo de siembra:

20 Un medio de cultivo que comprende 3,0 % de glucosa, 2,0% de extracto de levadura, 1,0 % de peptona y 0,25% de cloruro de sodio, se esteriliza con calor a 120°C durante 15 minutos. Después, se inoculara Brevibacterium Ammoniagenes Nº 7209-1 (ATCC Nº 15454) en el medio anterior, y se cultiva con agitación a 30°C durante 24 horas.

2) Cultivo principal:

3 l. de un medio de cultivo que comprende 10% de glucosa, 0,5% de extracto de levadura, 0,4% de fosfato dibásico de potasio, 0,4% de fosfato monobásico de potasio, 0,4% de sulfato de magnesio, y 0,01% de cloruro de cal-

300587

24 JUL 1968

5 cio, se introducen en un fermentador de vibración de 5 l., se esterilizan con calor a 120°C durante 20 minutos, y se inoculan 300 ml. de flúido de cultivo de siembra preparado como arriba. Tras el cultivo durante tres días con el pH ajustado en 7,0 con agua amoniacal, la cantidad de hipoxantina en el medio cultivado se estima en 4,1 mg./ml.

Preparación del flúido de cultivo B:

1) Cultivo de siembra:

10 Un medio de cultivo que contiene 3,0% de glucosa, 2,0% de extracto de levadura, 1,0% de peptona, y 0,25% de cloruro de sodio, se esteriliza a 120°C durante 15 minutos, y se cultiva en este medio Brevibacterium Ammoniacum ATCC Nº 6872, con agitación a 30°C durante 15 24 horas.

2) Cultivo principal:

3 L. de un medio de cultivo que comprende 8% de glucosa, 0,4 % de extracto de levadura, 0,4% de fosfato dibásico de potasio, 0,4 % de fosfato monobásico de potasio, 0,4% de sulfato de magnesio y 0,01% de cloruro de calcio, se colocan en un fermentador de agitación de 5 l., se esterilizan por calor a 120°C durante 10 minutos, se inoculan 300 ml. del cultivo de siembra preparado como arriba, y se efectúa un posterior cultivo durante tres días, con el medio aireado con agitación por ejemplo, 25 mientras que el pH se mantiene en 7,0 con agua moniacal.

1,5 l. del flúido de cultivo A se mezcla con la misma cantidad del flúido de cultivo B. La mezcla se rellena con glucosa hasta el 5% del volúmen total, y posteriormente se se



mete a cultivo de aireación con el pH ajustado constantemente a 7,0 con agua amoniacal, durante tres días. La cantidad de ácido 5'-inosínico estimada con fermentación completa es de 12,6 mg/ml. 5 l. del flúido resultante se calientan para

5 coagular las células. La mezcla se centrifuga y las células se eliminan. Después de deja pasar el flúido a través de Dia-ion SK1a (nombre comercial de un producto de Mitsubishi Chemical Industries Ltd., Japón), copolímero sulfonado de es

10 intercambio de iónico, de modo que la sección por debajo de pH 2,0 sea adsorbida sobre resina de intercambio iónico Dia-ion SA21A (nombre comercial de un producto de la Mitsubishi Chemical Industries Ltd., Japón), resina de intercambio fuer

15 témente básica, de poliestireno-amonio cuaternario), y después extraído con ácido clorhídrico 0,5 N, cuando se han obtenido 240 ml de la sección del ácido inosínico. Esta sección, una vez neutralizada con sosa cáustica y seguidamente concentrada, produce 42,8 g de 5'-inosinato de sodio cristalino.

Ejemplo 2

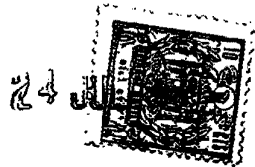
20

Preparación del flúido de cultivo A:

1) Cultivo de siembra:

Un medio de cultivo que contiene 3,0% de glucosa, 4,0% de pez soluble, 1,0% de peptona, y 0,25% de cloruro de sodio se esteriliza calentando a 120°C durante 15 minutos, y después se inocular Brevibacterium Ammoniagenes ATCC Nº 15187 (raza mutante del ATCC Nº 6872), y se cul

25 tiva con agitación en este medio a 30°C durante 24 horas.



2) Cultivo principal:

3 l. de un medio de cultivo que comprende 10% de glucosa, 1,0% de salvado de arroz, 1,0% de hidrolizado de torta de glicina, 0,6% de fosfato dibásico de potasio, 0,6% de fosfato monobásico de potasio, 0,6% de sulfato de magnesio, y 0,01% de cloruro de calcio, se introducen en un fermentador de vibración de 5 litros, se esterilizan con calor a 120°C durante 20 minutos, y después se inoculan 300 ml. del medio de cultivo preliminar de dichas razas preparadas como arriba. Con el pH ajustado a 7,0 con agua amoniacal, el cultivo se continúa posteriormente a 30°C durante 3 días. A las 60 horas después de la inoculación, la hipoxantina en el medio cultivado se estima en 3,2 mg/ml.

15 Preparación del flúido de cultivo B:

1) Cultivo preliminar:

Un medio de cultivo que contiene 3% de glucosa, 2,0% de licor de infusión de maíz, 1,0% de peptona, y 20 µg/l de biotina se esteriliza calentando a 120°C durante 15 minutos, y después se cultiva Brevibacterium Ammonigenes ATCC Nº 6872 en este medio con agitación, a 30°C durante 18 horas.

2) Cultivo principal:

3 l. de un medio de cultivo que comprende 8% de glucosa, 1,0% de licor de infusión de maíz, 0,4% de fosfato dibásico de potasio, 0,4% de fosfato monobásico de potasio, 0,4% de sulfato de magnesio, 0,01% de cloruro de calcio, y 30 µg/l de biotina, se colocan en un fermentador de vibración de 5 l. se esterilizan por calefacción a 120°C durante 20 minutos, y se le inoculan 300 ml del

24



medio cultivado preliminar. El medio se somete a cultivo de aireación con agitación a 30°C durante 48 horas, con el pH ajustado de 6,8 a 8,0 con solución de urea al 15%.

5 2 l. del fluido de cultivo A se mezclan con 1 l. del fluido de cultivo B, y la mezcla se airea posteriormente con agitación a 32°C. En 48 horas después de la mezcla, la cantidad de ácido inosínico en el fluido mezclado se estima en 8,5 mg/ml.

10 2 l. de este fluido, bajo tratamiento de la misma manera que en el ejemplo 1, proporciona 11,35 g de 5'-inosinato de sodio cristalino.

Ejemplo 3

15 1) Cultivo de siembra:

Un medio de cultivo que contiene 3,0% de glucosa, 2,0% de extracto de levadura, 1,0% de peptona, y 0,25% de cloruro de sodio se esteriliza calentando a 120°C durante 15 minutos. En diferentes porciones de este medio se cultivan separadamente, con agitación a 30°C durante 24 horas, una raza productora de hipoxantina, es decir Brevibacterium Ammoniagenes N° 7209-1 (ATCC N° 15454) (A), y un microorganismo productor de pirofosforilasa de nucleótido, o sea Brevibacterium Ammoniagenes ATCC N° 6872 (B)

2) Cultivo principal:

3 l. de un medio de cultivo que comprende 12% de glucosa, 1,0% de extracto de levadura, 0,5% de fosfato dibásico de potasio, 0,5% de fosfato monobásico de potasio, 0,5% de sulfato de magnesio, y 0,01% de cloruro



de calcio, se introducen en un fermentador de vibración de 5 l., se esterilizan con calor a 120°C durante 20 minutos, se le inoculan 300 ml. del medio cultivado preliminar de la raza (A) arriba mencionada, y se somete a cultivo de aireación con agitación durante 120 horas, mientras el pH se mantuvo en 7,0. Después, se inoculan en el mismo medio 300 ml del medio cultivado de la raza (B), y se cultiva posteriormente durante 72 horas. La acumulación de ácido 5'-inosínico en el flúido de cultivo llega a 5,0 mg/ml.

2 l. de este flúido de cultivo se tratan de la misma manera que en el ejemplo 1. Se obtienen agujas de 5'-inosinato de sodio en una cantidad equivalente a 8,2 g de producto puro.

Ejemplo 4

15

Se usa Brevibacterium Ammoniagenes N° 7209-1 (ATCC N° 15454) como raza productora de hipoxantina, y se cultiva durante 72 horas de la misma forma que la ilustrada en el ejemplo 1. La hipoxantina almacenada en el medio de cultivo llega hasta 4,3 mg/ml. Este medio de cultivo se centrifuga para quitar las células, y, al flúido residual, se añaden 10% de glucosa, 0,4% de fosfato dibásico de potasio, 0,4% de fosfato monobásico de potasio, 0,4% de sulfato de magnesio, 30 γ/l de biotina, y 2 γ/ml de D-pantotenato de calcio. La mezcla se esteriliza calentando a 120°C durante 10 minutos, y se le inocula Brevibacterium Ammoniagenes ATCC N° 6872, cultivado de la forma ilustrada en el ejemplo 1, en una cantidad equivalente al 5% de la cantidad total. La raza se cultiva a 30°C durante 96 horas, mientras el pH se ajusta a 7,0 con agua amoniacal. Se for-

30

24 JUL



man 9,8 mg. de ácido 5'-inosínico por ml. del medio cultivado. Bajo tratamiento por el mismo método que el descrito en el ejemplo 1, 2 l. del flúido dan 5'-inosinato de sodio cristalino en una cantidad equivalente a 12,4 g de producto puro.

Ejemplo 5

Se siguió el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, excepto que se usa como raza productora de hipoxantina Brevibacterium Ammoniagenes ATCC Nº 15187. Se acumulan 5,2 mg/ml de hipoxantina en el medio cultivado. El medio cultivado de arriba se esteriliza con calor. Se añade al medio cultivado (preparado de la misma forma que en el ejemplo 1), Brevibacterium Ammoniagenes ATCC Nº 6872, cultivado separadamente en un fermentador de agitación de 5 l. La adición se hace a las 24, 36 y 48 horas de cultivo, cada vez en una cantidad equivalente al 80% del medio cultivado total. Las mezclas se agitan lentamente mientras la temperatura se mantiene a 30°C.

30 horas después de la adición, se estiman las cantidades de ácido 5'-inosínico en los respectivos fermentadores de vibración. Los valores analíticos obtenidos son como los tabulados abajo:

	<u>Tiempo de adición</u>	<u>Cantidad</u>
25	24 horas después del comienzo del cultivo	5,8 mg/ml
	36 " " "	7,6 "
	48 " " "	8,1 "

Como se pueden hacer muchas inclusiones de la in-
vención aparentemente muy diferentes sin salirse del espí -

300587



ritu y objeto de la misma, es de advertir que la invención no ha de limitarse a las inclusiones específicas de esta parte, sino como está definida en las reivindicaciones anexas.

5 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Japón, con fecha 6 de Junio de 1963, bajo el Nº 28753/63, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1.- Un método para la producción de ácido 5'-inosinico por fermentación de microorganismos que comprenden de cultivar en un medio de cultivo una mezcla de (1) un medio cultivado obtenido a partir del cultivo en un medio de cultivo de un mutante acumulador de hipoxantina de un *Brevibacterium ammoniagenes*, y (2) un medio cultivado obtenido a partir del cultivo en un medio de cultivo de un microorganismo que tiene una gran actividad en pirofosforilasa de nucleótido de *Brevibacterium ammoniagenes*, y aislar posteriormente el ácido 5'-inosinico así formado.

2.- Un método de acuerdo con el punto 1 en que los medios cultivados (1) y (2) son preparados en medios de cultivos separados y combinados posteriormente en un

solo medio de cultivo para cultivo posterior.



3.- Un método de acuerdo con el punto 1 en que los medios cultivados (1) y (2) son obtenidos por cultivo simbiótico de los microorganismos.

5 4.- Un método de acuerdo con el punto 1 en que los medios cultivados (1) y (2) obtenidos cultivando el microorganismo acumulador de hipoxantina en una parte de un medio de cultivo mientras que sustancialmente al mismo tiempo se cultiva el microorganismo con actividad en pirofosforilasa de nucleotido en una parte separada del mismo medio de cultivo.

5.- Un método de acuerdo con el punto 1 en que los medios cultivados (1) y (2) están presentes en el medio de cultivo final en cantidades sustancialmente iguales.

6.- Un método de acuerdo con el punto 1 en que el microorganismo acumulador de hipoxantina es *Brevibacterium ammoniagenes* n° 7209-1 ATCC n° 15454 y el microorganismo con actividad en pirofosforilasa de nucleotido es *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC n° 6872.

7.- Un método de acuerdo con el punto 1 en que el microorganismo acumulador de hipoxantina es de *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC N° 15187 y el microorganismo con actividad en pirofosforilasa de nucleotido es *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC n° 6872.

8.- Un método de acuerdo con el punto 3 en el que los microorganismos empleados en el cultivo simbiótico son *Brevibacterium ammoniagenes* N° 7209-1 ATCC N° 15454 y *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC N° 6872.

9.- Un método de acuerdo con el punto 1 en el que la separación del ácido 5'-inosínico es efectuada centrifugando el medio de cultivo final para separar las células del

300587



líquido y sometiendo posteriormente al líquido resultante a un tratamiento de intercambio iónico efectuando así la separación del ácido 5'-inosínico.

10.- Un método para la producción de ácido 5'-inosínico.

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

La presente Memoria consta de dieciséis hojas, escritas a máquina por una sola cara.

10

Madrid, 24 JUL 1964

Roberto de Elzaburu
Pablo Pedraza
[Handwritten signature]

300587

PPR.

M. Chan