

302471

16 DIC. 1964

P - 27.225

Pos 5110 Kyowa



REHECHA I

302471

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

PATENTE D E INVENCION

formulada el 28 de Julio de 1.964, con el N^o 302.471

e n

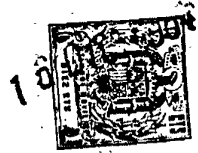
E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD., entidad japonesa, establecida en 4, Ohtemachi-1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japón, por:
"UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR D-RIBOSA-5-FOSFATO POR FERMENTACION"

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir D-ribosa-5-fosfato y D-ribosa, cultivando microorganismos en medios apropiados.

De ordinario, los procedimientos en uso hasta ahora para la manufactura de D-ribosa-5-fosfato (por ejemplo a partir de ácido inosínico) y de D-ribosa (por ejemplo por hidrólisis de ácido nucleico de levadura) dependen de la descomposición de sustancias relacionadas con el ácido ribonucleico, y por tanto son bastante caros. No se ha informado hasta ahora sobre la producción de D-ribosa-5-fosfato o D-ribosa por fermentación directa con microorganismos.



La presente invención se basa en la observación de que en fermentaciones efectuadas con una amplia variedad de microorganismos, en medios que contienen concentraciones relativamente altas de sales metálicas, particularmente sales de potasio, sales de magnesio y fosfatos, se acumula una cantidad notablemente grande de D-ribosa-5-fosfato en el fluido de fermentación, y que la adición a los medios de fermentación de sales de metales tales como manganeso, hierro y cinc en concentración relativamente grande, ya sea solos o en combinación, tiene como resultado la formación y acumulación en el fluido de fermentación de grandes cantidades de D-ribosa.

Se ha descubierto, según la presente invención, que la observación descrita en el párrafo precedente no es específica para ningún microorganismo o cepas en concreto, y que, de hecho, la presente invención es aplicable a cepas de microorganismos que pertenecen a los géneros Micrococcus, Brevibacterium, Aerobacter, Corynebacterium, Bacillus, etc. Según esto, la presente invención no se puede restringir a cualquier microorganismo particular o a cepas de cualquier clasificación bacteriológica específica. La presente invención es también aplicable a mutantes que requieren nutrientes obtenidos por diversos tratamientos inductivos de mutación.

El medio de cultivo para usar según la presente invención puede ser cualquiera que contenga cantidades adecuadas de sacáridos y otras fuentes de carbono (por ejemplo glucosa, almidón, hidrolizados de almidón y melazas), fuentes de nitrógeno (por ejemplo urea, cloruro amónico y nitrato amónico), compuestos inorgánicos (por ejemplo fosfato potásico, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de cinc, sulfato de hierro, cloruro de hierro, cloruro de cinc y cloruro cálcico), y materiales naturales que contienen nitrógeno (por ejemplo líquido de maceración de grano, extrac-

302471



304

to de levadura, extracto de carne, peptona, hidrolizados de protei
na y harina de pescado. En el caso de cepas mutantes que requieren
nutrientes se deben añadir a los medios desde luego, los materia-
les nutrientes necesarios para el crecimiento de estos mutantes, -
5 con objeto de producir D-ribosa-5-fosfato, por ejemplo, se añade a
los medios de cultivo un compuesto que tenga un radical fosfato, -
sal de magnesio y sal potásica, en concentraciones mayores que pa-
ra los medios empleados usualmente para fermentación bacteriana, -
preferiblemente en cantidades equivalentes a 0,2 a 2,0% en peso de
10 un compuesto que tenga un radical fosfato, de 0,01 a 0,2% en peso
de sal potásica (como iones potasio).

Para la formación de D-ribosa se deben añadir a los medios
sales de metales tales como manganeso, hierro y cinc, ya sea indi-
vidualmente o en mezclas, de forma que puede haber presente en los
15 medios de 0,001 a 1% en peso/volumen de tales iones metálicos. El
símbolo "p/v" (tanto por ciento en "peso en volumen") expresa el -
número de gramos en 100 mililitros de solución.

Según la presente invención, la fermentación se efectúa de
forma aerobia, por ejemplo agitando o aireando un dispositivo de -
20 fermentación, a una temperatura del cultivo de 20 a 40°C. Después
de un periodo de cultivo de 2 a 8 días, en el fluido de cultivo y
en las células se forma una cantidad notablemente grandes de D-ri-
bosa-5-fosfato o D-ribosa.

Al finalizar la fermentación, se puede recuperar D-ribosa-5
25 -fosfato o D-ribosa por tratamiento con resina de intercambio de -
ión, adsorción, precipitación y extracción, tal como se describe en
los ejemplos que se presentan más adelante, que son simplemente -
ilustrativos y de ninguna forma restrictivos de la presente inven-
ción. En estos ejemplos los tanto por ciento son en peso, a no ser
30 que se indique la contrario.

302471



Ejemplo 1

Se usa en la fermentación Brevibacterium ammoniagenea ATCC nº 6872. Para la preparación de la inoculación se vierten en un frasco cónico 30 ml (mililitros) de un medio de cultivo acuoso que contiene 2% de glucosa, 1% de peptona, 1% de extracto de levadura y 0,25% de cloruro sódico, se esterilizan y se cultiva la cepa anterior con agitación, en este medio,, a 30°C durante 24 horas. Separadamente se prepara el medio de fermentación que tiene la composición siguiente, en los frascos de 250 ml, en porciones de 20 ml, y se esterilizan, se inoculan con el anterior cultivo de inoculación, y luego se agitan, siguiendo la inoculación para ulterior cultivo, a 30 °C.

Glucosa	10%	MgSO ₄ 7H ₂ O	1,0%
Urea	1,0%	Biotina	30 /litros
KH ₂ PO ₄	1,0%	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,01%

Después de la esterilización se ajusta el pH a 8,0.

Así, en el fluido de fermentación cultivado durante 100 horas se acumulan 13,5 mg/ml de D-ribosa-5-fosfato. También se observa en las células la acumulación del mismo producto.

Se separan las células del fluido de fermentación y se añade hidróxido cálcico a un litro del filtrado, y luego se elimina el fosfato inorgánico por centrifugación. El fluido que sobrenada se hace pasar a través de una columna de Dia-ion SA nº 21A (tipo C1) (resina de intercambio de catión fuertemente ácida, tipo ácido poliestirén sulfónico, disponible de Mitsubishi Chemicals Co., Ltd., Japón), provocando así la adsorción de D-ribosa-5-fosfato. Luego se eluye con NaOH acuoso 1N y la fracción D-ribosa-5-fosfato se hace pasar a través de una columna Dia-ion SK nº 1 (tipo H) (resina de

302171



intercambio de anión fuertemente básica, tipo poliestireno amonio cuaternario, disponible de Mitsubishi Chemicals Co. Ltd., (Japón), se ajusta a un pH igual a 6,5 y luego se concentra bajo presión reducida. La solución concentrada se decolora con una pequeña cantidad de polvo de carbón activo, se ajusta a un pH 8,0 con sosa caústica acuosa y, con adición de cantidades calculadas de acetato bórico y luego alcohol, se deja sedimentar la sal de bario resultante de D-ribosa-5-fosfato. Después de secar, el precipitado produce 18,4 g de D-ribosa-5-fosfato ($BaC_5H_9O_8P_5 \cdot 1/2 H_2O$), de color blanco.

Ejemplo 2

El medio de cultivo de siembra acuoso comprendía 2% de glucosa, 1% de peptona, 1% de extracto de levadura y 0,25% de NaCl, y el medio de fermentación acuosa comprendía 10% de glucosa, 0,3% de urea, 0,2% de KH_2PO_4 , 0,1% de K_2HPO_4 , y se usa 0,01% de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. El Micrococcus glutamicus KY3803 (ATCC nº 15455) se cultiva completamente de la misma forma que en el Ejemplo 1, excepto en que se añade 0,8 de KH_2PO_4 y 0,3% de K_2HPO_4 48 horas después del comienzo de la fermentación. Al cabo de 120 horas se acumulan 8,9 mg de D-ribosa-5-fosfato por mililitro de fluido de fermentación. Después de separar las células del fluido de fermentación, se somete 1 litro del filtrado a las mismas etapas del Ejemplo, con lo que se obtienen 11,2 g de sal cristalina de bario de D-ribosa-5-fosfato.

Ejemplo 3

Se usa Brevibacterium ammoniagenes ATCC nº 6872. Se vierten 300 ml del mismo medio de cultivo de siembra del Ejemplo 1 en un frasco de 2 litros, y se esteriliza, y luego se cultiva

32471



la capa anterior en este medio, agitando, a 30°C, durante 21 horas.

Un medio de fermentación preparado separadamente se inocula con aproximadamente 10 % en volumen del fluido de cultivo anterior. Se vierten 3 litros del mismo medio de fermentación del Ejemplo 1 en un fermentador de jarra de 5 litros, y se esteriliza. En 72 horas de cultivo a_ireado con agitación, se acumulan 20,5 mg de D-ribosa-5-fosfato por mililitro del fluido de fermentación. También se observa la acumulación del compuesto en las células.

Después de separar las células del fluido de fermentación, se somete 1 litro de filtrado al mismo tratamiento del Ejemplo 1, y produce 27,5 g de sal de bario de D-ribosa-5-fosfato.

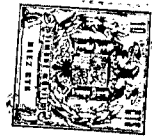
Esta solicitud que corresponde a la presentada en Japón, con fecha 29 de Julio de 1.963, bajo el Número 87.734/63 y 8 de Agosto de 1963, bajo el Número 40.697/63, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- N O T A -

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

1.- Un procedimiento para producir D-ribosa-5-fosfato por fermentación, que comprende cultivar un microorganismo que produce D-ribosa-5-fosfato en un medio de cultivo acuoso que contiene sacárido y que contiene de 0,20 a 2,0 % en peso de fosfato, como radical de ácido fosfórico, 0,01 a 0,2 % en peso de sal de magnesio como ion magnesio, y 0,1 a 1,5 % en peso de sal de potasio como ion potasio, y recuperar el D-ribosa-5-fosfato acumulado.

2.- Un procedimiento para producir D-ribosa-5-fosfato por



fermentación.

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

La presente Memoria consta de siete hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid,

16 DIC. 1964

P. A.

Alberto de Szabura
Por FODA

302471