



307506

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

por V E I N T E años

en España, a favor de la firma Z Aidan Hojin Blseibut
SU KAGAKU KENKYUKAI, de nacionalidad japonesa, resi-
dente en 403 Kasiosaki-Nakamaru, Shinagawa-Ku TOKYO,
(Japón), cuya Patente tiene por objeto:

"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA SUSTANCIA AN
TIBIOTICA PARA LAS PLANTAS".

- o - o - o - o - o - o - o - O - o - o - o - o - o - o -

M E M O R I A D E S C R I P T I V A

Este invento se refiere a una nueva sus-
tancia útil llamada kasugamycin, y a su producción.
Más concretamente, se refiere a los procedimientos -
de su producción por fermentación y a los métodos -
para su recuperación y purificación. Este invento -
comprende éste agente antimicrobiano y sus sales de

307506



- adición ácidas en soluciones diluidas, como concentrados crudos, como sólidos crudos, como sólidos purificados y en formas cristalinas puras. Esta sustancia es eficaz para inhibir el crecimiento de las
- 5.- Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Brucella, y algunas Klebsiella. Esta sustancia no es tóxica y exhibe un efecto terapéutico sobre las infecciones de Pseudomonas y otros organismos sensibles en ratones. Esta sustancia es útil para curar las infecciones
- 10.- de Pseudomonas y otros organismos sensibles en los seres humanos y en los animales. Además, esta sustancia es eficaz para inhibir el crecimiento de la Piricularia oryzae que produce una enfermedad mortal en la planta del arroz. Esta sustancia no es tóxica para las plantas y exhibe un efecto preventivo de las infecciones de Piricularia oryzae en las plantas de arroz. Esta sustancia es útil para la prevención de la enfermedad de la planta de arroz:
- 15.-

- Se aporta ahora, según el presente invento
- 20.- una sustancia antibiótica eficaz para inhibir Pseudomonaceae, Salmonella, Shigella, Brucella y algunas Klebsiella, y Blastmyces, siendo soluble en agua, substancialmente insoluble en metanol, etanol, acetona, etil acetato, éter, cloroformo y benceno, no
- 25.- exhibiendo absorción de luz ultravioleta desde 200 -

307506



- mp a 400 mp, dando reacción positiva al reactivo -
nihidrina en piridina, dando reacción negativa a -
las reacciones Sakaguchi, Molisch, Elson-Morgan, -
Fehling, Tollens, y cloruro férrico, dando hidro -
5.- cloruro cristalino que exhibe bandas de absorción
características en la región infrarroja del espectro
cuando se granula con bromuro de potasio en los si--
guientes números de onda cm^{-1} : 3520, 3350, 3200, --
3070, 2950, 2050, 1695, 1670, 1625, 1522, 1462, 1379
10.- 1323, 1286, 1224, 1180, 1135, 1120, 1090, 1080, 1060
1042, 1025, 975, ,945, 908, 890, 870, 846, 825, 783, -
709, que exhibe dextrorrotación de $(\alpha) ^{25}_{\text{D}} + 120^{\circ}$ ---
(C 1,6 H_2O), que tiene la fórmula empírica:
 $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{O}_{10}\text{N}_3$. $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, que funde a 202- 204^a C. bajo
15.- descomposición, la volumetrización de la cual muestra
 PK'_{a} 7,1 y el valor equivalente de unos 453; siendo -
otras propiedades de dicha kasugamycina que forma -
sal cristalina con el ácido hidrobromico, ácido sul-
fúrico, etc., que la hidrólisis ácida de kasugamici-
20.- nada (+)-inositol, la metanolisis de la parte resi-
dual en la forma metilada, y la hidrólisis con bari-
ta de $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_{10}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ que se hidroliza después a --
 $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{N}_2$ y ácido oxálico.

Con referencia a los dibujos:

- 25.- La figura 1^a.- Es una curva del espectro -
de absorción infrarrojo del hidrocloruro de kasuga--



micina tomado con bromuro de potasio.

5.- La figura 2ª.- Es la curva del espectro de resonancia magnética nuclear tomado en D₂O, utilizando la sal sódica del ácido 3 (trimetilsilil)propanosulfónico como standard.

10.- Se aporta además conforme al presente invento un procedimiento para la producción del antibiótico kasugamicina en una solución de carbohidrato acuosa conteniendo un material nitrogenoso bajo condición aerobia hasta que se acumula una cantidad importante de kasugamicina en dicha solución.

15.- La kasugamicina es un antibiótico nuevo descubierto por los presentes inventores. El organismo productor del antibiótico del presente invento fué hallado primero por los inventores presentes y fué aislado de una muestra de suelo recogida en el santuario de Kasuga, Nara, Japón, y es una nueva especie, denominada Streptomyces kasugaensis, del género Streptomyces. En la American Type Culture Collection, Washington, D.C. se ha depositado un cultivo del organismo vivo aislado del suelo con la designación de laboratorio M338-M1, añadiéndose a la colección permanente de microorganismos como A.T.C.C. Núms. 15714 y 15715.

25.- El Streptomyces kasugaensis tiene las siguientes características:

307506



- 1) Observación microscópica: Substrata la rama de micelio finamente y produce un micelio aéreo largo cuyas puntas aparecen parcialmente como lazo o espiral con formación de cadenas de esporas.
- 5.- No se observó verticilo. En el microscopio electrónico, la superficie de las esporas es lisa sin estructura espinosa o capilar.
- 2) En placa de ágar Czapek de glicerol - (ágar glicerol nitrato) incubada a 27° C: Crecimiento coloreado de crema a gris olivo o marrón amarillento. Escaso micelio aéreo blanco. Pigmento oliva pálido o marrón amarillento pálido en el medio.
- 10.-
- 3) En placa de ágar de asparagina glucosa Krainsky, incubada a 27° C: Crecimiento con color crema a marrón claro o con tinte marrón rojizo. Micelio aéreo blanco a oliva claro u oliva gris. Pigmento amarillento obscuro o marrón amarillento obscuro en el medio.
- 15.-
- 4) En placa de ágar de malato de calcio, - incubada a 27° C: Crecimiento con color amarillo -- marfil. Micelio aéreo coloreado de blanco a arenoso. Sin pigmento soluble. El malato de calcio alrededor del crecimiento es disuelto generalmente y se hace transparente, pero en caso de crecimiento pobre, no se observa esta característica.
- 20.-
- 25.-



307506

- 5) En placa de ágar de almidón, incubada a 27° C: Crecimiento coloreado de amarillo marfil, Micelio aéreo blanco. Sin pigmento soluble. La actividad hidrolítica es débil o ninguna.
- 5.- 6) En solución de peptona conteniendo el 0,2 % de NaNO_3 , incubada a 37° C: Crecimiento sin color en la superficie. Sin micelio aéreo. Sin pigmento soluble. El nitrato es reducido.
- 7) En sesgo de ágar nutriente, incubada a 10.- 37° C: Crecimiento con color crema a marrón amarilllo pálido o con color marrón rojizo. El micelio aéreo se produce escasamente. Sin pigmento soluble.
- 8) En leche desnatada, 37° C: Crecimiento 15.- incoloro sin micelio aéreo. Generalmente no se observa coagulación y peptonización, pero ocasionalmente se observó coagulación débil y peptonización. Sin pigmento soluble.
- 9) Cultivo de gelatina traspasada, incubada a 18 - 20° C: Crecimiento incoloro, 20.- ocasionalmente coloreado en marrón rojizo. Pigmento marrón pálido soluble. Ocasionalmente se observó licuefacción de la gelatina.
- 10) Utilización de fuentes de carbono para crecimiento en medio basal de Fridham-Gottlieb, 25.- incubada a 27° C: se utilizaron glucosa, fructosa, galactosa, manosa, inositol, maltosa y



rafinosa, dando abundante crecimiento. Ramnosa, sorbitol salicina, dulcitol, sucrosa e inulina se utilizan pobremente. Arabinosa, lactosa, dextrina y almidón se utilizan escasamente.

- 5.- 11) Producción del antibiótico kasugamicina. Las características de la cepa N^o M338-M1 pueden ser resumidas como sigue: Pertenece al género Streptomyces teniendo un micelio aéreo largo, los extremos del cual son en forma de lazo o espiral. La
- 10.- superficie de las esporas es lisa. La actividad proteolítica es débil. El micelio aéreo es de blanco a gris oliva y el crecimiento es de color crema a marrón amarillento pálido o marrón rojizo. No es de tipo cromogénico. Produce la kasugamicina.
- 15.- En comparación con las especies de streptomyces, el Streptomyces galbus y el Streptomyces fulvissimus se encuentran relacionados con la cepa N^o M338-M1. Sin embargo, el S. galbus es veloso de estructura en la superficie de las esporas y el --
- 20.- S. fulvissimus produce un pigmento soluble amarillo dorado y exhibe fuerte acción proteolítica. La cepa M338-M1 al ser aislada del suelo produjo también otros antibióticos aureotricina y tiolucion. Por lo tanto, la cepa M338-M1 debe compararse con el Streptomyces thioluteus, Streptomyces celluloflavus y --
- 25.- Streptomyces cyanoflavus. El Streptomyces thioluteus forma verticilo. El S. celluloflavus produce -



5.- un pigmento verde amarillento y exhibe una fuerte acción proteolítica. El S. cyanoflavus no forma espiral, produce pigmento azul verdoso y exhibe fuerte acción proteolítica. En estos puntos, la cepa M338-M1 puede ser distinguida de aquellas especies. Además, la cepa M338-M1 es diferente de aquellas especies con respecto a sus actividades contra varios antibióticos.

10.- Las antedichas características son suficientes para distinguir el microorganismo de las especies de streptomyces descritas hasta ahora y para demostrar que la cepa M338-M1 pertenece a una especie nueva. La variación y la mutación del organismo arriba descrito es naturalmente esperada ya que se trata de una propiedad común del actinomyces. El Streptomyces kasugaensis incluye la cepa típica antes descrita, y todas las variantes y mutantes naturales y artificiales de la misma. Es decir, puede definirse que el Streptomyces kasugaensis en el actual invento comprende todas las cepas productoras de kasugamicina excepto las que producen kasugamicina y que pueden ser absolutamente diferenciadas de las misma. Por ejemplo, un streptomycetes productor de aureotricina, tiolutina y kasugamicina debe estar comprendida en el Streptomyces kasugaensis de este invento, a menos que se distinga absolutamente de la cepa N° M338-M1 y de sus variantes y mutantes espera-

307506



bles.

- Los mutantes de la cepa N^o M338-M1 con --
intensidad incrementada de color amarillento han --
sido obtenidos después de la selección de monospora
5.- de la cepa M338-M1 y los mutantes con color púrpura
rojizo o color rojizo han sido obtenidos cuando es-
taba separada cada colonia individual después de la
irradiación ultravioleta. Los mutantes que no pro-
ducen aureotricina y tiolutina, pero producen kasu-
10.- gamicina se han obtenido de la cepa M338-M1 que ori-
ginalmente produjo aureotricina y tiolutina.

- En un ejemplo utilizando un medio basal -
consistente en harina de soja al 1,5%, K₂HPO₄ al -
0,1%, MgSO₄ · 7H₂O al 0,0% y NaCl al 0,3%, se obser-
15.- vó la siguiente producción de kasugamicina con los
siguientes cultivos obtenidos desde M338-A1: el mu-
tante N^o M1 semejando al original: 504 γ /c.c. en un
medio con glucosa al 1,0% en el sexto día (pH 8,0);
390 γ /c.c. con glucosa al 1,0% y CaCO₃ al 0,35% en el
20.- sexto día (pH 8,0); 468 γ /c.c. con maltosa al 1,5% -
en el quinto día (pH 7,2); 666 γ / c.c. con maltosa -
al 1,5% y CaCO₃ al 0,35% en el quinto día (pH 7,4).

- El mutante N^o M2 semejante a la cepa ori-
ginal: 126 γ /c.c. de kanamicina producida en un me-
25.- dio con glucosa al 1,0% en el quinto día (pH 7,4); -
504 γ /c.c. con glucosa al 1,5% y CaCO₃ al 0,35% en
el sexto día (pH 8,0); 702 γ / c.c. con maltosa al



1,5% en el cuarto día (pH 6,6); 576γ/c.c. con maltosa al 1,5% y CaCO₃ al 0,35% en el quinto día (pH 7,4).

- 5.- Un mutante amarillento N^o 5 obtenido después de una selección de espóra única: 414γ/c.c. en un medio añadido con glucosa al 1,5% en el sexto día (pH 8,2); 396γ/c.c. con glucosa al 1,5 % y CaCO₃ al 0,35% en el cuarto día (pH 6,6); 900 /c.c. con maltosa al 1,5% en el cuarto día (pH 6,4); 702γ/c.c. con maltosa al 1,5% y CaCO₃ al 0,35% en el sexto día (pH 7,6).

- 15.- Un mutante púrpura rojizo N^o U1 obtenido después de la radiación ultravioleta: 414γ/c.c. en un medio añadido con glucosa al 1,5% en el sexto día (pH 8,2); 504γ/c.c. con glucosa al 1,5 % y CaCO₃ en el quinto día (pH 8,0); 630γ/c.c. con maltosa al 1,5% en el sexto día (pH 8,0); 468γ/ c.c. con maltosa al 1,5% y CaCO₃ en el sexto día (pH 7,8).

- 20.- Un mutante rojizo N^o U2 obtenido después de la irradiación ultravioleta: 324 γ/c.c. en un medio añadido con glucosa al 1,5% en el sexto día (pH 8,0); 558 γ/c.c. con glucosa al 1,5% y CaCO₃ al 0,35 % en el quinto día (pH 6,4); 684 γ/c.c. con maltosa al 1,5% en el cuarto día (pH 6,4); 540 γ/c.c. con maltosa al 1,5% y CaCO₃ al 0,35% en el quinto día

307506



día (pH 7,4).

Con la kasugamicina se produce a menudo -
simultáneamente aureotricina y tiolutina. Sin embar-
go, las cantidades de la producción variaron depen-

5.- diendo de las cepas y medios empleados. Por ejemplo,
el mutante N° M5 y algunas de las cepas obtenidas -
después de la irradiación ultravioleta produjeron -
kasugamicina pero no tiolutina y aureotricina.

10.- El S. kasugaensis cuando se cultiva bajo -
condiciones adecuadas produce kasugamicina. Se pre-
para un caldo de fermentación conteniendo kasugami-
cina inoculando esporas o micelio del organismo pro-
ductor de la kasugamicina en un medio adecuado y -
cultivándolo después bajo condiciones aeróbicas. Pa-

15.- ra la producción de kasugamicina es posible el cul-
tivo en medio sólido pero para la producción en gran
des cantidades es preferible el cultivo en medio lí-
quido. Puede emplearse cualquier temperatura de fer-
mentación dentro de los límites en los que pueda -

20.- crecer el organismo productor de kasugamicina, produ-
ciendo ésta, aunque es preferible de 25 a 35° C. Los
medios consistentes en fuentes conocidas de nutrien-
tes son útiles para la producción de kasugamicina.

25.- Por ejemplo, son útiles como fuentes de nitrógeno -
los productos comerciales tales como peptona, extrac-
to de carne, corn steep, liquor, harina de semilla -



307506

- de algodón, harina de cacahuet, harina de soja, extracto de jiste, N-Z amina, caseina, nitrato de sodio, nitrato de amonio, sulfato de amonio y otros materiales nitrogenosos tales como trigo, arroz, etc. Son útiles como fuente de carbono los productos comerciales tales como lactosa, glicerol sucrosa, almidón, glucosa, maltosa, melazas y otros carbohidratos o grasas en estado puro o crudo. La maltosa pura o cruda, o el almidón hidrolizado a maltosa son las fuentes de carbono preferible para la producción de la kasugamicina. También puede añadirse cloruro de sodio o fosfato potásico o sódico, carbonato de calcio o sulfato de magnesio. Pueden añadirse, si es necesario, indicios de sales metálicas. Es útil cualquier clase de constituyente que pueda utilizarse por los organismos productores de la kasugamicina en la producción de ésta. Son útiles todos los materiales utilizados en el cultivo de Actinomycetes, tales como los descritos en la patente de los Estados Unidos Nº 2.931. 798.
- 5.-
10.-
15.-
20.-

La fermentación continúa hasta que se acumula substancialmente la kasugamicina. Por ejemplo, las esporas y micelios sobre cultivo en sesgo de Streptomyces kasugaensis fueron inoculadas en un medio consistente en glucosa al 2%, harina de soja al 1,5%, K_2HPO_4 al 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,05% y NaCl al

25.-

3 C 75 06



- 0,3% pH ajustado al 7,0 y se hizo el cultivo en agitación aeróbicamente a 27° C. Después, se observó la acumulación de kasugamycina en 3 a 5 días. En este caso se produjeron simultáneamente aureotricina, tiolutina y substancia polieno antifúngica. La kasugamycina del caldo es escasamente transferida de éste a los disolventes orgánicos tales como butanol butilacetato, etilacetato, etc., mientras que la aureotricina, tiolutina y polieno son transferidos a los disolventes orgánicos, especialmente el butanol. Sobre la base de esta propiedad, la kasugamycina en caldo puede separarse de los demás antibióticos existentes en el mismo:

MÉTODOS EXPERIMENTALES.

- 15.- (1) Ensayo de kasugamycina:
(a) Se cortan en pequeños trozos cien gramos de hojas verdes o bálagos de planta de arroz y se les añade 1 l. de agua. Después de hervir durante 30 minutos se filtra a través de 4 capas de gasa y se añade al filtrado 1 l. de agua. A esta solución se añaden sucrosa y ágar para dar la concentración final del 5% y 2,2 % respectivamente. Se somete a la autoclave durante 20 minutos a 120° C. Se esteriliza la solución tampón de pH 3,5 consistente en M/15 Na₂HPO₄ y M/15 HCl (o M/10 ácido cítrico y M/5 fosfato sódico, mezclados a razón de 24,3: 25,7 para dar pH 5,0). Se mezclan el medio antedicho



307506

- y la solución tampón a la razón de 1: 1, y se solidifica la mezcla de 10 c.c. en la placa de Petri -- (10 cms. de diámetro). Se suspenden en este medio -- las esporas de Piricularia oryzae, y se sobrepone --
- 5.- sus 4 ml. Como se hace usualmente en el ensayo antibiótico, se colocan cilindros sobre este medio -- sembrado de ágar, llenándose con una muestra o solución standard. Se fija el pH de la solución de muestra en el del medio. La placa se incuba durante
- 10.- 48 horas a 27° C. Se mide el diámetro de la zona de inhibición alrededor de cada cilindro. El hidroclo-- ruro de kasugamicina de 30 Y/c.c. exhibe la zona de inhibición de unos 30 mm. de diámetro. Si la solu-- ción de muestra contiene aureotricina, tiolutina o --
- 15.- la substancia polieno, la determinación se hace después de la extracción de estos antibióticos con butanol a pH 2,0.

- (b) Se inocula Pseudomonas tabaci a un sesgo compuesto de glutamato sódico al 0,2%, K_2HPO_4 al
- 20.- 0,2%, $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ al 0,1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, sucrosa al 2,0%, extracto de jiste (Daigo Eiyo Co.) al 0,2 %, peptona (polipeptona) al 0,5 %, y ágar al 1,2% --- (pH 6,8), incubándose a 27° C. durante 24 horas. De este sesgo se inocula una onda de inóculo en un caldo conteniendo un 1% de glucosa y se incuba a 27° C
- 25.- durante 24 horas. Se colocan en un disco de Petri --

30750623



de 9 cms. de diámetro 5 cc. de un medio consistente en glucosa al 5%, peptona (polipeptona) al 0,5% y -
ágar al 2,0% (pH 7,0) y se cubren con el estrato -
hecho con 5 cms. del mismo medio que fué inoculado -
5.- con el caldo cultivado antedicho en concentración -
del 0,5% al 1,0%. Se colocan discos (8 mm. de diá-
metro) conteniendo una muestra de ensayo en la placa
incubándose a 27ª C durante 17 a 18 horas. La mues-
tra y el standard se diluyen con tampón de fósforo
10.- de pH 7,0. Generalmente, la kasugamycina muestra una
inhibición de 18 mm. de diámetro con 400 / c.c.

(2) La agitación del cultivo se hizo en -
redomas de 500 cc. de volumen conteniendo 125 c.c.
de un medio a 27 a 29ª C, y en una máquina de agita-
15.- ción recíproca (amplitud de 8 cms. a 200 recorridos/
minuto).

(3) Se hizo el cultivo en un tanque de -
acero inoxidable de 30 lts. conteniendo 15 lts. de
medio bajo aireación de 20 lts. de aire por minuto,
20.- con agitación de 600 revolts. por minuto. Cuando se -
utilizó el tanque de 400 lts. se empleó el medio de
180 a 200 lts. La aireación fué de 200 lts/min. y -
la agitación de 200 r.p.m.

(4) La semilla para el cultivo de agita-
25.- ción y el cultivo de tanque fueron preparados como
sigue. Se inoculó una onda de inóculo de un sesgo -

307506



5.- de cultivo de la cepa N° M338-M1 o su subcultivo en el medio (pH 7,0) consistente en glucosa al 1,5 % - harina de soja al 1,5 % K_2HPO_4 al 0,1 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,05 por ciento, NaCl al 0,3 %, y $CaCO_3$ al 0,5 % cultivándose por agitación a 27 - 29° C durante 3 días. El caldo cultivado así obtenido se utilizó -- para semilla de cultivo.

PRODUCCION DE LA KASUGAMYCINA POR FERMENTACION.

10.- Por ejemplo, cuando se añadieron a un medio basal consiste en harina de soja al 1,5 %, --- K_2HPO_4 al 0,1 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,05 %, y NaCl al - 0,3 % diversas fuentes de carbono, ajustándose a -- pH 7,0 se obtuvo la siguiente producción por medio del cultivo de agitación:



Días de fermentación	1	2	3	4	5	6
Maltosa 1,5 %						
pH	6,6	6,8	7,0	6,6	7,0	7,0
kasugamycina µg/c.c.	0	216	763	1037	1224	1224
Azúcar reductora mg/c.c.	20,0	18,5	12,0	10,2	8,6	8,4

Maltosa 1,5 % y CaCO ₃ 0,05 %						
pH	6,4	6,8	7,0	6,6	7,0	7,2
kasugamycina µg/c.c.	0	180	799	907	1044	900
Azúcar reductora mg/c.c.	21,2	17,0	11,9	5,8	8,4	8,3

Glucosa 1,5 % y CaCO ₃ 0,5 %						
pH	6,0	6,2	6,4	6,2	7,0	7,4
kasugamycina µg/c.c.	0	117	547	576	410	396
Azúcar reductora mg/c.c.	15,7	15,4	6,7	2,6	6,0	4,4

Almidón soluble 1,0 % y glucosa 0,5 %						
pH	6,0	6,8	8,0	8,0	8,4	8,8
kasugamycina µg/c.c.	0	95	86	187	122	90
Azúcar reductora mg/c.c.	15,1	12,6	11,3	6,0	12,1	12,2

Glicerol 1,0 % y glucosa 0,5 %						
pH	5,6	5,2	6,8	6,8	7,6	8,4
kasugamycina µg/c.c.	0	54	112	241	130	85
Azúcar reductora mg/c.c.	11,4	10,0	4,2	2,5	5,1	4,6

Almidón hidrolizado 3,0 %						
pH	6,0	6,4	7,0	7,0	7,2	7,4
kasugamycina µg/c.c.	0	36	299	563	439	504
Azúcar reductora mg/c.c.	27,1	23,7	12,5	5,0	18,0	11,8

Quando se probaron varios medios conteniendo diversos orígenes de nitrógeno, usando el medio basal consistente en maltosa, 1,5 %, NaCl 0,5 %, K_2HPO_4 0,1 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1%, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,000% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,0001 %, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,0008%, y $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,0002 % (pH 7,0), se obtuvieron los siguientes resultados.

Orígenes de nitrógeno	D i a s					
	3		4		6	
	pH	mg./c.c.	pH	mg./c.c.	pH	mg./c.c.
Peptona 0,75 %, extracto de carne 0,5%	7,8	450	8,0	324	8,0	576
Peptona 0,75 % extracto de jiste 0,3%	6,8	252	6,8	324	6,4	360
Hidrolisado de caseína 0,75% extracto de carne 0,3%	8,0	342	8,2	216	8,4	270
NZ amina A 0,75%, extracto de carne 0,3%	8,2	198	8,4	144	8,6	270
Harina de soja 1,5%	6,6	-	6,4	396	6,6	720
Harina de soja 1,5 % (NH_4) $2SO_4$ 0,2%	7,0	414	6,8	342	7,0	864
Harina de semilla de algodón 1,5 %	6,0	-	6,0	360	6,2	360
Harina de soja 1,5 % extracto de carne 0,3%	6,6	252	6,4	432	6,4	612
					7,6	900

Estos resultados indican que diversos materiales nitrogenosos son útiles para la producción de kasugamicina.

307506





EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA KASUGAMYCINA.

Se aportan de acuerdo con el presente invento procedimientos para la extracción y purificación de la kasugamicina y sus sales de adición ácida.

- 5.- La kasugamicina, su hidrocloruro o su sulfato, son libremente solubles en agua y en el líquido fermentado la kasugamicina existe principalmente en la parte líquida. La kasugamicina es substancialmente insoluble en butanol, etil acetato, éter, cloroformo y benceno, y el tratamiento con estos disolventes puede utilizarse para eliminar algunas impurezas si es necesario. Por ejemplo, si existe aureotricina y tiolutina, estas substancias se eliminan por la extracción con estos disolventes. Si existe un anti --
- 10.-
- 15.- biótico polieno, que muy a menudo es producido, por muchas clases de Streptomyces, puede ser eliminados por extracción con butanol y ácido. Los antibióticos del grupo aureotricina y los polieno también -- pueden ser eliminados por el procedimiento de adsorción utilizando un carbón activo o una resina de intercambio de iones.
- 20.-

Quando se calentó una solución acuosa de kasugamicina con diversos pH y a 60° C durante una hora, el 82,5% de la actividad permaneció con ---

- 25.- pH 2,0 el 99,0% con pH 5,0, el 100 % con pH 7,0 y 9,0. No ocurrió degradación por el almacenamiento -



- en 0,1N HCl a temperatura ambiente durante 6 horas permaneciendo el 85 % de la actividad después de almacenamiento en 0,1N NaOH durante 6 horas. Así la kasugamycina es suficientemente estable para --
- 5.- destilación en vacío, secado por rociamiento u otros métodos disponibles para la concentración o secado del caldo fermentado o soluciones acuosas conteniendo kasugamycina. El polvo así obtenido por concentración y secado del caldo fermentado puede ser empleado para la prevención del tizón del arroz. Si es --
- 10.- necesario, este polvo se lava con metanol, etanol acetona o butanol para eliminar las impurezas. Con los adsorbentes puede obtenerse kasugamycina del caldo fermentado o de su solución acuosa. El carbón --
- 15.- activo es uno de los adsorbentes preferidos. La kasugamycina adsorbida sobre carbón activo puede ser levigada eficazmente con metanol acuoso, etanol acuoso, acetona acuosa o agua saturada con butanol, especialmente en el lado ácido hecho por ácido hidróclórico.
- 20.-

Sobre la base de la naturaleza ácida débil de la kasugamycina, pueden ser adsorbidas en resinas de intercambio de iones. La IR-120 (Hoffman-La Rosch) al tener radicales ácido sulfónicos adsorbe la kasugamycina mejor que la resina de intercambio de cationes IRC-50 (Hoffman-La Rosch) de radica-

25.-



les ácido carboxílicos. La solución se hace por medio de solución acuosa ácida, o más eficazmente por amoniaco acuoso. Cuando se utiliza resina de ácido sulfúrico, la concentración incrementada de ácido hidroclopórico o ácido sulfúrico, por ejemplo, más alta de 0,5N alcanza una buena levigación.

La estabilidad de la kasugamicina en amoniaco acuoso a 37° C es como sigue: En 0,5N amoniaco, no fué destruida a tiempo 0, después de 4 horas permaneció el 45 % de la actividad, y el 15% después de 18 horas; en 1,0N amoniaco permaneció el 95% a tiempo 0, el 25 % después de 4 horas y el 5,0 % después de 18 horas; en 2,0N amoniaco permaneció el 76 % a tiempo 0 y el 12,5 % después de 4 horas; en 4,0N amoniaco permaneció el 55% a tiempo 0 y el 5,0 % después de 4 horas. Por lo tanto, es conveniente hacer la levigación con amoniaco a temperatura tan baja como se posible y con una baja concentración de amoniaco. También es conveniente ajustar el pH de levigación a la reacción neutra tan rápidamente como sea posible, y después concentrar en vacio después del ajuste del pH. La kasugamicina es una clase de azúcar con respecto a su estructura y puede ser adsorbida en resinas de intercambio de iones con ácido bórico, y puede ser levigada con ácido hidroclopórico, acuoso. Las resinas de intercam-

307506



- bio de aniones del tipo OH son agentes útiles para neutralizar la solución ácida de kasugamicina. El PK de la kasugamicina es de 6,6 a 7,1 y es una base débil. La adsorción de la kasugamicina en resina de intercambio de cationes es disminuida o inhibida por las impurezas básicas fuertes. Por lo tanto, la resina de intercambio de cationes es también utilizable para la eliminación de las impurezas básicas fuertes, si es necesario. Se pasa un material
- 5.- conteniendo kasugamicina e impurezas básicas fuertes a través de una columna conteniendo una cantidad adecuada de IRC-50 en tipo Na o H para eliminar las impurezas básicas fuertes, y después se adsorbe la kasugamicina en resina IRC-120 de la que es le-
- 10.-
- 15.- vigada.
- Pueden aplicarse centrifugación, filtración y otros métodos ordinarios para eliminar la masa de micelio del caldo fermentado. La separación del micelio se hace más fácil si se ajusta al caldo fermentado al ácido y se añade carbón activo. El
- 20.º caldo fermentado se aplica a una columna de resina de intercambio de iones después de eliminar la masa sólida incluyendo el micelio o se filtra primero -- a través de un tamiz suficientemente fino, para --
- 25.- apoyar a la resina a este filtrado conteniendo micelio fino puede aplicarse a la torre de resina de in

307506



tercambio de iones.

- El caldo de fermentación se ajusta a --
pH 2,0 y se añade el carbón activo para dar una con-
centración final del 0,5 %. Después de suficiente -
5.- agitado y filtración, el filtrado se ajusta a -- -
pH 5,5 a 6,5. Este filtrado se aplica a una columna
que está cargada con una cantidad de IRC-50 de tipo
H insuficiente para adsorber la kasugamycina. El pH
de la solución pasada se ajusta a 4,0 y la solución
10.- se somete a una columna conteniendo IR-120 (tipo H
o tipo amoniaco preferibles a las de tipo Na) para -
adsorber la kasugamycina. Entonces se hace la levi--
gación con amoniaco acuoso, y se neutraliza el le--
vigado. En este caso es conveniente hacer el leviga-
15.- do a temperatura más baja de 15° C y neutralizar el
levigado dentro de las 5 horas de la levigación. El
levigado es concentrado hasta el secado o liofiliza-
do para obtener un polvo crudo de kasugamycina. En -
otro procedimiento se añade un carbón activo al cal-
20.- do filtrado. La kasugamycina adsorbida con metanol -
acuosa conteniendo ácido hidroc্লórico y el levigado
se concentra y se seca. El polvo crudo así obtenido
puede ser purificado además por el procedimiento -
IR-120 antes descrito. En otros métodos, se disuelve
25.- polvo crudo en agua y se pasa a través de una co--
lumna de carbón activo. Después de lavar se hace el



- levigado con ácido hidroclicórico (0,05N, por ejemplo) y las fracciones activas se neutralizan por medio de la resina de intercambio de aniones. Después de la concentración en vacío, se añaden de 10 a 25 volúmenes de etanol. Se mantiene a temperatura baja y después aparecen los cristales de hidroclicoruro de kasugamycina. Como comunmente se experimenta en las producciones de diversos antibióticos, pueden obtenerse los cristales sin la fase de cromatografía por carbón si se incrementa suficientemente la concentración de kasugamycina en caldo. Por ejemplo, la evaporación en vacío del levigado activo de resina IR-120 da hidroclicoruro de kasugamycina cristalina cuando el caldo de fermentación contiene más de 500 µg/c.c. de kasugamycina. Con ácido sulfúrico en lugar de ácido hidroclicórico es posible obtener sulfato de kasugamycina. Según se describe después en los ejemplos, uno de los procedimientos preferibles para obtener kasugamycina es que esta es adsorbida en una resina de intercambio de cationes directamente del filtrado de caldo fermentado y se leviga.
- Debido a la naturaleza básica débil de la kasugamycina pueden obtenerse como precipitados de soluciones acuosas con sustancias acidicas e insolubles en agua tales como pentaclorofenol, ácido lauril sulfónico, tergitol, etc.
- 5.-
 - 10.-
 - 15.-
 - 20.-
 - 25.-

307506



- A continuación se describen las propiedades de la kasugamicina. La kasugamicina es incolora y su hidrocioruro se obtiene como cristales blancos. El hidrocioruro descompesa a 202 a 204° C. El hidrocioruro es fácilmente soluble en agua, casi insoluble en metanol e insoluble en etanol, acetona, etil acetato, cloroformo y benceno. La solubilidad máxima en agua del hidrocioruro es de 1 g/8 c.c.. No hay máximo de absorción de luz ultravioleta dentro -
- 5.- de unos límites de 220 a 400 mμ. Su espectro infrarrojo se muestra en la figura 1. La rotación óptica específica (α) D^{25} es + 120° (1,6 % en agua). Es débilmente básica y el pK'_a es 7,1. El peso molecular se estimó en 449 por el método de presión osmótica de vapor y 453 por el método de volumetrización. El análisis elemental y la determinación del agua cristalina indica la fórmula para el hidrocioruro: $C_{15}H_{27}O_{10}N_3 \cdot HCl \cdot H_2O$, calcd. C 38,84, H6,52, N9,06, O37,94, Cl 7,64 hallado C 38,58, 38,34, H 6,94
- 10.- 6,62, N 9,66, 9,04, O 37,05, 37,54, Cl 8,16, 8,39.-
- 15.- El análisis elemental del hidrobromuro fué el siguiente: $C_{15}H_{27}O_{10}N_3 \cdot HBr \cdot H_2O$, calcd. C 35,44, H 5,95, N 8,27, O 34, 62, Br 15,72, hallado C 35,27, H 6,00, N 8,48, O 33,31, Br 16,94. El espectro de
- 20.- resonancia magnética nuclear del hidrocioruro tomado en solución de D_2O , utilizando sal sódica de 3
- 25.-



- (trimetil-silil)--ácido propanosulfónico como standard y tomado por instrumento Varian 60, se indica en la Fig. 2, indicando bandas en el siguiente ppm: 1,22, 1,32, 2,25, 2,33, 2,42, 2,50, 3,55, 3,79, 4,05
- 5.- 4,38, 4,50, 4,70, 5,32, 5,35. Las reacciones de ni--hidrina, utilizando piridina y permanganato de periodato son positivas, y las reacciones de Seliwanoff, - Sakaguchi, de cloruro férrico y de Fehling son negativas. Da antrona negativa y reacciones de Elson -
- 10.- Morgan en las condiciones usuales. La reacción de - antrona da un color marrón rojizo después del tratamiento con ácido nitroso. Bajo electroforesis de alto voltaje con $\text{HCCOOH}-\text{CH}_3\text{CO OH}-\text{H}_2\text{O}$ (25 : 75: 900) a pH 1,8, 3000 V/40 cm. 15-20 mA/ 10 cm. y 10° C y durante 15 min., se mueve 3,7 cms. al ánodo. El valor
- 15.- R_f de un perchromatograma utilizando papel filtro -- Toyo Nº 519 y butanol- ácido acético- agua (2: 1: 1:) es 0,28, el R_f utilizando butanol- etanol- agua- amoniac (4: 1: 4,9 : 0,1) es 0,07, el R_f utilizando -
- 20.- butanol- ácido acético- agua (6,3: 1: 2,7) es 0,06.

En un medio de ágar de peptona y extracto de carne, la kasugamicina inhibió al Corynebacterium xerosis con 50 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$, Sarcina lutea(cepa X) con -- 100 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$, una cepa de Klebsiella pneumoniae con -

25.- 50 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$, Proteus vulgaris (OX 19) con 100 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$



- Pseudomonas aeriginos con 100 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ varias cepas -
de disentería con 100 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$, y Brucella meliten--
sis con 6,25 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$; mientras que 100 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ no
bastaron para inhibir otras clases de bacterias pro-
5.- badas. En el medio sintético de Stephenson-Whetham,
exhibió una actividad antibacteriana más fuerte que
en el medio de peptona y extracto de carne. En so-
lución de peptona, 6,25 a 25,0 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ de kasuga--
micina inhibieron 20 aislados clínicos de Pseudomo-
10.- nas, 25,0 a 50,0 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ 12 ais-lados. La adición -
de suer-o no disminuyó su actividad antibacteriana,
mientras que su actividad contra S. typhi, S. para-
typhi, K. pneumoniae, Sigella fué mejorada por el -
suero. En un caldo de suero del 10%, inhibió S. --
15. flexneri y Kl. pneumoniae con la concentración de
6,25 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ Sobre ágar de sangre, fueron inhibido
Pneumococos con una concentración de 50 a 100 $\mu\text{g}/$
c.c.

- La toxicidad es muy baja, Inyecciones de
20.- 1000 mg/Kg. intravenosas, subcutáneas o intraperi--
tomales fueron toleradas por ratones sin ningún --
efecto secundario. Los monos toleraron 800 mg/Kg.
por inyección intravenosa. La administración dia--
ria de 2 g. por inyección no produjo efectos se--
25.- cundarios en los seres humanos. Es adsorbida oral--
mente y 3 g. diarios no produjeron signos tóxicos



en los seres humanos. No produce irritación. La toxicidad para los peces es también baja.

- 5.- En agua conteniendo 100 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ de kasugamycina sobrevivieron peces del género *Fundulus*. La kasugamycina es prometedora como agente quimioterapéutico contra las infecciones de bacterias incluidas las *pseudomonas*. Y tiene una fuerte actividad protectora contra el tizón del arroz sin fitotoxicidad. Aunque no inhibe la *Piricularia oryzae* en 10.- 100 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ en medio Sabouraud, la inhibe en 0,1 - 1 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ en el medio de jugo de arroz de pH ácido. También es eficaz en los ensayos en tiestos. El procedimiento de ensayo en tiesto fué como sigue. Se infectaron hojas con tizón del arroz, añadiéndose a 15.- agua estéril para preparar una suspensión de esporas de *Piricularia oryzae*. Después de agitación suficiente se roció esta suspensión en las hojas, en el momento de haber salido 2 a 3 hojas de cada planta joven de arroz cultivada por siembra directa de arroz 20.- puddy de la "cepa Moko" en tiesto. Después del rociamiento se mantuvo en el invernadero de ambiente húmedo durante 20 a 24 horas y después se rociaron las muestras de ensayo. Se mantuvo de nuevo en un invernadero durante 7 días y se contaron las manchas 25.- de enfermedad en 10 hojas en 3 tiestos diferentes. En un experimento, el rociamiento de kasugamycina, de 5 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ disminuyó el número de manchas de en -



- fermedad por 10 hojas a 8,20 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ a 0,3, 40 --
 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ a 0, mientras que el control sin rociamiento de kasugamycina dió 176 de manchas de enfermedad progresivas. Este efecto curativo fué superior al --
- 5.- de la blasticidina S. Cien $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ de kasugamycina -- no mostraron ninguna fitotoxicidad para la planta -- de arroz. Para los fines de protección contra el tizón del arroz, no es necesario purificar la kasugamycina en alto grado. Pueden usarse, incluso, el
- 10.- líquido de cultivo de un organismo productor de -- kasugamycina mismo o el polvo seco de este líquido -- de cultivo.

- Aunque la blasticidina S se conoce como -- antibiótico eficaz contra el tizón del arroz, pro--
- 15.- ducida por un organismo perteneciente a los Actinomyces, se distingue fácilmente de la kasugamycina por sus propiedades fisico-químicas, acciones antimicrobianas, y toxicidad. La blasticidina S tiene -- una fuerte toxicidad para los animales y los seres --
- 20.- humanos y fitotoxicidad en concentración más alta -- de 20 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ Aunque la kasugamycina parece un -- amino-azúcar por sus propiedades físicas químicas -- se distingue de la trehalosamina por la fórmula molecular, actividad antimicrobiana, y cromatografía
- 25.- de papel, y también es fácilmente distinguible de -- la higromicina B y B₂ por la rotación óptica, la --



1964

307506

actividad antimicrobiana y otras características. La kasugamicina presenta un espectro antimicrobiano especial bajo especiales condiciones y no hay compuesto similar entre los antibióticos conocidos.

5.- La hidrólisis ácida de la kasugamicina da (+) - inositol. Este es el primer aislamiento de (+)- inositol de productos microbianos.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar este invento. Sin embargo, nuestro invento no se limita a dichos ejemplos. Como las características de la kasugamicina están ahora claramente definidas, es fácilmente posible hacer varias modificaciones de este invento. A la luz de los descubrimientos anteriores, este invento cubre la producción de kasugamicina, su concentración, su extracción, su purificación por cualquier procedimiento conocido.

15.- Ejemplo 1.

Se colocó en un fermentador de 400 lts. de acero inoxidable, un medio (180 lts) conteniendo glucosa al 1,5 %, harina de soja al 1,2 %, K_2HPO_4 al 0,1 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,05 %, NaCl al 0,3 %, $CaCO_3$ al 0,5% y resina de silicio (KM-66, de Shinetsu Chemical Co.) (40 c.c.). Se ajustó el pH a 6,6 después de la esterilización. Con fines antiespumantes se instaló el contenido de un recipiente de 900 ml.



- de aceite de soja dentro del fermentador, y después de 30 horas de incubación se añadieron 500 ml de -- aceite de soja más. Las condiciones de cultivo em-- pleadas fueron las siguientes: agitación, 200 r.p.m;
- 5.- aire 180 lts./min.; temperatura de incubación 27° C; pH después de 24 horas de incubación y cada 6 horas después de 90 horas, 6,2 5,4, 5,1, 5,2, 5,3, 5,8,5,9 6,0, 5,7, 6,6 y 6,6, respectivamente. Después de 92 horas de fermentación, se tomó el cultivo líquido.-
- 10.- La kasugamicina producida en este líquido de cultivo exhibía un diámetro de inhibición de 30 mm, por el método de ensayo de (a), y la solución diluida 128 - veces fué eficaz contra el tizón del arroz en la - prueba de tiesto. Este caldo cultivado se sometió -
- 15.- a - centrifugación no pronunciada para separar el - micelio y se obtuvieron 310 lts. de filtrado. El pH del filtrado se ajustó a 7,0 y se añadieron 12,5 Kgs. de carbón activo. Después de agitar, se filtró el - carbón por medio de filtro de paño y papel filtro.
- 20.- El filtrado tenía sólo 5 al 10 % de actividad - del filtrado de cultivo. Se añadieron 37,5 lts. de - disolvente consistente en butanol y agua (1 : 2) a la torta de carbón y se hizo la levigación a 45° C - y a pH 2,0 con ácido hidroclicórico. Se repitió tres -
- 25.- veces y se combinaron los levigados. Se dejó repo--



sar este levigado (112,5 lts.) y se concentró el --
substrato de agua de 90 lts. en vacío hasta 3,58 -
lts. La solución concentrada se liofilizó dando --
1.235 g. de polvo marrón con un 1,8 % de pureza de
5.- kasugamicina.

Ejemplo 2.

Al medio de 180 lts. conteniendo los mis-
mos constituyentes que se muestran en el ejemplo -
1, se añadieron 18 c.c. de resina de silicona (KM-66
10.- de Shinetsu Chemical Co.) colocándose en un fermenta-
tador de 400 lts. Después de ajustar el pH a 7,0 -
con 1N NaOH se esterilizó a 120° C durante 20 minu-
tos. En este medio se inocularon asépticamente 1.500
c.c. del caldo cultivado por agitación de 3 días de
15.- la cepa N° M338-M1. El recipiente lleno con 900 c.c.
de aceite se colocó dentro del fermentador con fi-
nes antiespumantes. Después de 21 horas de fermenta-
ción se añadieron 200 c.c. de aceite de soja más,
y 300 c.c. después de 22 horas. Durante el periodo
20.- de fermentación se realizó agitación de 200 r.p.m. y
una aireación de 150 lts. de aire por min., mante-
niéndose la temperatura a 27 - 28° C. Después de -
12 horas, 24 hrs. y cada 6 horas siguientes hasta -
92, se midió el pH el azúcar total y la cantidad de
25.- kasugamicina. Los resultados fueron los siguientes.



En esta fermentación, se produjeron simultáneamente aureotricina (o tiolutina).

Fermentación horas	pH	Azúcar total mg./c.c.	Kasugamicina γ/c.c.	Aureotricina γ/c.c.
0	6,2-6,4	23,0	0	0
12	6,4	22,7	0	0
24	6,4	19,1	0	0
30	6,4	17,8	0	0
36	6,4	15,7	57,6	8
42	5,8	12,4	144	18
48	5,4	8,94	198	26
54	5,6-5,8	7,04	252	36
60	6,2	6,56	432	15
66	6,2-6,4	5,39	-	-
72	6,4	5,28	396	14
78	6,2-6,4	5,23	504	11
90	6,4	5,61	450	18
92	6,8	5,61	518	24

El caldo fermentado así obtenido (conteniendo 518 μg/c.c. de kasugamicina, total de 82.944 g.) se -- ajustó a pH 2,0 con 1N HCl y se añadió al mismo un 0,5% de carbón activo. La mezcla se aplicó a centrifugación no pronunciada de 15.000 r.p.m. y dió -- 160 lts. de filtrado (460 μg/c.c., total de 73.728 g. de kasugamicina). El filtrado se ajustó a --



- pH 7,0 con 1N NaOH añadiéndosele 3,2 Kgs. de carbón activo (2,0%) para adsorber la kasugamycina. Entonces se aplico de nuevo a centrifuga no pronunciada para recoger la torta de carbón. La parte líquida contenía 17,12 µg/c.c. de kasugamycina y retenía el --
- 5.- 29,1% de la actividad del caldo original. La torta de carbón se añadió con 22,5 lts. de metanol al -- 90% y se ajustó a pH 2,0 con 1N HCl. El levigado se hizo a 40°C y se añadió otro 80% de metanol para --
- 10.- hacer una segunda levigación, y dió 45,21 lts. de -- levigado. Este levigado contenía 851,8 µg/c.c. de -- kasugamycina (total 38,501 g.) y el producto del -- caldo original fué del 46,41 %. Este levigado se -- ajusto a pH 4,0 - 5,0 y se extrajo el metanol en --
- 15.- vacio. Se liofilizó la solución acuosa así obtenida y se obtuvo un polvo pálido amarillento con una potencia de 54 µg/mg. (total calculada de kasugamycina 36,540 g.). El rendimiento del polvo calculado del -- caldo original fué del 44,0% y la pureza del polvo
- 20.- se calculó en 5,4 %.

Ejemplo 3.

- Los 150 g. de polvo crudo (1,8 % de pureza) obtenidos en el ejemplo 1 se disolvieron en 2 lts. de agua destilada y se aplicaron a la columna de --
- 25.- 100 cms. de longitud y 5 cms. de diámetro llena de -- carbón para uso cromatográfico (producto de Wako -- Chemicals Co.). El grado de flujo fué de 3 cc./min.



- y se mantuvo a temperatura ambiente. El líquido -
pasado no mostró la existencia de kasugamicina. La
columna de carbón se lavó con 4 lts. de agua desti-
lada y se pasó el 0,05N HCl. La primera fracción --
5.- de 1.600 c.c. tenía un pH de 5,6 y no contenía ka--
sugamicina. La siguiente fracción de 3.000 c.c. --
tenía un pH 1,0 y la siguiente de 200 c.c. un pH -
de 1,0. Ambas contenían kasugamicina. Estas fraccio-
nes activas fueron neutralizadas con resina de in--
10.- tercambio de iones Dowex-3 y se concentraron bajo -
vacío a un volúmen de 10 c.c. A éste, se añadieron
200 c.c. de etanol y se mantuvo durante la noche --
a 4º C, para producir precipitados blancos liger-
amente amarillentos. Después de la filtración y seca-
15.- do de los precipitados, se obtuvieron 10,84 gs. de -
polvo blanco. La pureza de este polvo era del 24,4
%. El rendimiento se calculó en un 97,8%.

EJEMPLO 4.

- Un polvo que se obtuvo por el mismo proce-
20.- dimiento del ejemplo 3 tenía la pureza del 36 %. Se
disolvieron 1,15 gs. de este polvo en 150 c.c. de -
agua destilada y se ajustó el pH a 7,0. La disolu--
ción se aplicó a la columna de carbón de 29 cm. de -
largo y 3 cms. de diámetro. Se mantuvo a temperatura
25.- ambiente y el flujo fué de 1 c.c./min. La columna se
lavó con 350 c.c. de agua destilada. Entonces se pa-
só 0,02N HCl a través de la misma y el efluente se -



fraccionó en fracciones de 10 c.c. La fracción inicial de 520 c.c. tenía pH 5,6 y no contenía kasugamycina. Las dos fracciones siguientes de 20 cc. tenían pH 4,0 y no contenían kasugamycina. La siguiente de 10 c.c. tenía pH 2,0 y contenía kasugamycina, pero reveló contener otras sustancias positivas a nihidrina por cromatografía de papel. Los siguientes 130 c.c. tenían pH inferior a 1,0 y contenían kasugamycina, pero también contenían otras sustancias positivas a la nihidrina. Los siguientes 430 c.c. tenían pH inferior a 1,0 y contenían kasugamycina sin ninguna otra sustancia positiva a nihidrina. Esta última fracción se neutraliza con Dowex 3 y se concentró en vacío a un volumen de 5 c.c. Se añadieron 100 c.c. de etanol a este concentrado y dieron 301 mg. de polvo blanco con un 92 % de pureza. (El rendimiento fué del 66,8 %). Este polvo fué recristalizado del agua y dió 120 mg. de hidrocloreuro de kasugamycina en estado de cristales.

20.- Ejemplo 5.

Se inoculó con la cepa N^o M338-M1 y se cultivó por agitación el medio consistente en malto 1,5 % harina de soja 1,5 %, K_2HPO_4 0,1 %, $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 % NaCl 0,3 % (pH 7,0). Los 3.450 c.c. --
25.- conteniendo kasugamycina se ajustaron a pH 2,0 con 1N HCl y se añadieron con célula Hyflosuper (1%) y carbón activo (0,5%) y se filtraron. En este procedimiento, se reveló que la kasugamycina no era --
prácticamente adsorbida. El filtrado se ajustó a --



- pH 7,0 - 7,4 y se añadió con carbón activo al 2 % - para adsorber kasugamycina. Se recogió la torta de carbón que adsorbió la kasugamycina. En este caso, - el filtrado contenía todavía de un 10 a un 23,5 % -
- 5.- de kasugamycina. En la fase siguiente, se añadieron - 690 c.c. de metanol al 80 % a la torta de carbón, -- ajustándose el pH a 2,0 con 1N HCl, y se hizo el -- levigado a 45° C. Se añadieron 350 c.c. más de metanol al 80 % y se repitió la levigación. Se combinaron
- 10.- dos levigados, y el rendimiento de kasugamycina de - este levigado se calculó en el 62%. Este levigado - metanólico se ajustó a pH 4,0 con 1N NaOH y se concentró en vacío para dar jarabe. El concentrado se - añadió con etanol hasta que no ocurrió ya más pre--
- 15.- cipitación. Este precipitado contenía kasugamycina - y el flotante contenía solamente del 5 al 10 %. Se - recogió el precipitado y se obtuvo un polvo blanco - amarillento de kasugamycina con una pureza del 5,3%. El rendimiento del caldo original se calculó en el -
- 20.- 45 %.

Ejemplo 6.

- Los 5 g. de polvo con un 1,8 % de pureza - obtenidos en el ejemplo 1 se disolvieron en 500 c.c. de agua y se ajustó el pH a 4,0. Esta solución se -
- 25.- aplicó a una columna llena con 100 c.c. de resina -- IR-120 (tipo H) y el grado de flujo fué de 1 c.c./ min. Después de lavar la columna con 1 lt. de agua -



destilada se pasaron 0,5N NH_4OH a través de ella al flujo de lcc./min. La solución pasada de 100 c.c. se neutralizó con 1N HCl y se liofilizó, para dar un polvo ligeramente amarillento en cantidad de 1,6 g, con un 9 % de pureza. El producto se calculó en un 88,9 %.

Ejemplo 7.

En el medio mostrado en el ejemplo 1 se cultivó por agitación una cepa obtenida de la N^o M338-M1 por cultivo de monospora, durante 72 horas, y se inoculó 1 lt. del caldo cultivado a 100 lts. de medio conteniendo harina de soja 1,5% maltosa 1,5 %, NaCl 0,3 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 % , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0007 %, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,0008 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0001%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0002 %, pH 7,4, en un fermentador de 200 lts. y se realizó la fermentación bajo aireación de 100 lts. por minuto y agitación de 200 r.p.m. a 28° C. Después de 48 horas, se inoculó a 1.400 lts. del mismo medio colocado en un fermentador de 2.000 lts. y se continuó la fermentación. Entonces, después de 48 horas, al pH era 6,9 y se produjeron 160 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ de kasugamicina. Este caldo contenía 8,4 $\mu\text{g}/\text{c.c.}$ de aureotricina. Se interrumpió la fermentación y se filtró el caldo con la ayuda de tierra diatomea. Incluyendo el agua usada para el lavado del filtro, se obtuvieron totalmente 1.570 lts. del filtrado. Trescientos lts. de resina



- IR-120 se hicieron del tipo H, y se añadieron a ésta, que fué lavada posteriormente con agua, el amoniaco necesario para hacer una cuarta parte de la resina - del tipo amóniaco. El filtrado del caldo se pasó --
- 5.- a través de la columna conteniendo la resina des-- crita arriba. Entonces, el primer efluente de 610 - lts. no contenía kasugamycina, y el siguiente de -- 950 lts. contenía 65,2 gs. de kasugamycina. Este -- efluente fué pasado a través de otra torre de resina.
- 10.- La levigación de la primera resina se hizo utilizando 0,5N NH₄OH. El primer levigado de 53 lts. contenía 28,5_g de kasugamycina. El segundo levigado de -- 200 lts. contenía 738 gs. de kasugamycina. El tercer levigado de 200 lts. contenía 44,2 gs. de kasugamycina. El levigado fué neutralizado con HCl a pH 6,6 el segundo levigado fué concentrado en vacío a -- 6,32 lts. y se añadieron 60 lts. de etanol. Enton-- ces se obtuvieron 850 gs. (90 % de pureza) de cristales crudos de hidrocioruro de kasugamycina.

20.-

NOTA.-

Se declaran como de novedad y propiedad - para todo el territorio español el contenido de las siguientes:

REIVINDICACIONES

25.-

1ª.- Una substancia antibiótica, kasuga -- mycina, eficaz para inhibir Brucella, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, algunas Klebsiellas y Blast-



1964

- mices, para la protección de la planta del arroz - de la infección progresiva de la Piricularia oryzae, siendo una substancia que es soluble en agua, ligeramente soluble en metanol, substancialmente insoluble en etanol, butanol, ésteres, cloroformo y benceno, que no exhibe máximo de absorción de luz ultravioleta de 200 mμ a 350 mμ que da una reacción positiva a la nihidrina y negativa de Tollens, Sakaguchi, de antrona y de Elson-Morgan, que contiene los elementos carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, que contiene un grupo primario amino, que es débidamente básica exhibiendo pk'a 7,1 y que forma sales de adición ácida; siendo además las propiedades del hidrocioruro de kasugamycina cristalina que tiene la fórmula empírica $C_{15}H_{27}O_{10}N_3 \cdot HCl \cdot H_2O$, que exhibe $(\alpha) - D^{25}_D + 120^\circ$ (1,6 % H_2O), funde a 202 - 204° C. bajo descomposición, exhibe bandas de absorción en la región infrarroja del espectro cuando se prepara en píldoras en bromuro de potasio en los siguientes números de onda en $cm.^{-1}$: 3520, 3350, 3200, 3070 - 2950, 2050, 1695, 1670, 1625, 1522, 1462, 1379, - 1323, 1286, 1224, 1180, 1135, 1120, 1090, 1080, - 1060, 1042, 1025, 975, 945, 908, 890, 870, 846, 825 738, y 709, exhibe bandas en el espectro de resonancia magnética nuclear en D_2O al siguiente ppm: - 1,22, 1,32, 2,25, 2,33, 2,42, 2,50, 3,55, 3,79, - 4,05, 4,38, 4,50, 4,70, 5,32, y 5,35, y muestra una



trización equivalente a unos 453, da (+)- inositol -
por su hidrolisis ácida, y da $C_{14}H_{20}O_{10}N_2 \cdot H_2O$ por
su hidrolisis con barita que además se hidrolizó -
a $C_{12}H_{26}O_7N_2$ y ácido oxálico; siendo propiedades del
5.- hidrobromuro de kasugamycina que muestra la fórmula
empírica de $C_{15}H_{27}O_{10}N_3 \cdot HBr \cdot H_2O$; siendo propiedades
del sulfato de kasugamycina que es soluble en agua
y se descompone a 210- 218° C.

2ª.- Una sal de adición ácida de kasugamy-
10.- cina según se define en la reivindicación 1ª.

3ª.- Hidrocloruro de kasugamycina, según -
se define en la reivindicación 1ª.

4ª.- Un procedimiento para la producción -
de un caldo de fermentación conteniendo el antibió-
15.- tico descrito en la reivindicación 1ª que comprende
el cultivo de una cepa de Streptomyces kasugaensis
en solución acuosa de carbohidrato conteniendo un -
nutriente nitrogenoso bajo condiciones de inmersión
hasta impartir una substancial actividad antibacte-
20.- riana a dicha solución y recuperando entonces dicho
antibiótico de dicha solución.

5ª.- Un procedimiento según la reivindi-
cación 4ª, en el que se produce el antibiótico - -
descrito en la reivindicación 1ª en un medio que -
25.- contenga maltosa cruda o pura como fuente de carbono.

6ª.- Un procedimiento mediante el cual se



separa el antibiótico descrito en la reivindicación 1ª en solución acuosa de dicha solución por adsorción sobre carbón y la consiguiente levigación.

5.- 7ª.- Un procedimiento mediante el que el antibiótico en solución acuosa descrito en la reivindicación 1ª, es separada por adsorción sobre una resina de intercambio de cationes y la subsiguiente levigación.

10.- 8ª.- Un procedimiento según la reivindicación 7ª, en el que se usa para la adsorción de la kasugamicina una resina de cationes con ácido sulfónico como grupo activo.

15.- 9ª.- Un procedimiento según la reivindicación 7ª, en el que se usa amoníaco para la levigación del antibiótico adsorbido.

10ª.- Un procedimiento según la reivindicación 4ª, en el que el caldo fermentado es concentrado y secado.

20.- 11ª.- Un procedimiento según la reivindicación 10ª en el que se eliminan algunas impurezas por adsorción de carbón en extracción de ácido o disolvente.

25.- 12ª.- "KASUGAMYCIN Y PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL MISMO.

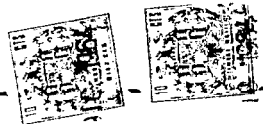
- 43 - 307506



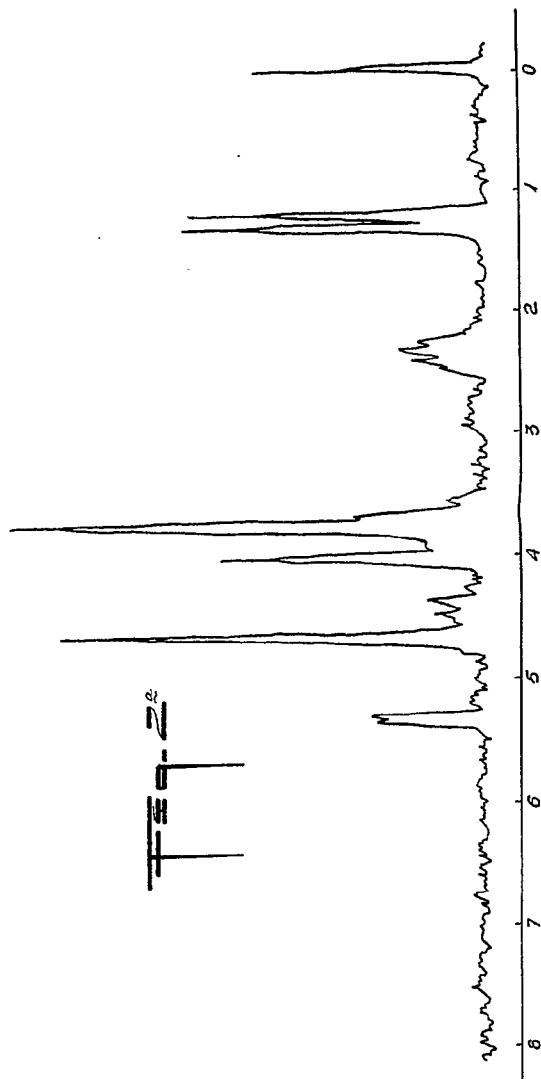
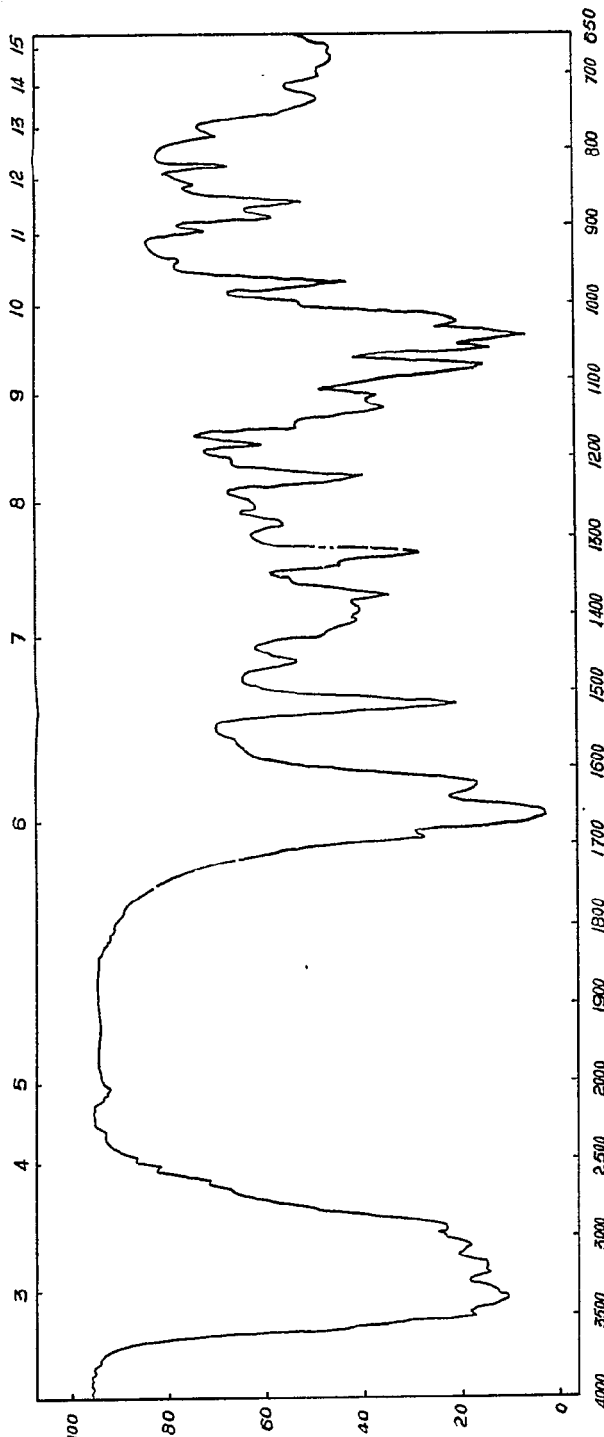
Todo ello, conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de CUARENTA Y TRES hojas escritas a máquina por una sola de sus caras y dibujos que la ilustran.

Madrid, 23 de Diciembre de 1.964

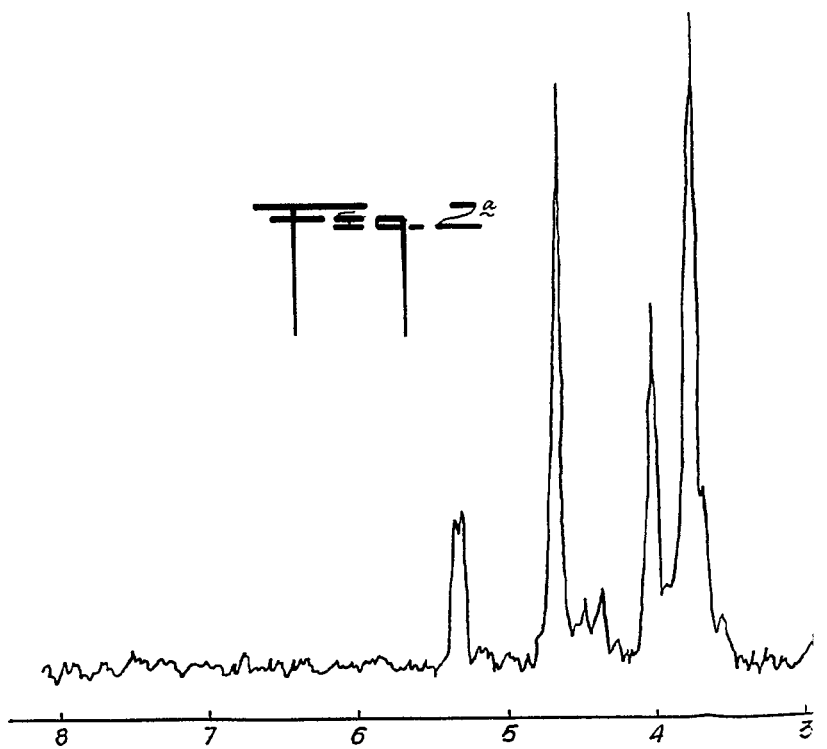
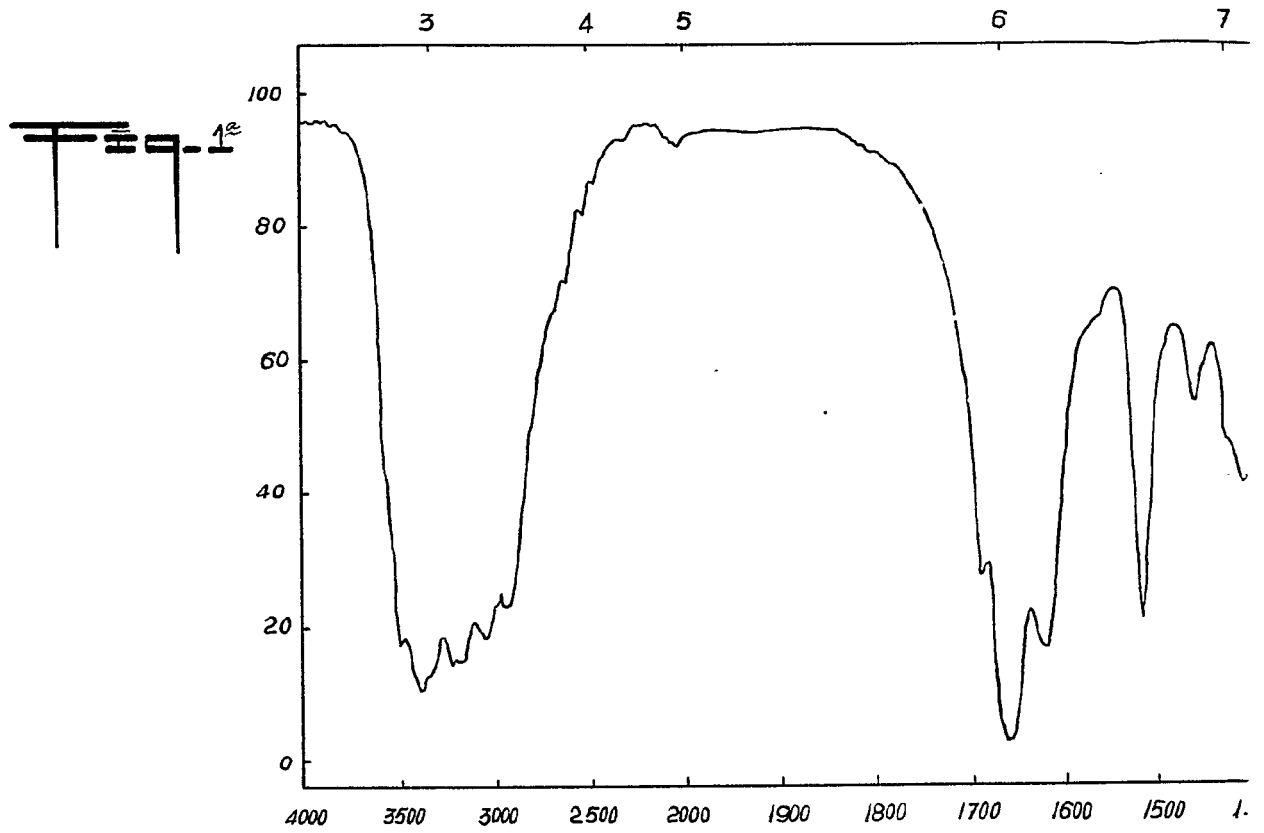
E. GONZALEZ VAGAS
P.R.P.



10.1.1



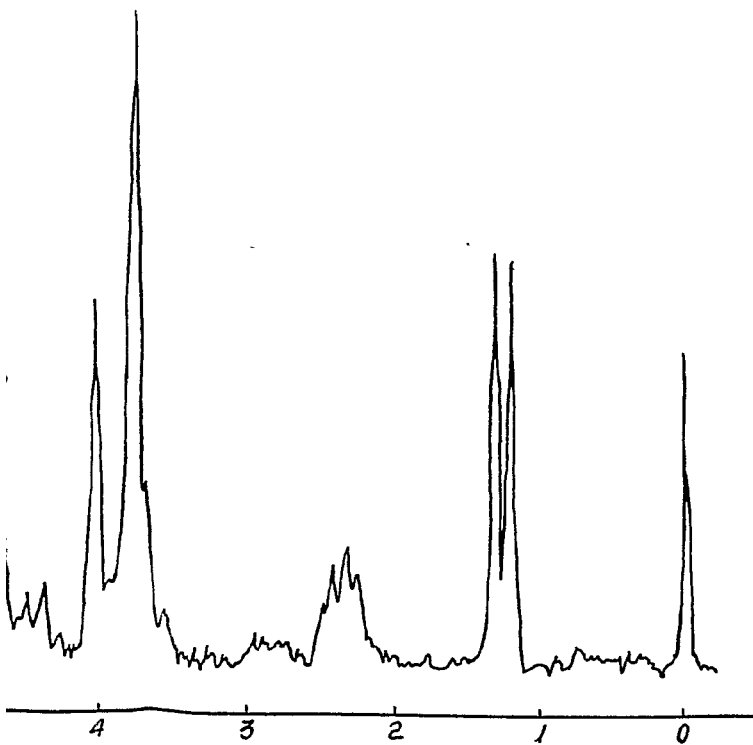
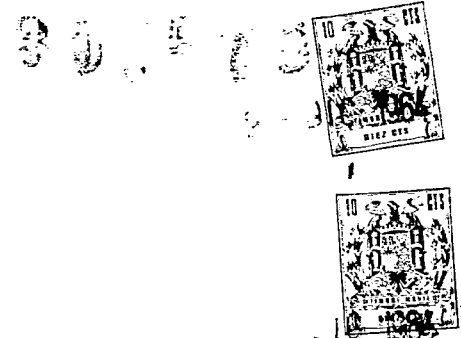
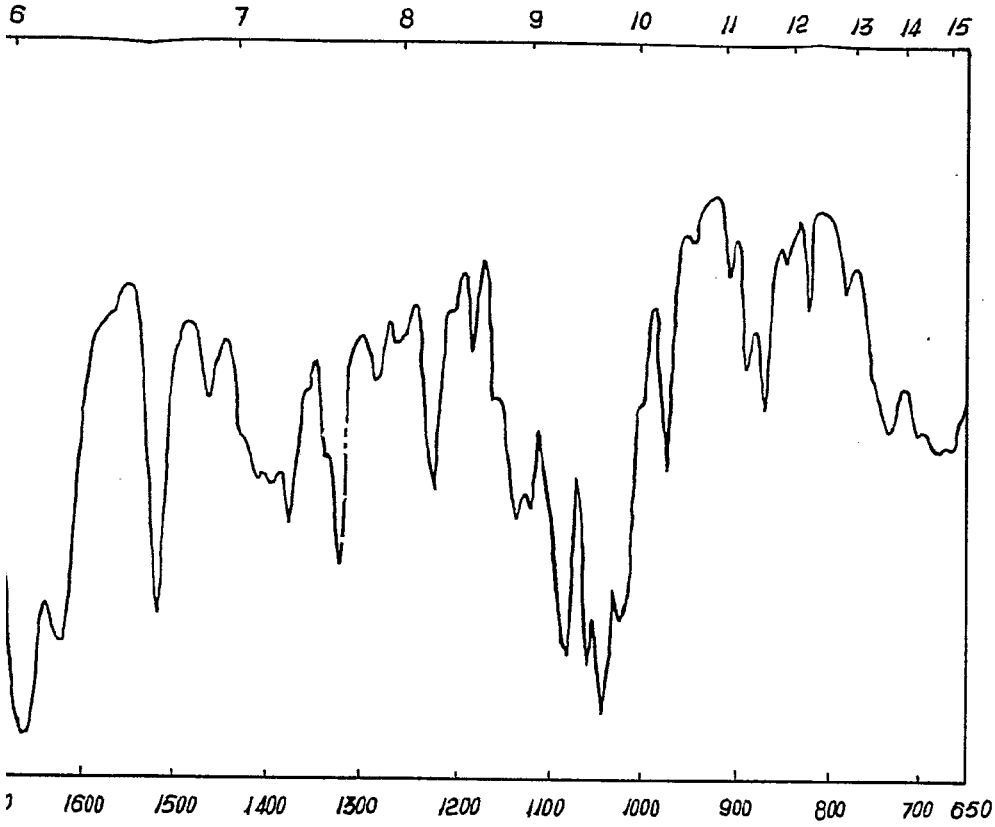
MADRID 23 DICIEMBRE DE 1964



ESCALA VARIABLE

307500

HOJA UNICA



MADRID 23 DICIEMBRE DE 1964