

9 FEB. 1965 308770



P-28.434

Pos 6445 Kyowa

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

PATENTE D E INVENCION

formulada el 30 de enero de 1965, con el núm. 308.770

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 LA PREPARACION DE DI- Y TRIFOSFA
TOS DE GUANOSINA".

=====

Esta invención se refiere a un procedimiento pa-
ra la producción de trifosfato de guanosina (al que aquí
se hace referencia como GTP) y difosfato de guanosina (al
que aquí se hace referencia como GDP), llevando a cabo el
5 cultivo fermentativo de un microorganismo en un medio de
cultivo, en presencia, en tal medio de cultivo y durante
cierto tiempo a lo largo del proceso de fermentación, de
guanina, un derivado de ella (guanosina, etc.), o un pro-
ducto natural que contenga al menos una de estas sustan-
cias (denominado aquí genéricamente "compuesto de guani-
na").

10



El objeto de esta invención es producir económicamente y con buenos rendimientos GTP y GDP, que juegan papeles importantes en el metabolismo y que son importantes como reactivos bioquímicos, y como reactivos de adición de fosfatos y medicamentos de alta energía.

En cuanto a la producción de GTP y GDP, se ha conseguido hasta ahora por síntesis química, o por un método enzimático a partir de guanosina. Pero los rendimientos son bajos en estos métodos, y otra vez el método enzimático tiene la desventaja de requerir una gran cantidad de levadura. Así pues, el GTP y GDP están también considerados como reactivos caros, ya que no ha habido ningún método barato para su producción.

Según la presente invención, ciertas especies de microorganismos forman una notable cantidad de GTP y GDP, y establecen así un procedimiento económico para la producción de dichos GTP y GDP.

Los microorganismos usados en esta invención son aquellos que pertenecen a la categoría de Brevibacterium ammoniagenes. Puede ser usada cualquier bacteria que pertenezca a esta especie, independientemente de si son cepas salvajes, mutantes que requieren un nutriente u otros mutantes. Se forman cantidades notables de GTP y GDP cultivando las bacterias que pertenecen a esta especie en un medio, en presencia de "compuesto de guanina" durante algún tiempo a lo largo del cultivo.

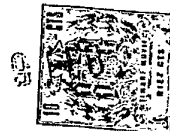
Como medio de cultivo es utilizable cualquiera que contenga una fuente de carbono, tal como hidratos de carbono (glucosa, productos de hidrólisis de almidón o mezclas, etc.), una fuente de nitrógeno (urea, cloruro de



amonio o nitrato de amonio, etc.), sales inorgánicas (fos-
fatos de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio,
etc.), y productos naturales que contienen nitrógeno (lí-
quido de maceración de maíz, extracto de levadura, extrac-
5 to de carne, peptona, ácidos casamínicos, productos solu-
bles de pescado, etc.) en proporción adecuada. Cuando se usa
un mutante que requiere nutriente, se añade al medio una
sustancia que satisfaga el requerimiento del mutante. La adi-
ción de aminoácidos y vitaminas tales como biotina, tiamina,
10 ácido pantoténico o sustancias que tengan el mismo signi-
ficado fisiológico (por ejemplo, beta-alanina y coenzima A
en el caso del ácido pantoténico) es ventajoso para la esta-
bilización del crecimiento de las bacterias y para la fer-
mentación, y para obtener el producto con buen rendimiento.

15 El GTP y GDP se forman individualmente o juntos,
cuando la fermentación se realiza en presencia de "compues-
to de guanina", que se añade al medio arriba mencionado al
comenzar el cultivo o durante el curso del cultivo. La can-
tidad de GTP y GDP formada, aumenta cuando la concentración
20 del fosfato inorgánico añadido al medio es más alta que 0'4 %
(en peso), calculado como PO_4 . El mejor resultado se obtiene
cuando la concentración de PO_4 está entre aproximadamente
0'4 % y aproximadamente 1'6 %. Pueden añadirse complementa-
riamente glucosa y otros nutrientes al medio durante la fer-
25 mentación. La cantidad de "compuesto de guanina" añadida al
medio es preferiblemente de aproximadamente 1 miligramo por
mililitro a 10 miligramos por mililitro, calculada como ade-
nina o guanina.

30 La fermentación se realiza bajo condiciones aéro-
bias, por ejemplo, agitando el cultivo o el cultivo sumergi-



do, con agitación y aireación a una temperatura entre 20° C y 40° C. Se produce en el medio una notable cantidad de GTP y GDP, generalmente después de cultivo durante 36- 120 horas. La producción de GTP y GDP aumenta notablemente cuando se controla el medio de cultivo - por ejemplo, por adición de un agente neutralizante adecuado tal como, por ejemplo, disolución acuosa de hidróxido de sodio, para mantener el valor de pH entre neutro y ligeramente ácido (pH 7'5 - 5'5) después de la adición de "compuesto de adenina" o "compuesto de guanina". Los GTP y/o GDP formados se recuperan por medio del tratamiento, conocido per se, por resina de intercambio iónico, adsorción precipitación o extracción después de la terminación del cultivo.

Los siguiente ejemplos ilustran ahora las realizaciones preferidas de la invención, pero no han de ser interpretados como limitantes de la misma. En ellos, los porcentajes son en peso, a menos que se indique otra cosa.

Ejemplo 1

Se usa el Brevibacterium ammoniagenes ATCC N° 6872. Se cultiva en un medio que contiene 2% de glucosa, 1% de peptona, 1% de extracto de levadura, 0'3% de CLNa y 30 microgramos por litro de biotina, a 30° C durante 24 horas.

Se inocula un medio de fermentación con 10% (en volumen) del cultivo así obtenido.

El medio de fermentación tiene la siguiente composición, realizándose el cultivo en agitación a 30° C:

Glucosa	100 gramos
Urea	6 gramos
PO ₄ H ₂ K	10 gramos
PO ₄ HK ₂	10 gramos



$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 gramos
Biotina 30 microgramos
Pantotenato de calcio 2 miligramos

Los anteriores componentes se disuelven en agua y se completa hasta un litro, siendo ajustado después el
5 pH del medio de fermentación a 8'0 con NaOH antes de la esterilización. Se colocan porciones de 20 mililitros del medio de fermentación inoculado en matraces Erlenmeyer de 250 mililitros, y se usan después de la adición de CO_3Ca en la proporción de 3 gramos por 100 mililitros del medio
10 y después de la esterilización en un autoclave durante 10 minutos, bajo una presión de 1 kilogramo por centímetro cuadrado.

Después de cultivar el medio de fermentación así inoculado durante 72 horas, se añade el líquido de fermentación una cantidad tal de guanina que se alcance la concentración de 2 miligramos de guanina por mililitro del medio
15 de fermentación. Después de cultivo durante otras 48 horas, se producen en el líquido de cultivo 2'0 miligramos de GTP (calculado como ácido libre) por mililitro. El pH del medio
20 después de la adición de guanina es mantenido entre neutro y ligeramente ácido, con hidróxido de sodio por ejemplo, y el valor del pH al final del cultivo es de 5'8. (Se producen solamente 0'26 miligramos de GTP por mililitro cuando
25 no se añade la guanina y las otras condiciones se mantienen iguales. El pH final en este caso es 6'2).

El filtrado obtenido separando las células bacterianas del líquido de fermentación, se hace pasar a través de una columna de resina de intercambio aniónico fuertemente básica (Dowex 1 (X2) (tipo Cl)), y el GTP se obtiene por elución con ácido clorhídrico diluido. Esta fracción es neutralizada con disolución acuosa de hidróxido de sodio, tratada
30



con polvo de carbón, concentrada y enfriada, para recuperar la sal de sodio del GTP.

Ejemplo 2

Se usa el Brevibacterium ammoniagenes ATCC N° 6871.

5 Se disuelven en agua 100 gramos de glucosa, 6 gramos de urea, 6 gramos de PO_4H_2K , 6 gramos de PO_4HK_2 , 6 gramos de $SO_4Mg.7H_2O$ y 5 gramos de extracto de levadura, y se completa hasta un litro. Se ajusta el pH a 6'0 y se vierte la disolución en matraces, se añade CO_3Ca en la proporción de
10 3 gramos por 100 mililitros de disolución, y se esteriliza en un autoclave durante 10 minutos bajo una presión de $1Kg/cm^2$. El medio así preparado se usa como medio de fermentación. Se añade una cantidad tal de guanina que se alcance la concentración de 2 miligramos de guanina por mililitro,
15 después de un cultivo de 72 horas, que es continuado después durante 24 horas después de la adición de la guanina. Se forman 0'57 miligramos de GTP por mililitro y algo de GDP cuando la fermentación se lleva a cabo bajo por lo demás las mismas condiciones que en el Ejemplo 1.

20 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Japón con fecha 27 de Noviembre de 1963, bajo el número 63229/63, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25 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:
30



1.- Un procedimiento para la preparación de di- y trifosfatos de guanosina, que comprende cultivar una bacteria de la especie Brevibacterium ammoniagenes en un medio nutriente, en presencia, en este último, de un miembro seleccionado del grupo que consta de guanina y guanosina, hasta que haya habido una acumulación de dichos fosfatos en dicho medio, y recuperar los di- y trifosfatos de guanosina así acumulados.

2.- Un procedimiento para la preparación de di- y trifosfatos de guanosina, que comprende cultivar una bacteria de la especie Brevibacterium ammoniagenes bajo condiciones aerobias en un medio nutriente que contiene un miembro seleccionado del grupo que consta de guanina y guanosina, a una temperatura entre aproximadamente 20° C y 40° C, durante un período de aproximadamente 36 - 120 horas, en que se efectúa una acumulación de dichos fosfatos en dicho medio, y recuperar los di- y trifosfatos de guanosina así acumulados.

3.- Un procedimiento de acuerdo con el punto 2, en el que el cultivo comprende una primera fase que se lleva a cabo en ausencia de guanina y de guanosina, y en el que el cultivo continúa a un pH de aproximadamente 5'5 a 7'5 después de la adición de cualquiera de los dos últimos compuestos al medio de cultivo.

4.- Un procedimiento de acuerdo con el punto 2, en el que el medio nutriente contiene entre aproximadamente 0'4% y aproximadamente 1'6% en peso de fosfato inorgánico (calculado como PO_4).

5.- Un procedimiento para la preparación de di- y trifosfatos de guanosina, que comprende cultivar una bacteria de la especie Brevibacterium ammoniagenes en un medio nu-



triente, en presencia, en este último, de un miembro seleccionado del grupo que consta de guanina y guanosina, en una cantidad de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 10 miligramos de dicho miembro por mililitro de medio nutriente, hasta que haya habido una acumulación de dichos fosfatos en dicho medio, y recuperar los di- y trifosfatos de guanosina así acumulados.

6.- Un procedimiento para la preparación de di- y trifosfatos de guanosina, que comprende cultivar una bacteria de la especie Brevibacterium ammoniagenes bajo condiciones aerobias en un medio nutriente que contiene un miembro seleccionado del grupo que consta de guanina y guanosina, en una cantidad de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 10 miligramos de dicho miembro por mililitro de medio nutriente, a una temperatura entre aproximadamente 20° C y 40° C, durante un período de aproximadamente 36 - 120 horas, con lo que se efectúa una acumulación de dichos fosfatos en dicho medio, y recuperar los di- y trifosfatos de guanosina así acumulados.

7.- Un procedimiento para la preparación de di- y trifosfatos de guanosina.

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

La presente Memoria consta de 9 hojas escritas a máquina por una sola cara.



Madrid,

9 FEB. 1965

P.A.

Alberto de Quintanilla
For [unclear]

Alberto

RM

M. eta