

331904



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

por VEINTE años

en España, a favor de ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUKAI (Microbial Chemistry Research Foundation), de nacionalidad japonesa, residente en 403 Kamiosaki-Nakamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japón, fundación jurídicamente organizada bajo las leyes del Japón, cuya Patente se refiere a:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN ANTIBIOTICO LLAMADO KASUGAMICINA".

-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 nuevos procedimientos para la producción de un antibiótico útil llamado kasugamicina, por fermentación. Más concretamente, se refiere a procedimientos para obtener este antibiótico con un alto rendimiento cultivando organismos productores de kasugamicina en medios conteniendo aceites vegetativos, grasas vegetativas, aceites animales, grasas animales, ácido graso o ésteres de ácidos grasos como fuente principal de carbono bajo condiciones aeróbicas.

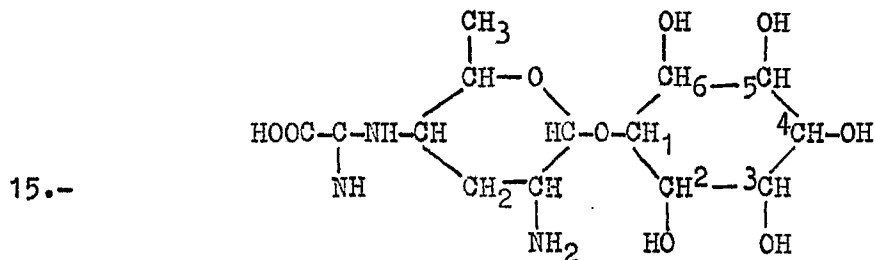
- 5.-
- 10.- La kasugamicina es un antibiótico descubierto por Umezawa, Okami, Hashimoto, Suhara, Hamada y Takeuchi (Journal of Antibiotics, Serie A, 18, 101-103, 1965) y cristaliza como sal de ácido hidroclicórico, $C_{14}H_{25}O_9N_3.HCl.H_2O$, soluble en agua, esencialmente soluble en metanol, etanol, acetona, etil acetato,
- 15.- to, éter, cloroformo y benceno, no exhibe absorción máxima de



de luz ultravioleta de 220 mμ a 400 mμ, da una reacción positiva a reactivo de nihidrina en piridina, da reacción negativa en las reacciones de Sagakuchi, Molisch, Elson-Morgan, Fehling, Tollens y de cloruro férrico, exhibe dextro-rotación de -

5.- $[\alpha]_D^{25} = + 120^\circ$ (c 1,6, H₂O), funde a 236 a 239° C. con descomposición, y tiene valores pK' (inferiores a 2, 7.1, 10.6). La kasugamicina se cristaliza como la forma libre de ácido, - C₁₄H₂₅O₉N₃.H₂O que es soluble en agua, funde a 207 a 216° C. con descomposición y da $[\alpha]_D^{25} + 115^\circ$ (c 1, H₂O). La estructura

10.- de la kasugamicina ha sido probada por Suhara, Maeda, Umezawa, Ohno (Tetrahedron Letters, No. 12, 1239-1244, 1966) como sigue:



La diaminoazúcar es 2, 3, 4, 6-tetradexi-2,4-diamino-D-mannosa. El eslabonamiento glicosídico es α. La parte de

20.- recha es D-inositol. Los hidrógenos en C₁, C₂, C₃, C₆ en D-ino

25.- sitol son axiales y los hidrógenos en C₄ y C₅ son ecuatoriales.

La kasugamicina inhibe la Piricularia oryzae que produce el tizón del arroz y a diversas bacterias, especialmente las Pseudomonas y tiene una baja toxicidad para seres humanos, animales, peces y plantas. Este antibiótico se comercializa pa

30.- ra la prevención del tizón del arroz y se utiliza como agente quimioterápico contra la infección de Pseudomonas en los seres humanos.

Se aportan ahora, por medio del presente invento, procedimientos para la producción de kasugamicina con un alto rendimiento cultivando organismos productores de kasugamicina en



- medios conteniendo aceites vegetativos, grasas vegetativas, aceites animales, grasas animales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos como fuente principal de carbono. Al medio puede añadirse como fuente de nitrógeno cualquier material nutriente que
- 5.- contenga nitrógeno que no inhiba la cepa productora de kasugamicina ni la producción de kasugamicina. Los medios contienen sales inorgánicas que son necesarias para el crecimiento de la cepa productora de kasugamicina y estimulan la producción de kasugamicina. También pueden usarse en el presente invento materiales tales como semilla de soja molida, semilla de cacahuete molida, etc., que contenga tanto la fuente de nitrógeno como la de aceites o grasas. Los inventores han repetido el cultivo de monospora de Sterptomyces kasugaensis ATCC números 15714 y 15715 con o sin tratamiento con rayos ultravioleta, rayos X, o
- 10.- agentes mutagénicos para obtener cultivos que ofrezcan un alto rendimiento de kasugamicina en el medio de fermentación. En algunos organismos, los aceites vegetativos, grasas vegetativas, grasas animales o aceites animales se encontraron ser fuentes de carbono adecuadas para el crecimiento de los organismos y la
- 15.- producción de kasugamicina.
- 20.-

Métodos experimentales

1. Ensayo de la kasugamicina: Se inoculan Pseudomonas fluorescens en un sesgo compuesto de glutamato de sodio 0,2 por ciento, K_2HPO_4 0,2%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01%, sucrosa 2,0%, extracto de jiste 0,2%, peptona 0,5% y ágar 1,2%
- 25.- (pH 6,8) y se incuba a 27° C. durante 24 horas. De este sesgo, se inocula un inóculo rizado en un caldo conteniendo un 1% de glucosa y se incuba a 27° C. durante 24 horas. En una placa de Petri se extienden 10 cc. de un medio consistente en glucosa -
- 30.- 0,5%, peptona 0,5%, y ágar 2,0% (diámetro de la placa de Petri



9 cm.), y se cubre con una capa de semilla hecha de 5 cc. del mismo medio inoculado con el caldo cultivado mencionado, a una concentración del 0,5%. Se colocan discos (8 cm. de diámetro) conteniendo una muestra de prueba, y se incuban a 27°C. durante 5.- 17 a 18 horas. La muestra y el standard (hidrocloruro puro de kasugamicina) se diluyen con tampón de fosfato de pH 7,0. La kasugamicina muestra generalmente un diámetro de inhibición de 22 mm. a 400 mcg/ml.

2. Agitación del cultivo. Se realiza en redomas de 10.- 500 cc. de volumen en una máquina de agitación recíproca (amplitud de 8 cm. a 150 golpes por minuto) o en redomas de Erlenmeyer de 500 cc. de volumen en una máquina de agitación rotatoria (200 r.p.m.).

3. Identificación de la kasugamicina: La kasugamicina del filtrado de cultivo se absorbe sobre una resina de intercambio de cationes conteniendo ácido sulfónico como grupo - 15.- activo que se usa como H^+ ó NH_4^+ , y la kasugamicina absorbida se leviga con amoníaco diluído acuoso y después de la neutralización con HCl y concentración, se precipita con etanol y se 20.- seca. El polvo se aplica a electroforesis de alto voltaje, con comparación de kasugamicina pura bajo 3.000 V/40 cm. Si es necesario se recristaliza como su hidrocloruro desde agua por adición de etanol.

Se añaden varias fuentes de carbono a un medio consistente en 2,5% de harina de soja, 0,3% de cloruro de sodio, 25.- 0,1% de K_2HPO_4 , 0,05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y se examina el rendimiento de kasugamicina en varios medios. Se colocan 70 cc. de cada medio en cada redoma y se cultivan con agitación en una máquina de agitación recíproca. El medio se esteriliza a 120°C. durante 30.- 15 minutos. Se inocula una suspensión de espores de un cul



- tivo de Streptomyces kasugaensis. Después, los más altos rendimientos se obtienen a los 6 ó 7 días, consiguiéndose los siguientes resultados: 1.360 mcg/ml con maltosa al 3,0%, 1.400 mcg/ml con aceite de soja al 1,0%, 2.240 mcg/ml con aceite de soja al 2,0%, 2.120 mcg/ml con aceite de soja al 3,0%. Así, el aceite de soja no es inferior a la maltosa como fuente de carbono para la producción de kasugamicina, sino más bien superior. La impureza de la maltosa a veces reduce el rendimiento de kasugamicina y por lo tanto el aceite de soja es prácticamente mucho más superior
- 5.- que la maltosa para la producción. La maltosa y el glicerol se han conocido como la mejor fuente de carbono para la producción: Utilizando el mismo medio básico antes descrito, se añaden varios aceites o grasas al 2,0%, y se cultiva con agitación el mismo cultivo de Streptomyces kasugaensis. Después se obtiene el siguiente rendimiento más alto: 2.400 mcg/cc con aceite de coco, 2.750 mcg/cc con aceite de cacahuete, 1.800 mcg/cc con aceite de oliva, 2.500 mcg/cc con aceite de soja, 2.300 mcg/cc con aceite de linaza, 2.400 mcg/cc con aceite de colza, 2.350 mcg/cc con aceite de semilla de algodón, 2.050 mcg/cc con aceite de ballena, 2.400
- 10.- mcg/cc con manteca de cerdo, 2.300 mcg/cc con mantequilla. En los experimentos descritos se usa harina de soja como polvo del que se extraen los aceites y grasas. Si un material utilizado como fuente de hidrógeno contiene aceite o grasas, los aceites o grasas del material pueden ser utilizados para la producción
- 15.- sin o con la adición de aceites. Los aceites o grasas de materiales tales como semilla de soja, semilla de cacahuete, semilla de algodón, etc., pueden utilizarse como fuente de carbono para las cepas productoras de kasugamicina y la producción de kasugamicina. En un experimento hecho por un método similar al
- 20.- descrito antes, cuando se inocula una cepa productora de kasugamicina a un medio conteniendo un 6,0% de semilla de soja mo-
- 25.-
- 30.-



lida, 0,05% de K_2HPO_4 , 0,1% de NaCl, 0,05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, se producen 2.720 mcg/cc de kasugamicina al séptimo día de cultivo bajo agitación. Se obtienen 2.460 mcg/cc de kasugamicina al séptimo día de cultivo en un medio conteniendo un 8,0% de semi

5.- lla de cacahuete molida, en lugar de la semilla de soja molida.

Los aceites o grasas son fuentes de carbono útiles - para la producción de kasugamicina también en medios conteniendo otras fuentes de nitrógeno distintas de la harina de soja.-

Da un alto rendimiento de kasugamicina en medio conteniendo ex

10.- tracto de jiste, extracto de carne, peptona, avena o nitrógeno inorgánico como fuentes de nitrógeno. No solamente los aceites vegetativos, las grasas vegetativas, los aceites animales o las grasas animales, sino también los ácidos grasos o sus ésteres son también fuentes de carbono adecuadas para la producción de

15.- kasugamicina. En experimentos realizados por el mismo método - que se describe arriba, con la excepción de usar un subcultivo diferente de Streptomyces kasugaensis, se obtiene la siguiente producción de kasugamicina en medio conteniendo un 2,0% de áci

do graso o sus ésteres: 1.050 mcg/cc con ácido palmítico, 1.200

20.- mcg/cc con ácido esteárico, 320 mcg/cc con triestearato de gli

cerol, 3.100 mcg/cc con trioleato de glicerol, 910 mcg/cc con palmitato de metilo, 1.800 mcg/cc con oleato de metilo, 1.840

mcg/cc con oleato de etilo, 1.800 mcg/cc con oleato de butilo, 320 mcg/cc con un 2% de glicerol y 880 mcg/cc con un 3% de mal

25.- tosa. Así, no solamente el glicerol sino también los ácidos gra

sos, que son productos hidrolizados de aceites o grasas, se uti

lizan para la producción de kasugamicina. La cepa más producti

va que se ha obtenido dió 10.000 mcg/ml de kasugamicina, en un medio consistente en un 6,0% de aceite de soja, y un 5,0% de -

30.- harina de soja (pH inicial ajustado a 6,5) en el cultivo de -



agitación.

El presente invento se refiere al procedimiento de producción de kasugamicina, cultivando una cepa productora de kasugamicina en un medio conteniendo glicéridos, ácido graso o ésteres de ácidos grasos como fuente principal de carbono bajo condiciones aeróbicas. Pueden añadirse desde el principio de la fermentación, o puede dividirse la adición durante la fermentación. La cantidad de aceites o grasas usadas generalmente no es menor del 2,0% del medio. La cantidad óptima depende de la cepa y de las condiciones de la fermentación, tales como ai reacción, otros nutrientes y temperatura. Como se halló por el presente invento que los aceites vegetativos, grasas vegetativas, aceites animales, grasas animales, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos son fuentes de carbono adecuadas para la producción de kasugamicina como fuente principal de carbono, es este invento no queda limitado por los ejemplos que siguen:

Ejemplo I

Se colocaron 70 ml de medio conteniendo un 0,3% de extracto de jiste, un 0,4% de peptona, un 0,1% de K_2HPO_4 , un 0,1% de NaCl, un 0,05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, un 0,02% de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y un 0,5% de harina de soja, en una redoma de 500 cc. de volumen, esterilizándose a 120° C. durante 20 minutos. Se inoculó una cantidad rizada de mezcla de micelio y esporas de Streptomyces kasugaensis de un cultivo de sesgo, a cinco redomas conteniendo el medio esterilizado y cultivado controladamente en una máquina de agitación recíproca a 28 a 30° C. Durante el cultivo de agitación, se añadió aceite de soja al 0,5% cada 24 horas, cuatro veces. Después, la media de kasugamicina en cinco redomas era de 2.880 mcg/cc. Los caldos de cinco redomas se combinaron y filtraron y se obtuvieron 280 cc del filtrado, contene-



niendo 2.900 mcg/cc de kasugamicina. Se pasaron a través de una columna de 1 cm. de diámetro conteniendo 50 cc de resina de ácido sulfúrico en forma NH_4^+ . Después de pasar 500 cc de agua, se pasaron 0,5 N NH_4OH , y se obtuvo el levigado de 32 cc mostrando actividad. Se neutralizó con 1 N HCl, y después de su concentración en vacío y secado se obtuvieron 2,1 g. de polvo marrón claro. Contenia 540 mg. de kasugamicina y la electroforesis de alto voltaje indicó que contenía kasugamicina solamente como sustancia antimicrobiana.

10.- Ejemplo 2.

Por el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se cultivó con agitación la misma cepa 48 horas en un medio conteniendo un 2,5% de harina de soja (con la grasa eliminada), un 0,1% de K_2HPO_4 , un 0,3% de NaCl, un 0,04% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, un 0,3% de glucosa, y un 1,5% de aceite de soja. Se inocularon 75 cc. del caldo así obtenido a 10 litros de un medio consistente en un 2,5% de harina de soja (con la grasa extraída) un 0,1% de K_2HPO_4 , un 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, un 2,2% de aceite de ballena purificado, un 0,02% de resina de silicona como agente antiespumante (el pH inicial se ajustó a 6,8), y se esterilizó a 120° C. durante 25 minutos en un fermentador de tina de 20 litros de volumen. La fermentación se hizo bajo un agitador a 300 r.p.m., 10 litros de aire por minuto y a 28° C. Después, a las 96 horas, se produjeron 2.350 mcg/cc de kasugamicina. Se tomaron 300 cc. del medio y se extrajo la kasugamicina por el mismo procedimiento antes descrito, y se obtuvo 2,1 g. de un polvo que contenía 415 mg. de kasugamicina. Este polvo se disolvió en 100 ml. de agua destilada y se pasó a través de una columna de 1 cm. de diámetro conteniendo 50 ml. de resina de ácido sulfúrico (Amberlita XE-100) de tipo H^+ , y después de pa



sar 500 cc. de agua, la kasugamicina absorbida fue levigada con 1 N HCl. Veintitres cc. del levigado mostrando la actividad antimicrobiana se ajustaron a pH 5,0 con una resina de intercambio de aniones (Amberlita IRA-411) y se concentraron bajo vacío a 5 cc. y se añadieron 50 cc. de etanol. Después cristalizaron 210 mg. de hidrocloreto de kasugamicina ($C_{14}H_{25}O_9N_3HCl.H_2O$).

Ejemplo 3.

Según el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 2, se cultivó una cepa productora de kasugamicina en un fermentador de tina. El medio del fermentador de tina contenía un 3,0% de extracto de jiste, un 0,1% de NaCl, un 0,1% de K_2HPO_4 , un 0,05% de $MgSO_4.7H_2O$, un 2,0% de aceite de manteca de cerdo. A las 92 horas, se produjeron 2.860 mcg/cc. de kasugamicina.

Ejemplo 4.

15.- Se colocó un litro de un medio conteniendo un 5,0% de harina de soja, un 4% de aceite de soja, un 1,0% de glucosa, un 0,1% de K_2HPO_4 en una redoma de Erlenmeyer de 5 litros de volumen y se esterilizó a 120° C. durante 20 minutos. Se inocularon esporas de un cultivo de Streptomyces kasugaensis y se cultivaron bajo agitación a 27 a 28° C. durante 48 horas en una máquina de agitación rotatoria. El pH inicial del medio se ajustó a 6,5. El caldo así obtenido fue inoculado a 1.200 litros de un medio colocado en un fermentador de acero inoxidable de 2.000 litros de volumen. El medio contenía un 4,0% de aceite de soja, 20.- un 5,0% de harina de soja, y un 0,1% de K_2HPO_4 . El pH inicial se ajustó a 6,3. La fermentación se hizo a 28° C. bajo agitación a 200 r.p.m. y bajo aireación de 400 litros de aire por minuto, durante 24 horas. El caldo así obtenido se inoculó a 15.000 25.- litros en un medio en un fermentador de acero al carbono de 25.000 litros de volumen. El medio contenía un 5,0% de aceite - 30.-



- de soja, un 7,0% de harina de soja, un 0,1% de K_2HPO_4 . El pH inicial era de 6,3 a 6,4. La fermentación se hizo a 28° C., bajo agitación a 150 r.p.m., y bajo aireación de 15000 litros de aire por minuto. Después de 20 horas, el pH aumentó a 7,8 y se lle
- 5.-
vó a 6,5 por medio de la adición de ácido fosfórico. Este ajuste de pH se hizo también a las 25 y 29 horas. A las 96 horas se produjeron 2.300 mcg/cc de kasugamicina y el pH era de 7,2. A las 160 horas, se produjeron 5.900 mcg/cc de kasugamicina y el pH era 5,0. A las 220 horas se produjeron 7.900 mcg/cc de kasu-
- 10.-
gamicina y el pH era 5,3. Se interrumpió la fermentación y el pH se puso en 5,0 con ácido sulfúrico y se hizo filtración con la adición de 100 Kgs. de tierra de diatomeas. La torta se lavó con agua y ésta se añadió al filtrado, obteniéndose así 30.000 litros de licor conteniendo 111 Kgs. de kasugamicina. Se pasa-
- 15.-
ron por una columna de 2,5 mts. de diámetro conteniendo 5.000 litros de resina de ácido sulfúrico (Amberlita XE-100) de tipo Na^+ . Después se pasaron 0,5 N NaOH. La primera levigación (4.000 litros) conteniendo kasugamicina era neutra, y la segunda era alcalina que se neutralizó con resina de carboxilo en H^+ (IRC-50).
- 20.-
El levigado combinado se puso a pH 5,0 con ácido sulfúrico. Se concentró a 500 litros por medio de un evaporador de película y la solución concentrada se secó por medio de secador de pulverización. Así, se obtuvieron 198 Kgs. de kasugamicina. Este polvo era útil para aplicación agrícola. Quinientos gramos de este pol-
- 25.-
vo se disolvieron en agua destilada de 3.500 cc. y la solución se pasó a través de una columna de 1.500 cc. de una resina intercambiadora de aniones (Amberlita IRA-401) de tipo OH^- . Se pasó el agua y la solución mostrando la actividad se puso en pH -
- 30.-
5,0 con ácido hidroclicórico. Cuando se concentró a menos de 2 litros, aparecieron los cristales. La concentración se continuó -



hasta 400 ml. y después se separaron los cristales fríos por -
filtración. Así, se obtuvieron 155 gs. de hidrocloreto de kasu-
gamicina cristalina.

Descrita convenientemente la naturaleza de la actual

- 5.- Patente de Invención, como asimismo la forma de poderla, llevar
a la práctica para convertirla en una realidad industrializable
se hace constar que en la misma, serán susceptible de introducir
todas aquellas modificaciones de detalle que las circunstancias
y la práctica pudieran aconsejar, siempre y cuando que con las
10.- variantes que se introduzcan no se cambie, altere o modifique -
la esencialidad del objeto descrito.

N O T A

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

- 15.- R E I V I N D I C A C I O N E S :

1ª.- "Procedimiento para la producción de un antibió-
tico llamado kasugamicina", que comprende el cultivo de la cepa
productora de kasugamicina en un medio conteniendo aceites vege-
tativos, grasas vegetativas, aceites animales, grasas animales,
20.- ácido graso o ésteres de ácidos grasos, como fuentes principales
de carbono, bajo condiciones aeróbicas sumergidas hasta que se
imparte al medio una cantidad substancial de kasugamicina.

2ª.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN ANTIBIO-
TICO LLAMADO KASUGAMICINA".



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

Madrid, 4 de octubre de 1.966

E. GONZALEZ VACA
P.P.