

341332



MEMORIA DESCRIPTIVA

QUE SE ACOMPAÑA A LA SOLICITUD DE REGISTRO DE
PATENTE DE INVENCION

por 20 años en España y Provincias de Ultramar

a favor de:

CARTER-WALLACE, INC., de nacionalidad norteamericana,
con domicilio en 2 Park Avenue, New York, N.Y. 10016 USA.

por

"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE FRACCIONES DE XEROSINA"

- - - - -

PRIORIDAD: Patente USA nº 568.139 de fecha 27 de
Julio de 1.966.

- - - - -

INVENTORES:

Don FRANK MILAN BERGER
145 Constitution Drive
Princeton, New Jersey 08540/ USA.

Don BERNARD JOHN LUDWIG
1159 Stockton Place
N. Brunswick, New Jersey/ USA.

Don JEAN PIERRE ROSSELET
5 Cherrybrook Drive
Princeton, New Jersey/ USA.



341332

5 El invento se refiere a un procedimiento para la obtención de una fracción de xerosina no precipitable en condiciones ácidas. En especial, se refiere el invento a un procedimiento para la obtención de una nueva fracción de xerosina a partir de una mezcla de fermentación de xerosina consistente en una fase líquida mezclada con una sustancia celular sólida entera.

10 La xerosina es un producto microbiano de acción antiflogística, y sirve para influir de manera favorable en determinadas virosis, tal como ha sido descrito por GROUPE y otros en la patente estadounidense nº 3.039.923 del 19 de Junio de 1962. La mencionada patente describe un procedimiento de fermentación para producir xerosina, que consiste en
15 cultivar el "achromobacter xerosis" nº 134, del que ha sido depositada una muestra en la colección de cultivos del "Institute of Microbiology of Rutgers", Universidad del Estado New Brunswick, New Jersey (Estados Unidos de América), extraer la materia sólida
20 del medio líquido de cultivo, precipitar la xerosina en bruto del cultivo líquido mediante el ajuste del valor pH a aproximadamente 2 a 4, y purificar la xerosina en bruto mediante solución repetida en un medio
25 acuoso con un valor pH superior a aproximadamente 4, y

-341332

- 2



30 finalmente precipitarla de nuevo ajustando para ello el valor pH de la solución obtenida a una acidez de aproximadamente 2 a 4. El producto de xerosina obtenido por GROUPE y otros, es de color pardo claro a blanco y tiene un contenido medio de nitrógeno de aproximadamente 10% en peso, y un contenido medio de fósforo de alrededor de 2% en peso. El contenido de azufre del citado producto de xerosina parece ser igual a cero.

35 La finalidad del invento estriba en la formación de una nueva fracción de xerosina no precipitable en condiciones ácidas, con propiedades valiosas. Asimismo pretende el invento obtener una nueva fracción de xerosina que, a base de una mayor actividad bacteriana, tenga un valor útil más alto que las fracciones de xerosina descritas anteriormente. Otra finalidad del invento es el crear un nuevo procedimiento para la obtención de la citada fracción de xerosina a partir de una mezcla de fermentación de xerosina.

40 Finalmente pretende el invento encontrar un procedimiento para la obtención de una fracción de xerosina a partir de la sustancia celular sólida existente en el medio líquido de fermentación, así como a partir del propio medio líquido. Este y otros objetivos del invento son en parte obvios, y en parte se esclarecerán para el técnico a base de la descripción siguiente.

45

50

55 En un sentido más amplio se refiere el invento a un procedimiento para separar una fracción de xerosina no precipitable en condiciones ácidas a partir de una mezcla de fermentación de xerosina consis-



tente en una fase líquida y una sustancia celular entera sólida incorporada a la misma, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- 60 a) Separación de la sustancia celular entera sólida de la primera fase líquida;
- b) autólisis (autodigestión) o rompimiento mecánico de la sustancia celular sólida a efectos de obtener una mezcla de sustancia celular consumida en una segunda fase líquida;
- 65 c) separación de la sustancia celular consumida de la segunda fase líquida;
- d) acidificación de la segunda fase líquida a un valor pH de aproximadamente 2 - 4;
- e) extracción del precipitado insoluble en ácido, precipitado de ella;
- 70 f) neutralización de la segunda fase líquida;
- g) adición de un precipitante a la segunda fase líquida para precipitar una fracción de xerosina no precipitable mediante ácido;
- 75 h) extracción de la fracción de xerosina no precipitable mediante ácido, e
- i) tratamiento de la primera fase líquida de la etapa a) por el procedimiento de las etapas d) a h), a efectos de obtener material de xerosina adicional, no precipitable mediante ácido.
- 80

Las cantidades relativas de material de xerosina no precipitable mediante ácido (que a continuación será denominado NPM en honor a la simplicidad), que se obtienen a partir del material celular entero

85 sólido y de la fase líquida de fermentación, dependen



90 sustancialmente de la duración del período de fermentación. Así, por ejemplo, si la fermentación se lleva a cabo durante 12 horas, se obtienen cantidades mayores en NPM a partir del material celular, que cuando la fermentación tiene lugar durante períodos más largos, es decir, por ejemplo, durante 48 horas. A la inversa aumentan las cantidades relativas del producto obtenido de la fase líquida de fermentación, al prolongarse el período de fermentación.

95 Lo expuesto más arriba pone de manifiesto una ventaja del invento, que ha podido ser aprovechada especialmente en la fabricación a escala industrial de las nuevas fracciones conforme al invento. De acuerdo con este punto de vista del invento, se lleva a
100 cabo la fermentación preferentemente durante un período de tiempo relativamente corto, es decir, de 12 a 30 horas, extrayéndose toda la sustancia celular sólida del líquido de fermentación, que seguidamente se desecha, y se trata de la manera anteriormente indicada, para obtener la fracción de NPM conforme al
105 invento.

A pesar de que a sabiendas se tiran pequeñas cantidades del producto con el medio líquido de cultivo de la fermentación (caldo), pesan mucho más las
110 ventajas que las desventajas del procedimiento preferente más arriba descrito. Así, por ejemplo, el ciclo más corto de fermentación hace posible llevar a cabo más fermentaciones por unidad de tiempo en los mismos aparatos. Además de esto, y debido a que la cantidad
115 del medio líquido de cultivo de la fermentación es



341332

120 varias veces mayor que la cantidad de líquido obtenido por autólisis o rompimiento mecánico de toda la sustancia celular sólida, se elimina la necesidad de manejar grandes volúmenes de líquido. Asimismo se reduce ampliamente la cantidad de precipitante preciso para la puesta en práctica del presente procedimiento.

125 Una mezcla de fermentación con contenido de xerosina apropiada para la puesta en práctica del invento, se obtiene, por ejemplo, por el procedimiento descrito y reivindicado en la ya mencionada patente estadounidense nº 3.039.923, es decir, mediante el cultivo de una especie de "achromobacter xerosis nº 134" en un medio o caldo de cultivo sintético, complejo y nitrogenado, en presencia de oxígeno atmosférico.

130 La fermentación puede llevarse a cabo durante un período de tiempo de unos tres días, tal como se indica en la patente, obteniéndose cantidades sustanciales de la fracción NFM, tanto en el caldo líquido de fermentación, como también en toda la sustancia celular

135 sólida. Por otra parte, se puede reducir todo el ciclo de la fermentación a un solo día o incluso menos, en cuyo caso la cantidad relativa del producto NFM obtenible a partir de la sustancia celular resulta más elevada.

140 " Un caldo de cultivo compuesto por ingredientes naturales, por ejemplo, glucosa, bacto-peptona, extracto de carne y de levadura de cerveza, puede asimismo ser utilizado también para el cultivo del organismo productor de la xerosina.

145 El material celular entero sólido es extraído



del caldo líquido de cultivo por cualquier método conocido, por ejemplo, mediante centrifugado, y el caldo líquido de la fermentación se tira, o bien, si así se desea, se aparta para seguir siendo tratado.

150

Las células sólidas enteras, o bien se someten entonces a una autólisis enzimática, o se rompen mediante congelación y descongelación o por medios mecánicos, para liberar su contenido líquido.

155

Las células consumidas se separan entonces de la mencionada fase líquida por medios conocidos, tales como, centrifugado, y el valor pH de dicha fase se ajusta a un valor ácido de entre aproximadamente 2 y 4, mediante la adición de un ácido. La fracción de xerocina precipitada en la acidulación, denominada "com-

160

ponente precipitado por ácido" o abreviadamente APM, se extrae por métodos conocidos, por ejemplo, mediante centrifugado, y el valor pH del líquido se ajusta a aproximadamente 7 mediante la adición de un álcali.

165

Al líquido neutralizado se le agrega entonces un agente precipitante en cantidad suficiente para fomentar la precipitación de la fracción NPM conforme al invento, que seguidamente se recoge por medios conocidos, por ejemplo, mediante centrifugado.

170

Los agentes precipitantes utilizables para la puesta en práctica del invento, pueden ser líquidos o sólidos, seleccionándose generalmente del grupo consistente en disolventes orgánicos miscibles con agua, en los que las nuevas fracciones, conforme al invento, son sustancialmente insolubles, tales como,

175

acetona y sales inorgánicas inertes, neutras e hidro-



341332

solubles, tal como sulfato amónico. Conforme a otro punto de vista del invento, la precipitación de las fracciones conforme al invento, se lleva a cabo empleando sucesivamente ambos tipos de agentes precipitantes, es decir, mediante la adición de un disolvente orgánico miscible con agua, tal como acetona, al líquido neutralizado, separación de la fracción NPM con ello precipitada, disolución nuevamente de dicha fracción en un medio acuoso y precipitación de dicha fracción mediante la adición de una sal inorgánica inerte, neutra e hidrosoluble, tal como sulfato amónico, a dicho medio acuoso.

Si así se desea, se puede seguir tratando el caldo líquido de fermentación, del que previamente se ha extraído todo el material celular sólido, para obtener cantidades adicionales de fracciones NPM por las etapas del procedimiento más arriba descritas, es decir, mediante acidulación, centrifugado, neutralización y tratamiento con agente o agentes precipitantes.

Otro procedimiento para la puesta en práctica del invento, es la autólisis o rompimiento mecánico del material celular entero sólido, mezclado con una porción del medio líquido de fermentación. El producto enzimático de la autólisis puede agregarse entonces al restante medio líquido de fermentación para seguir siendo tratado.

Los disolventes orgánicos miscibles con agua empleados como agentes precipitantes para la puesta en práctica del invento, son líquidos en los que las



210 nuevas fracciones son prácticamente insolubles. Lí-
quidos apropiados para ello son, por ejemplo, acetona,
dioxano y los alcoholes alifáticos inferiores, tales
como etanol e isopropanol. La acetona es el disolven-
te orgánico miscible con agua que se prefiere para la
puesta en práctica del invento.

215 El disolvente orgánico miscible con agua de-
be ser empleado en una cantidad que sea suficiente pa-
ra provocar la precipitación prácticamente de toda la
fracción NPM existente en la solución. Se ha compro-
bado que una cantidad de aproximadamente 3 a 4 volú-
menes de agente precipitante con relación a un volumen
del medio que contiene el producto deseado, proporcio-
na resultados satisfactorios.

220 Como sal inorgánica neutra, inerte e hidro-
soluble, utilizable como agente precipitante, hay que
mencionar el sulfato amónico. Dicha sal se emplea en
una cantidad suficiente para originar la precipita-
ción de prácticamente todo el producto disuelto. En
225 general, se prefiere agregar al medio acuoso en que
está contenido en disolución el producto deseado, la
sal suficiente para obtener una solución de sal con
una saturación de aproximadamente 50 a 75 %.

230 Las fracciones conforme al invento son sus-
tancias sólidas amorfas de color pardo a blanco, dé-
bilmente a muy solubles en agua y en soluciones áci-
das y alcalinas, y prácticamente insolubles en la ma-
yoría de los disolventes orgánicos, tales como benzol,
cloroformo, etanol, dioxano y piridina.

235 La fracción NPM del presente invento, muestra



240 absorción ultravioleta positiva a 280 milimicras. Comparativamente presenta la sustancia APM conforme a la descripción de GROUPE y otros, una cresta en 255-260 milimicras. El peso molecular de la fracción NPM se da por el método de exclusión de Sephadex con un valor superior a aproximadamente 100.000.

245 Las fracciones NPM conforme al invento, son sustancialmente estables a temperaturas corrientes, pero tienden a perder su actividad al ser calentadas a temperaturas elevadas.

Los ejemplos siguientes, ilustran la preparación de las fracciones conforme al presente invento.

EJEMPLO I -

250 Un medio de cultivo (66 litros) de la composición siguiente fué inoculado con un cultivo bruto o mixto de "achromobacter xerosis":

- 0,3 % de extracto de levadura de cerveza
- 1,0 % de dextrosa
- 0,5 % de sulfato de aluminio
- 255 0,5 % de fosfato potásico dibásico
- 0,3 % de fosfato potásico monobásico
- 0,01 % de sulfato magnésico
- pH : 7 a 7,2

260 La incubación se llevó a cabo durante 17 horas a una temperatura de 28°C. La sustancia celular entera sólida fue extraída del medio líquido mediante centrifugado con una super-centrífuga SHARPLES.

265 El material celular entero sólido aislado de este modo, fue disgregado por vía mecánica en un molino EPPENBACH, extrayéndose y tirándose las células



consumidas, mediante centrifugado. El valor pH del líquido clarificado se ajustó a aproximadamente 3,5 mediante la adición cuidadosa de HCl 5N, y el material precipitado en condiciones ácidas APM fue extraído mediante centrifugado. El rendimiento de APM ascendió a 29,5 g.

El valor pH del líquido clarificado fue ajustado a 7,0 mediante la adición de NaOH 1N, agregándose a la solución neutralizada cuatro volúmenes de acetona. El precipitado resultante, una vez dejado reposar durante 12 horas a aproximadamente 4°C, fue recogido mediante centrifugado, seguidamente disuelto en una cantidad mínima de agua esterilizada y sometido a una filtración MILLIPORE. Se agregó a la solución sulfato amónico hasta una saturación de 75%, y el precipitado producido fue recogido al cabo de aproximadamente 12 horas de reposo, mediante centrifugado. El precipitado fue disuelto a continuación nuevamente en una cantidad mínima de agua esterilizada, sometido durante un día a la diálisis con agua desionizada y liofilizado. El rendimiento fue de 3,5 g de NPM.

El medio líquido de cultivo separado del material celular entero sólido, fue tratado sustancialmente de la manera indicada más arriba, proporcionando ya únicamente cantidades pequeñas de fracciones NPM y APM.

EJEMPLO II -

Un medio de cultivo (60 litros) fue inoculado con un cultivo mixto en bruto de "achromobacter xerosis" e incubado durante 48 horas a una temperatura



de aproximadamente 28°C. El medio de cultivo tenía la composición siguiente:

- 0,25 % de dextrosa
- 1,0 % de bactopectona
- 300 0,5 % de extracto de carne
- 0,1 % de extracto de levadura de cerveza
- pH : 7,2

305 La sustancia celular entera sólida fue separada del caldo de cultivo, y las dos fracciones se siguieron tratando por separado, sustancialmente de la manera detallada en el ejemplo I.

Del material celular se obtuvieron 7,3 g de APM y 3,8 g de NPM. Del caldo de cultivo fueron obtenidos 27,7 g de APM y 13,0 g de NPM.

310 EJEMPLO III. -

315 Un cultivo en bruto de "achromobacter xerosis" fue sometido durante 24 horas a incubación en 60 litros del medio de la composición conforme al ejemplo I. El material celular entero sólido fue separado del caldo mediante centrifugado, y después se volvió a incorporar a aproximadamente a un cuarentavo del volumen del líquido clarificado resultante. La suspensión de células fue disgregada mecánicamente en un molino EPPENBACH y se volvió a juntar con el restante líquido clarificado.

320 Después de extraído el material celular consumido mediante centrifugado, se siguió tratando el líquido clarificado conforme al Ejemplo I, obteniéndose 15,4 g de APM y 7,8 g de NPM.

341332



325

EJEMPLO IV -

330

Las células empleadas en las preparaciones siguientes fueron obtenidas mediante la fermentación de "achromobacter xerosis" en 1000 litros de medio de cultivo durante 29 horas. Las células fueron separadas del caldo mediante centrifugado en una centrifuga SHARPLES de alto rendimiento durante un período de 9 horas, y fueron congeladas hasta el momento de su empleo.

335

Las células congeladas fueron divididas en tres partes, y cada una de las partes fue tratada de la manera siguiente:

340

Las células fueron suspendidas en agua esterilizada fría y disgregadas en un molino EPPENBACH. Los fragmentos de las células fueron extraídos mediante un separador WESTPHALIA, y se tiraron. La fracción APM fue precipitada de la fase líquida ajustando el valor pH a 3,5, y recogida mediante centrifugado. El valor pH de la fase líquida se ajustó a 7,0, y se agregó sulfato amónico a la solución hasta una saturación de 75%. El precipitado de NPM resultante fué recogido mediante centrifugado, disuelto en una cantidad mínima de agua, dializado mediante el empleo de agua desionizada y liofilizado.

345

350

Los rendimientos de APM y NPM a partir de las células congeladas ascendieron a 298 g y 81 g, respectivamente.

Tal como ya ha sido indicado anteriormente, poseen las fracciones conforme al invento, valiosas propiedades antiflogísticas en animales de sangre

341332



355 caliente. Así, por ejemplo, ha sido comprobado que las fracciones en cuestión reducen las lesiones provocadas en los pulmones de ratones por el virus A de la influenza, por el virus de la enfermedad de Newcastle y por endotoxinas bacterianas.

360 La eficacia de las fracciones conforme al invento en la reducción de lesiones pulmonares en ratones infectados con el virus A de la influenza, será mostrada a continuación.

365 Fueron infectados ratones mediante la administración intranasal de virus A de la influenza, especie PR-8. El virus fue diluído en caldo de triptosa, y tres gotas de la dilución (aproximadamente 0,1 ml), en las que se calcula contienen aproximadamente, 370 10,000 LD₅₀ de virus, fueron aplicadas sobre la ventana de la nariz de cada animal de experimentación, que previamente habían sido anestesiados ligeramente con cloroformo. A la infección siguieron edema e inflamación, que alcanzaron su punto culminante al cabo de 50 a 75 horas. La afección se manifiesta en un aumento 375 del peso del pulmón y en un endurecimiento progresivo del pulmón y neumonía.

El material de experimentación a administrar se disuelve o se suspende en una solución salina exenta de sustancias pirógenas, y se homogeneiza en un 380 molturador de tejido. El producto homogeneizado es administrado a los animales de ensayo por vía intraperitoneal en tres dosis de 0,5 ml, al cabo de 1, 24 y 48 horas después de la infección, respectivamente. Ratones no infectados y ratones infectados a los que se



341332

385 suministra el líquido salino portador sin el material de experimentación, sirven como grupos de control.

Los animales fueron sacrificados 72 horas después de la infección, se extrajeron los pulmones y se determinó visualmente el grado de las lesiones, con el resultado siguiente:

390	Pulmones sin lesiones	0
	Pulmones con 1 - 25% de lesiones	+1
	Pulmones con 26 - 50% de lesiones	+2
	Pulmones con 50 - 75% de lesiones	+3
395	Pulmones con más de 75% de lesiones ..	+4
	Ratones no supervivientes con más de 75% de lesiones	+5

El porcentaje de lesiones se calcula a base de los grados de las lesiones, de la manera siguiente:

$$400 \text{ Porcentaje de lesiones} = \frac{\text{Suma de los grados de lesiones}}{\text{número de animales}} \times 100.$$

Después de comprobada la lesión de cada uno de los pulmones, se extrae la tráquea y los pulmones se pesan por grupos de diez.

La eficacia del tratamiento se determina calculando la disminución proporcional del peso de los pulmones y el porcentaje de disminución del grado de lesión, en comparación con los animales de control infectados.

Por lo general, cada muestra se experimenta en tres dosis distintas, empleándose para cada una de las dosis grupos de 20 ratones. Grupos de 30 o 20 ratones son utilizados como animales de control infecta-

341332



dos y sin infectar.

415

La dosis precisa para conseguir una reducción de 30% en una neumonía, se calcula de manera gráfica determinando el valor medio del porcentaje de disminución del grado de lesión y del peso del pulmón, y trazándolo como dosis logarítmica. Esta cifra se designa ED_{30} .

420

La toxicidad del material de experimentación se expresa como LD_{50} , lo que designa la dosis calculada en miligramos de sustancia por kilogramo de peso animal, con la que sobrevive el 50% de los animales cuando se les administra el material de experimentación por vía intraperitoneal.

425

Un cierto número de las fracciones obtenidas por el procedimiento descrito en los ejemplos precedentes, fueron experimentadas conforme al método de más arriba. En la Tabla I siguiente han sido designadas con NPM las nuevas fracciones de xerosina conforme al invento. Las fracciones de números iguales fueron obtenidas a partir de la misma fuente, por ejemplo, NPM-1 se obtuvo del mismo medio líquido del que fue precipitada APM-1 mediante tratamiento ácido.

430



TABLA I

435	Fracción	Fuente	Medio *	Tiempo de fermentación (horas)	ED ₃₀ (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)
440	APM-1	Caldo (del ejemplo I)	S	17	-	-
	NPM-1	Caldo (del ejemplo I)	S	17	-	-
445	APM-2	Células (del ejemplo I)	S	17	>25	>400
	NPM-2	Células (del ejemplo I)	S	17	3,2	100
	APM-3	Caldo (del ejemplo II)	N	48	32	>400
450	NPM-3	Caldo (del ejemplo II)	N	48	9,2	198
	APM-4	Células (del ejemplo II)	N	48	42	>400
455	NPM-4	Células (del ejemplo II)	N	48	6,2	156
	APM-5	Células y caldo combinados (del ejemplo III)	N	24	>80	>400
460	NPM-5	Células y caldo combinados (del ejemplo III)	N	24	21	167
	APM-6	Células	N	24	38	>400
	NPM-6	Células	N	24	5	135
	APM-7	Caldo	N	24	30	176
465	NPM-7	Caldo	N	24	9,4	184
	APM-8	Células	N	48	20	334
	NPM-8	Células	N	48	14	141
	APM-9	Caldo	N	48	25	300
	NPM-9	Caldo	N	48	12,5	142

470

* S = sintético; N = natural



341332²

475

Tal como se desprende de los valores expuestos anteriormente, es siempre la eficacia de las fracciones NPM conforme al invento sustancialmente superior a la de las fracciones APM correspondientes, indistintamente de si dichas fracciones son obtenidas de las células o del caldo, de si el medio de cultivo es sintético o natural, etc.

480

El invento en sus aspectos más amplios, no está limitado a las etapas de procedimiento, métodos y composiciones aquí descritos, sino que, dentro del marco de las siguientes reivindicaciones, es susceptible de modificaciones, sin por ello apartarse de los principios del invento y sin sacrificar sus ventajas principales.

485

REIVINDICACIONES

490

1ª.- Procedimiento para la obtención de fracciones de xerosina, mediante el cual, para separar una fracción de xerosina no precipitable en condiciones ácidas, a partir de una mezcla de fermentación de xerosina consistente en una fase líquida mezclada con una sustancia celular sólida entera, se caracteriza porque: a) se separa la sustancia celular sólida entera de la primera fase líquida; b) se autoliza o rompe mecánicamente la sustancia celular sólida entera a efectos de obtenerse una mixtura de sustancia celular consumida en una segunda fase líquida; c) se separa dicha sustancia celular consumida de la segunda fase líquida; d) se acidula la segunda fase líquida a un valor pH de aproximadamente 2 - 4; e) se recoge el sedimento insoluble en ácidos que se separa

495

500

341332



505 de ella; f) se neutraliza eventualmente la segunda fase líquida; g) se agrega un agente precipitante a la segunda fase líquida; h) se recoge la fracción no precipitable mediante ácidos, que precipita de ella, e i) se trata la primera fase líquida de la etapa a) por las etapas del procedimiento d) a h), a efectos de obtener material adicional no precipitable mediante ácidos.

510 2ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado porque como agente precipitante se selecciona uno del grupo consistente en disolventes orgánicos miscibles con agua y sales inorgánicas inertes, neutras e hidrosolubles.

515 3ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 2ª, caracterizado porque como agente precipitante se emplea acetona.

4ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 2ª, caracterizado porque como agente precipitante se emplea sulfato amónico.

520 5ª.- Procedimiento para separar una fracción de xerosina no precipitable en condiciones ácidas a partir de una mezcla de fermentación de xerosina consistente en una fase líquida que lleva mezclada una sustancia celular sólida entera, caracterizado por: a) separarse la sustancia celular sólida entera de la primera fase líquida; b) autolizarse o disgregarse mecánicamente la sustancia celular sólida entera para obtener una mixtura de sustancia celular consumida en una segunda fase líquida; c) separarse dicha sustancia celular consumida de la segunda fase

525

530



341332

535 líquida; d) acidularse dicha segunda fase líquida a un valor pH de aproximadamente 2 - 4; e) recogerse el precipitado insoluble en ácidos que se separa de ella; f) neutralizarse la segunda fase líquida; g) agregarse a dicha segunda fase líquida un agente precipitante, y h) recogerse la fracción no precipitable mediante ácido, que se precipita de ella.

540 6ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 5ª, caracterizado porque el agente precipitante se selecciona del grupo consistente en disolventes miscibles con agua y sales inorgánicas inertes, neutras e hidrosolubles.

545 7ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 6ª, caracterizado porque el agente precipitante es acetona.

8ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 6ª, caracterizado porque el agente precipitante es sulfato amónico.

550 9ª.- Procedimiento para separar una fracción de xerosina no precipitable en condiciones ácidas a partir de una mezcla de fermentación de xerosina consistente en una fase líquida que lleva mezclada una sustancia celular sólida entera, caracterizado por: a) separarse la sustancia celular sólida entera de la fase líquida; b) acidularse la fase líquida a un valor pH de aproximadamente 2 - 4; c) recogerse el precipitado no soluble por ácidos que se separa de ella; d) neutralizarse la fase líquida y agregársela un agente precipitante, y e) recogerse
555
560 la fracción no precipitable por ácidos que se separa



341332

de la fase líquida.

565 10ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 9ª, caracterizado porque el agente precipitante es seleccionado del grupo consistente en disolventes orgánicos miscibles con agua y sales inorgánicas inertes, neutras e hidrosolubles.

11ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 10ª, caracterizado porque el agente precipitante es acetona.

570 12ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 10ª, caracterizado porque el agente precipitante es sulfato amónico.

575 13ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por la obtención de una fracción de xerosina no precipitable mediante ácidos.

14ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 5ª, caracterizado por la obtención de una fracción de xerosina no precipitable mediante ácidos.

580 15ª.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 9ª, caracterizado por la obtención de xerosina no precipitable mediante ácidos.

La presente solicitud de registro de Patente de Invención debe recaer sobre:

585 16ª.- "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE FRACCIONES DE XEROSINA".

Todo ello, según queda sustancialmente descrito y reivindicado para los fines especificados.

Madrid, 2 de Junio de 1.967
El Ingeniero-Agente.

Graciano Helguera