

P.- 35.885

Pos 11319-Kyowa



343895

Memoria descriptiva

15 SEP 1950

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

entidad ~~=de=~~nacionalidad japonesa

con domicilio en 4, Ohtemachi-1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo,  
Japón,

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR DIPOSFATO DE ADEOSINA  
Y TRIFOSFATO DE ADEOSINA". (Clase Internacional G12d).

---

POOR  
QUALITY



El presente invento se refiere a un procedimiento para producir difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina. Más particularmente, el presente invento concierne a un procedimiento para producir difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina por fermentación en presencia de un manantial apropiado de carbono, por ejemplo carbohidratos, fosfatos inorgánicos y adenina o sus derivados.

El difosfato de adenosina y el trifosfato de adenosina producidos por el procedimiento del presente invento encuentran muchas utilidades por todo el campo bioquímico. Por ejemplo, el difosfato de adenosina encuentra utilidad en la respiración celular. La velocidad a la que los alimentos pueden ser quemados es regulada por las exigencias o necesidades de la célula en cuanto a energía útil. La utilización de trifosfato de adenosina para gobernar o mandar automáticamente los diversos procedimientos que requieren energía de las células, aumenta automáticamente el suministro disponible de difosfato de adenosina y fosfatos inorgánicos, que a su vez quedan disponibles para reaccionar por el mecanismo de copulación, y permiten que prosiga la respiración. El difosfato de adenosina y el trifosfato de adenosina (citados en lo que sigue como DPA y TPA, respectivamente), también desempeñan un importante papel en el metabolismo "in vivo" y además son importantes como reaccionantes bioquímicos, aditivos de ácido fosfórico de alta energía, y medicinas. El

**343895**



trifosfato de adenosina es también eficaz en la síntesis -  
de acetyl coenzima A, en la síntesis de sulfato activo, en  
la síntesis de colesterol, etc.

Uno de los objetos del presente invento es el  
5 de crear un procedimiento mejorado para la preparación de -  
DPA y de TPA, que se puede realizar de una manera eficaz -  
y simple.

Otro objeto del presente invento es el de crear  
un procedimiento para producir difosfato de adenosina y tri-  
10 fosfato de adenosina por un método de fermentación a una es-  
cala industrial y con buenos rendimientos.

Un objeto adicional del presente invento es -  
el de crear un procedimiento mejorado de producción de DPA  
y TPA con bajo coste, por fermentación en presencia de car-  
15 bohidratos como principal manantial de carbono.

Otros objetos y el alcance adicional de apli-  
cabilidad del presente invento resultarán evidentes a par-  
tir de la descripción detallada que se da seguidamente; se  
deberá sobreentender, sin embargo, que la descripción deta-  
20 llada y los ejemplos específicos, aunque indican realiza -  
ciones preferidas del presente invento, están dados solo -  
a título de ilustración, ya que diversos cambios y modifi-  
caciones dentro del alcance y espíritu del invento resulta-  
rán evidentes para los técnicos en la materia, a partir de-  
25 esta descripción detallada.

De acuerdo con el presente invento, se ha en-  
contrado que se puede obtener un producto y un procedi -  
miento muy mejorados para producir DPA y TPA, cultivando -  
un microorganismo capaz de producir DPA y TPA en un medio -  
30

343895



nutriente acuoso bajo condiciones aerobias en presencia -  
de al menos un carbohidrato como el principal manantial -  
de carbono, fosfatos inorgánicos, y adenina o sus deriva-  
dos, en una cantidad suficiente para acumular el difosfato  
5 de adenosina y/o el trifosfato de adenosina en el medio -  
de cultivo. Para recuperar DP<sup>A</sup> y TP<sup>A</sup> con altos rendimientos  
los carbohidratos, los fosfatos inorgánicos y la adenina -  
o sus derivados están presentes convenientemente en el me-  
dio de cultivo en concentraciones específicas.

10 Las bacterias que son capaces de asimilar los  
carbohidratos y de crecer o desarrollarse en el medio -  
nutriente acuoso, para producir de esta manera grandes -  
cantidades de DP<sup>A</sup> y TP<sup>A</sup>, se encuentran en un amplio núme-  
ro de especies y géneros. A partir de las investigaciones  
15 e identificaciones de los inventores, las cepas que tienen  
capacidades particularmente grandes para producir difosfato  
de adenosina y o trifosfato de adenosina son las que per-  
tenecen a los géneros Corynebacterium, Brevibacterium, -  
Arthrobacter y Micrococcus.

20 Como resultado de diversas investigaciones so-  
bre procedimientos para producir difosfato de adenosina y -  
trifosfato de adenosina utilizando microorganismos, los -  
presentes inventores han encontrado que cantidades signi-  
ficativas de DP<sup>A</sup> y TP<sup>A</sup> se acumulan en un medio de cultivo-  
25 utilizando microorganismos que tienen las propiedades aquí  
descritas, bajo condiciones específicas de fermentación.

Los microorganismos empleados en el presente -  
invento tienen la característica de que producen DP<sup>A</sup> y TP<sup>A</sup>  
en el medio de cultivo, conduciendo la operación de culti-  
30 vo en presencia de adenina. Los microorganismos que tienen



esta característica están distribuidos ampliamente y no -  
pueden estar limitados a una categoría o taxón específico.

Se pueden aislar excelentes cepas a partir -  
de los microorganismos que habitan en el suelo, en el aire,  
5 en los cuerpos de los animales y en otros campos natura -  
les, y cepas de material de partida en que el microorga -  
nismo es inoculado en 10 ml. de un medio de cultivo en un  
tubo de ensayo que comprende, por ejemplo, 10% de glucosa,  
1% de  $K_2HPO_4$ , 1% de  $KH_2PO_4$ , 1% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1% de ex -  
10 tracto de levadura y 30  $\mu g$ /litro de biotina. La operación  
de cultivo se realiza entonces bajo condiciones aerobias -  
con agitación. Después de 48 horas de cultivo, 0,01 ml. del  
líquido de cultivo flotante son depositados sobre un papel  
de filtro y analizados por cromatografía.

15 Son aislados los microorganismos que se de -  
tectan por irradiación ultravioleta que producen difosfato  
de adenosina y trifosfato de adenosina. Los microorganismos  
así aislados son empleados en el procedimiento del presen -  
te invento. Ilustrativos de los microorganismos que se pue -  
den utilizar en el procedimiento del presente invento in -  
20 cluyen bacterias que pertenecen a los géneros Corynebacte -  
rium, Brevibacterium, Arthrobacter y Micrococcus.

Estas cepas son utilizadas en los ejemplos -  
25 seguidamente citados.

El medio de fermentación comprende un medio -  
de cultivo sintético o un medio nutriente natural que con -  
tiene los nutrientes esenciales para el crecimiento de la -  
cepa de microorganismo empleada. Dicho medio de fermenta -  
30 ción contiene cantidades específicas de carbohidratos como



el principal manantial de carbono, y cantidades específicas de fosfatos inorgánicos así como de otros nutrientes que son bien conocidos en la técnica, tales como, -  
por ejemplo, un manantial de nitrógeno, compuestos inorgánicos y similares, que son utilizados por el microorganismo empleado en cantidades específicas.

El medio de cultivo empleado en el presente invento para producir DPA y TPA con altos rendimientos, contiene carbohidratos como el principal manantial de carbono en una cantidad de aproximadamente 5 a 20%. Los carbohidratos que se pueden utilizar en el procedimiento del presente invento incluyen, por ejemplo, glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, almidón, hidrolizados de almidón, melazas, y similares. Se pueden utilizar pequeñas cantidades de otros manantiales apropiados de carbono, tales como glicerina, manitol, sorbitol, ácidos orgánicos, hidrocarburos, etc, en el medio de fermentación, junto con los carbohidratos. Los carbohidratos pueden ser utilizados solos o en mezclas de dos o más de ellos, y también puede estar presente cualquier pequeña cantidad de otros manantiales de carbono, solos o en mezclas de dos o más de ellos.

Los fosfatos inorgánicos empleados en el medio de cultivo del presente invento para producir difosfato de adenosina y/o trifosfato de adenosina con altos rendimientos, están presentes en una cantidad de aproximadamente 0,4 a 3%, en forma de  $PO_4$ . Fosfatos inorgánicos apropiados, que se pueden utilizar con eficacia, incluyen fosfato de sodio, fosfato de dihidrógeno y sodio, fosfato de monohidrógeno y sodio, fosfato de potasio, fosfato de dihidrógeno y potasio, fosfato de monohidrógeno y potasio, y otros fos-



fatos inorgánicos similares. Los fosfatos preferidos son -  
fosfato de monohidrógeno y potasio, y fosfato de dihidróge-  
no y potasio. Otros compuestos inorgánicos que pueden aña-  
dirse al medio de cultivo de acuerdo con el presente inven-  
5 to, incluyen sulfato de magnesio, sulfato de hierro u otras  
sales de hierro, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, -  
etc.

La adenina o sus derivados son añadidos al me-  
dio de cultivo en cualquier momento durante la operación -  
de cultivo, en una cantidad suficiente para acumular difos-  
10 fato de adenosina y trifosfato de adenosina en el medio de-  
cultivo. Para producir DPA y TPA con altos rendimientos, -  
la adenina o sus derivados están presentes en el medio de-  
cultivo en una cantidad de aproximadamente 1 a 10 mg/ml.  
15 Para concentraciones menores que estas cantidades, la -  
cantidad de DPA y de TPA es correspondientemente menor. -  
Además, cuando se utilizan cantidades de adenina mayores -  
que las anteriormente mencionadas, la velocidad de conver-  
sión de adenina a DPA y a TPA es baja. La adenina o sus -  
20 derivados pueden ser añadidos al comienzo de la operación-  
de cultivo o durante el cultivo. La adenina puede ser aña-  
dida en la forma de sales inocuas tales como el clorhidrato  
o el sulfato, o derivados de los mismos, tales como adenosina,  
que pueden ser convertidos fácilmente en adenina, debi-  
25 do a las características de las cepas empleadas. Otros de-  
rivados de adenina incluyen, por ejemplo, ribosido de ade-  
nina y ribotido de adenina, incluyendo también las sustan-  
cias naturales que contienen adenina, así como la situación  
en la que los microorganismos empleados producen por su par-  
30 te adenina.

343895



Como manantial de nitrógeno, se pueden emplear -  
diversas clases de sales o compuestos orgánicos o inorgá -  
nicos, tales como urea, o sales de amonio tales como clo -  
ruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, fos -  
5 fato de amonio, etc., o uno, o más de un aminoácido, mez -  
clados en combinación, o sustancias naturales que contie -  
nen nitrógeno, tales como líquido de maceración de maíz, -  
extracto de levadura, extracto de carne, harina de pesca -  
do, peptona, caldo de cultivo, hidrolizados de caseína, -  
10 productos solubles de pescado, extracto de salvado de -  
arroz, etc. Estas sustancias pueden emplearse también solas  
o en combinación de dos o más de ellas. También puede ser -  
necesario añadir ciertos nutrientes esenciales al medio de -  
cultivo, dependiendo del microorganismo particular empleado,  
15 tales como aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico, treo -  
nina, metionina, etc., y/o vitaminas, por ejemplo biotina,  
tiamina, cobalamina y similares.

La fermentación se conduce bajo condiciones -  
aerobias, tales como agitación aerobia del cultivo, o con  
20 agitación de un cultivo sumergido, a una temperatura de -  
aproximadamente 20 a 40°C y a un pH de aproximadamente 5 a  
9. Se encuentra que se acumulan en el líquido de fermenta -  
ción cantidades notablemente grandes de difosfato de ade -  
nosina y trifosfato de adenosina.

25 Después de completarse la fermentación, el difos -  
fato de adenosina y el trifosfato de adenosina pueden ser -  
separados del líquido de cultivo por medios convencionales,  
tales como tratamiento con resinas de intercambio de iones,  
precipitación con sales metálicas, métodos de extracción, -  
30 métodos convencionales de adsorción, cromatografía y simi -  
lares.



Los siguientes ejemplos están dados simplemente como ilustrativos del presente invento y no han de ser considerados como limitativos. Salvo que se indique lo contrario, los porcentajes están en peso en la memoria y en los ejemplos.

Ejemplo 1. Como bacteria de siembra se utiliza Corynebacterium sp No. 3485 ATCC 21084. Esta es cultivada a 30°C durante 24 horas en un medio de siembra que consiste en 2% de glucosa, 1% de peptona, 1% de extracto de levadura, 0,3% de cloruro de sodio y 30  $\mu$ g/l de biotina.

El medio de fermentación empleado tiene la siguiente composición: 120 g de glucosa, 12 g de  $K_2HPO_4$ , 12 g de  $KH_2PO_4$ , 12 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 6 g de urea; 10 g de extracto de levadura y 30  $\mu$ g de biotina por litro del medio de cultivo.

En la composición anterior, la urea es esterilizada separadamente en solución al 12% y es añadida a 19 ml. del resto del medio de fermentación, que fué esterilizado previamente en un autoclave bajo las condiciones de 1 kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 10 minutos.

El cultivo de siembra es inoculado en los 20 ml. del medio de fermentación contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. en una cantidad de 10% en volumen del mismo. La fermentación se realiza con agitación aerobia del cultivo a 30°C. Después de 72 horas de cultivo, se añade adenina al medio de fermentación para proporcionar una concentración de 2 mg/ml. Después de 48 horas adicionales de cultivo, se acumulan en el líquido de fermentación

343895



tación difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina, en cantidades de 1,1 mg/ml y 4,2 mg/ml, respectivamente.

El filtrado, obtenido separando por filtración cuerpos celulares del líquido de fermentación, fué hecho -  
5 pasar a través de una columna de resina de intercambio de aniones fuertemente básica, del tipo de cloruro de Dowex - 1 (X 2). Cada fracción de difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina obtenida por la elución con ácido clorhídrico fué neutralizada con sosa caustica y subsiguientemente  
10 te fué tratada con polvo de carbono. Después de ésto, se concentró y enfrió. Se obtuvieron cristales de sales de sodio de difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina.

Se observó que si se repetía el ejemplo anterior cambiando solo la concentración de glucosa a 3%, o  
15 cambiando solo la concentración de  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$  a 0,2%, manteniéndose iguales que anteriormente todas las otras condiciones, la cantidad de DEA y la cantidad de TPA producidas eran en ambos casos de 0,5 mg/ml o menos, respectivamente.

Ejemplo 2.- Como microorganismo de siembra se utiliza Arthrobacter sp No. 3486 ATCC 21085 y las otras  
20 condiciones de cultivo son las mismas que en el ejemplo 1. Las cantidades de difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina acumuladas en el líquido de fermentación son, respectivamente, de 2,1 mg/ml y 3,8 mg/ml.

Ejemplo 3.- Como microorganismo de siembra se utiliza Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872, y las otras  
25 condiciones de cultivo son las mismas que en el Ejemplo 1. Las cantidades de difosfato de adenosina y trifosfato de ade-

30

13.9.67.-

- 10 -

343895



nosina acumuladas en el líquido de fermentación son, res -  
pectivamente, de 0,6 mg/ml. y 5,1 mg/ml.

Ejemplo 4.- Como microorganismo de siembra -  
se utiliza Micrococcus sedonensis ATCC 15932, y las con-  
5 diciones de cultivo son las mismas que en el Ejemplo 1. -  
Las cantidades de difosfato de adenosina y trifosfato de-  
adenosina acumuladas en el líquido de fermentación son, -  
respectivamente, de 0,6 mg/ml y 1,7 mg/ml.

Si el ejemplo 4 se lleva a cabo utilizando -  
10 3% de glucosa o 0,2% de  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$ , la cantidad de -  
difosfato de adenosina y la cantidad de trifosfato de ade-  
nosina acumuladas son, respectivamente, de 0,3 mg/ml. y -  
0,4 mg/ml. en ambos casos.

Habiéndose descrito de esta manera el invento,  
15 resultará evidente que el mismo se puede variar de muchas  
maneras. Dichas variaciones no han de ser consideradas como  
una desviación del espíritu y del alcance del invento, y -  
se pretende que todas estas modificaciones estén incluidas  
dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

20 Esta Solicitud, que corresponde a la presen-  
tada en Japón el 5 de Agosto de 1.966, bajo el número -  
51.664/66 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 esta Solicitud de -  
Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los  
30 siguientes:

**343895**



15

1). Un procedimiento para producir difosfato -  
de adenosina y trifosfato de adenosina, que comprende cul-  
tivar un microorganismo capaz de producir difosfato de -  
adenosina y trifosfato de adenosina en un medio nutriente  
5 acuoso bajo condiciones aerobias, en presencia de al menos  
un carbohidrato como principal manantial de carbono, un -  
fosfato inorgánico, y adenina o sus derivados.

2). El procedimiento de la reivindicación 1, -  
en que el microorganismo capaz de producir difosfato de -  
10 adenosina y trifosfato de adenosina pertenece a un género  
seleccionado del grupo que consiste en Corynebacterium, -  
Brevibacterium, Arthrobacter y Micrococcus.

3). El procedimiento de la reivindicación 1, -  
en que el microorganismo es Corynebacterium sp. núm. 3485  
15 ATCC 21084.

4). El procedimiento de la reivindicación 1, -  
en que el microorganismo es Brevibacterium ammoniagenes -  
ATCC 6872.

5). El procedimiento de la reivindicación 1, -  
20 en que el microorganismo es Arthrobacter sp. No. 3486 ATCC  
21085.

6). El procedimiento de la reivindicación 1, -  
en que el microorganismo es Micrococcus sodonensis ATCC -  
15932.

25 7). El procedimiento de la reivindicación 1, en  
que el carbohidrato es glucosa y el fosfato inorgánico es -  
una mezcla de fosfato de monohidrógeno y potasio y fosfato-  
de dihidrógeno y potasio.

343895

30 8). Un procedimiento para producir difosfato -  
de adenosina y trifosfato de adenosina, que comprende cul-



5            10            15            20

tivar un microorganismo que pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en Corynebacterium, Brevibacterium, Arthrobacter y Micrococcus, en un medio nutriente-acuoso bajo condiciones aerobias, en presencia de aproximadamente 5 a 20% de carbohidratos, como principal manantial de carbono, aproximadamente 0,4% a 3,0% de fosfatos-inorgánicos en forma de  $PO_4$ , y adenina o sus derivados, en una cantidad suficiente para acumular difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina, y recuperar el difosfato de adenosina y el trifosfato de adenosina del medio.

9). El procedimiento de la reivindicación 8, en que la adenina o sus derivados están presentes en el medio de cultivo en una cantidad de aproximadamente 1 a 10 mg/ml.

10). El procedimiento de la reivindicación 8, en que los derivados de adenina están seleccionados del grupo que consiste en adenosina, ribosido de adenina y ribótido de adenina.

11). El procedimiento de la reivindicación 8, en que el microorganismo es cultivado bajo condiciones aerobias a una temperatura de aproximadamente 20 a 40°C y a un pH de aproximadamente 5 a 9.

12). El procedimiento de la reivindicación 8, en que se añaden adenina o sus derivados al medio de cultivo en cualquier momento durante la operación de cultivo.

13). El procedimiento de la reivindicación 8, en que el microorganismo está seleccionado del grupo que consiste en Corynebacterium sp N<sup>o</sup>. 3485 ATCC 21084, Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872, Arthrobacter sp n<sup>o</sup>. 3486 - ATCC 21085 y Micrococcus sodonensis ATCC 15932.

30



14). Un procedimiento para producir difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina.

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

5 Esta Memoria consta de catorce hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid,

15 SEP. 1967

P.A.

Alberto de Lizaso  
For Eder

343895