

347095

P - 36.757

Pos-12232 Kyowa

**Memoria descriptiva**



10 ENERO 1968

**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 TRIFOSFATO DE ADENOSINA y DIFOSFATO DE ADENOSINA" (Clase Internacional C12d).

23.12.67

NO FINE



Este invención se refiere a un procedimiento para preparar trifosfato de adenosina y difosfato de adenosina. Más particularmente, se refiere a un procedimiento para la producción de trifosfato de adenosina y difosfato de adenosina por fermentación. Más particularmente aún, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de trifosfato de adenosina y difosfato de adenosina por fermentación con microorganismos, en presencia de adenina o derivados de la misma.

El trifosfato de adenosina (ATP) y el difosfato de adenosina (ADP) son compuestos conocidos por la técnica, que juegan un importante papel en el metabolismo in vivo. Estos compuestos son importantes también como reactivos bioquímicos y como agentes de adición de ácido fosfórico de alta energía, así como en el campo de la medicina.

Uno de los objetos de la presente invención es proporcionar un procedimiento perfeccionado para la producción de trifosfato de adenosina y difosfato de adenosina, que resuelve los inconvenientes y deficiencias de los métodos de la técnica anterior.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir trifosfato de adenosina y/o difosfato de adenosina por fermentación, que puede ser llevado a cabo de una forma simple y eficaz.

Un objeto más de la invención es proporcionar un procedimiento para producir trifosfato de adenosina y difosfato de adenosina por fermentación, que puede ser realizado ventajosamente a escala industrial y a bajo coste, para dar un alto rendimiento de producto.



Estos y otros objetos y ventajas de la invención se harán evidentes, para los expertos en la técnica, por consideración de la siguiente Memoria descriptiva y reivindicaciones.

5                    Como resultado de varias investigaciones sobre un procedimiento para producir ATP y ADP por medio de microorganismos, el autor de la presente invención ha encontrado, según la presente solicitud que se acumulan cantidades significativas de ATP y ADP en el caldo de cultivo cuando se añaden adenina o sus derivados, o sustancias naturales que los contienen, a un medio de cultivo en el que se lleva a cabo la fermentación con microorganismos para producir ATP y ADP.

10

Los microorganismos que han de utilizarse en el procedimiento de la presente invención son bacterias que pertenecen a los géneros Corynebacterium, Micrococcus y Arthrobacter. Se incluyen los microorganismos que por sí mismos producen adenina o sus derivados.

15

La esencia de la presente invención es la adición de adenina al medio de cultivo durante la fermentación. También pueden emplearse eficazmente derivados adecuados de la misma, tales como la adenosina, ácido adenílico y similares. Es posible también utilizar sustancias naturales que contienen adenina o sus derivados, ya que éstos también dan en realidad los mismos efectos.

20

25

En la presente invención es adecuado tanto un medio sintético de cultivo como un medio nutricional natural, siempre que contenga las sustancias nutrientes esenciales para el desarrollo de la cepa empleada. Estas sustancias nutricias son muy conocidas en la técnica, e in-

30



cluyen sustancias tales como una fuente de carbono, una  
fuente de nitrógeno, compuestos inorgánicos y similares,  
que son utilizados por los microorganismos empleados en  
proporciones adecuadas. Así, como fuente de carbono, pue-  
den mencionarse, como ejemplo, los hidratos de carbono  
tales como la glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, almi-  
dón, hidrolizados de almidón, melzas, etc. o cualquier  
otros fuente adecuada de carbono tal como la glicerina,  
manitol, sorbitol, ácidos orgánicos, etc. Estas sustan-  
cias pueden utilizarse, bien como fuente aislada de car-  
bono, o en mezclas de dos o más. Como fuente de nitrógeno  
pueden emplearse varias clases de sales o compuestos inor-  
gánicos y orgánicos, tales como la urea o las sales de  
amonio, como el cloruro de amonio, nitrato de amonio,  
sulfato de amonio, fosfato de amonio, etc. o sustancias  
naturales que contienen nitrógeno, tales como el caldo  
de maceración de maíz, extracto de levadura, extracto de  
carne, peptona, harina de pescado, caldo, hidrolizados  
de caseína, ácido casamínico, solubles de pescado, extrac-  
to de salvado de arroz, etc. También la fuente de nitró-  
geno puede ser una única sustancia o una combinación de  
dos o más materiales que contienen nitrógeno. Los compues-  
tos inorgánicos que pueden ser añadidos al medio de cul-  
tivo incluyen el sulfato de magnesio, fosfato de sodio,  
fosfato de dihidrógeno y potasio, fosfato de monohidró-  
geno y potasio, sulfato de hierro, cloruro de magnesio,  
cloruro de calcio, etc.

Cuando se usan cepas mutantes que tienen re-  
querimientos nutricios particulares, las sustancias ne-  
cesarias para satisfacer estos requerimientos de desa-



5 rrollo han de ser, naturalmente, añadidas al medio de cultivo. Además, se ha observado que la adición de aminoácidos o vitaminas, por ejemplo biotina, tiamina, ácido pantoténico o compuestos que tienen una importancia fisiológica idéntica a estos compuestos (tales como la beta-alanina o coenzima A con respecto al ácido pantoténico), tiene el efecto de estabilizar el desarrollo de los microorganismos y la fermentación resultante, así como de dar lugar a un elevado rendimiento de producto.

10 Si la fermentación es realizada añadiendo compuestos de adenina a un medio de cultivo tal como se explica anteriormente, se producen, individual o conjuntamente, ATP, ADP y ácido adenílico (AMP).

15 Las cantidades de ATP, ADP y AMP producidas son aumentadas añadiendo aproximadamente 0,4% en peso o más de fosfato inorgánico en forma de  $PO_4$  al medio de cultivo. Se prefiere un contenido de aproximadamente 0,4 a 1,6% en peso en forma de  $PO_4$ , y dá un buen efecto.

20 La cantidad de adenina o derivado de la misma que ha de ser añadida al medio de cultivo es, óptimamente, de aproximadamente 1 a 10 mg/ml de adenina o su equivalente. En el curso de la fermentación puede añadirse también al medio glucosa u otros componentes nutricios.

25 La fermentación o cultivo es realizada en condiciones aeróbicas, como por ejemplo una agitación aeróbica del cultivo o con agitación y aireación de un cultivo sumergido, a una temperatura de aproximadamente 20° a 40°C y a un pH de aproximadamente 5 a 9. En estas condiciones se producen cantidades notablemente grandes de  
30 ATP, ADP y AMP después de aproximadamente 36 a 120 horas de cultivo. El rendimiento de ATP y ADP, especialmente



de ATP, aumenta mucho ajustando el pH del caldo de cultivo de modo que el pH de éste se mantenga neutro o débilmente ácido (7,5 a 5,5) después de la adición de adenina o de un derivado de la misma.

5 Una vez finalizado el cultivo, el ATP y ADP resultantes pueden ser recuperados a partir del líquido de fermentación por medios convencionales, tales como un tratamiento con resinas cambiadoras de iones, extracción con disolventes, precipitación, adsorción, o similares.

10 Los siguientes ejemplos se dan simplemente como ilustración de la presente invención, y no han de ser considerados como limitativos. Si no se indica de otro modo, los tantos por ciento indicados en los mismos y a la través de toda la solicitud de Patente son en peso.

15 Ejemplo 1.

Como bacteria de siembra se utiliza la especie 3485, ATCC 21084 de Corynebacterium. Es cultivada en un medio de cultivo que consta de 2 % de glucosa, 1% de peptona, 1% de extracto de levadura, 0,3 % de ClNa, y 30 microgramos/l de biotina, a 30°C y durante 24 horas.

20 El cultivo de siembra resultante es inoculado, en la relación de 10% (en volumen), en un medio de fermentación que tiene la composición siguiente:

- 100 g. de glucosa.
- 25 6 g de urea
- 10 g. de  $PO_4 H_2 K$
- 10 g. de  $PO_4 HK_2$
- 10 g. de  $SO_4 Mg. 7H_2O$
- 30 10 g. de extracto de levadura.



30 microgramos de biotina

0,1 g. de  $Cl_2Ca \cdot 2H_2O$

5 Los ingredientes anteriores se disuelven en un litro de agua para preparar el medio de fermentación. Después de ajustarse su pH a 8,0 con NaOH, se vierte en matraces individuales y es esterilizado a  $1 \text{ kg/cm}^2$  en un autoclave durante diez minutos.

10 Porciones de veinte ml. de la combinación de los medios de siembra y de fermentación se vierten en matraces Erlenmeyer individuales de 250 ml. Después se lleva a cabo el cultivo con agitación aeróbica a  $30^\circ C$ .

15 Después de 72 horas de cultivo se añade adenina al medio de fermentación, para dar una concentración de 2 mg/ml. Después se continúa el cultivo subsiguientemente durante 24 horas. El pH del medio de cultivo es mantenido neutro o débilmente ácido. A la terminación del cultivo el pH del medio es de 5,8. Como resultado se producen en el caldo de cultivo 3,1 mg/ml. de ATP y 0,90 mg/ml. de ADP (midiéndose cada uno de ellos en forma del ácido libre).

20 El filtrado obtenido separando las células bacterianas del líquido de fermentación se hace pasar a través de una columna de resina cambiadora de aniones fuertemente básica. La resina es Dowex (X2), del tipo cloruro. Eluyen-  
do con ácido clorhídrico se obtienen fracciones respecti-  
25 vas de ATP y ADP. Las fracciones son neutralizadas con sosa cáustica (hidróxido de sodio). Después, son tratadas con carbón en polvo, concentradas y enfriadas. Este tratamiento da como resultado la obtención de cristales de las sales de sodio de ATP y ADP, respectivamente.

30 EJEMPLO 2



Como bacteria de siembra se utiliza *Corynebacterium mycetoides* KY 3536 ATCC 21134. Se lleva a cabo el cultivo de la misma forma que la explicada en el Ejemplo 1. Como resultado se producen 1,5 mg/ml de ATP, 0,8 mg/ml. de ADP y 1,3 mg/ml. de AMP.

5

Ejemplo 3. Se lleva a cabo el mismo procedimiento que el explicado en el Ejemplo 1, empleando la especie 3484 ATCC 21084 de *Corynebacterina* como bacteria de siembra, pero la concentración de glucosa en el medio de fermentación es de 3%. Al finalizar la fermentación, se comprueba que se han producido 0,4 mg/ml. de ATP y 0,3 mg/ml. de ADP en el caldo de cultivo.

10

Ejemplo 4.

Como bacteria de siembra se emplea *Micrococcus Sodonensis* ATCC 15932. Se lleva a cabo el cultivo con ésta, en el mismo medio de cultivo y en las mismas condiciones de cultivo que las explicadas en el Ejemplo 1, durante 72 horas. Después, se añade adenina al líquido de fermentación hasta dar una concentración de la misma de 2 mg/ml. Después se continúa el cultivo durante 24 horas más. Como resultado se producen 1,3 mg/ml. de ATP y 0,5 mg/ml. de ADP (medios ambos en forma del ácido libre). Después de la adición de adenina, el pH del medio de cultivo fué mantenido en neutro o débilmente ácido, y el pH era de 6,0 al finalizar el cultivo.

15

20

25

Ejemplo 5

Se lleva a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto en que se utiliza *Micrococcus sedonensis* ATCC 15932 como bacteria de siembra y que la concentración de glucosa en el medio de fermentación es de

30

28 MAR



3%. Las cantidades de ATP y ADP producidas son 0,4 mg/ml. y 0,3 mg/ml., respectivamente.

Ejemplo 6

5 Como bacteria de siembra se emplea la especie  
3484, ATCC 21085 de Arthrobacter. Es cultivada en el mis-  
mo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones de cul-  
tivo que las explicadas en el ejemplo 1, durante 72 ho-  
ras. Después se añade adenina al líquido de fermentación  
hasta dar una concentración de 2 mg/ml. y el cultivo se  
10 continúa durante 24 horas más. Después de la adición de  
adenina, el pH del medio de cultivo es mantenido en neu-  
tro o débilmente ácido, y el pH es de 5,8 al finalizar el  
cultivo. Son producidos en el caldo de cultivo 2,3 mg/ml.  
de ATP y 0,6 mg/ml. de ADP (midiéndose ambos en forma del  
15 ácido libre).

Ejemplo 7

Se lleva a cabo el mismo procedimiento que el  
explicado en el Ejemplo 1, excepto en que se utiliza la  
especie 3484 ATCC 21085 de Arthrobacter como bacteria  
20 de siembra, y que la concentración de glucosa en el medio  
de fermentación es de 3%. Las cantidades de ATP y ADP  
producidas son de 0,8 mg/ml y 0,25 mg/ml, respectivamente.

Habiendo sido así explicada la invención, es  
obvio que puede ser variada de muchas maneras. Estas va-  
25 rriaciones no han de ser consideradas como una derivación  
del espíritu y alcance de la invención, y se considera que  
todas estas modificaciones están incluidas en el objeto  
de las reivindicaciones siguientes.

30

15.3.1968



108

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Japón, el 17 de Noviembre de 1966 Nº 75.232/66, se acoge a los beneficios del artº51 del vigente estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

## N O T A

10

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 siguientes:

15

1.-Un procedimiento para producir trifosfato de adenosina y difosfato de adenosina, que comprende cultivar un microorganismo que pertenece a un género seleccionado del grupo que consta de Corynebacterium, Micrococcus y Arthrobacter en condiciones aeróbicas y en un medio nutritivo acuoso que contiene un aditivo seleccionado del grupo que consta de adenina, derivados de adenina y sustancias que contienen adenina o un derivado de la misma, acumular trifosfato de adenosina y difosfato de adenosina en el caldo de cultivo resultante, y recuperar éstos a partir de dicho caldo.

20

25

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichos derivados de adenina son seleccionados del grupo que consta de adenosina y ácido adenílico.

30

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1,



en el que dicho aditivo está presente en el medio nutricional al comienzo del cultivo.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho aditivo es añadido al medio nutricional después de la iniciación del cultivo.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el cultivo es llevado a cabo a una temperatura de desde aproximadamente 20° hasta 40° C, y a un pH de aproximadamente 5 a 9.

6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio nutricional contiene al menos aproximadamente 0,4 % en peso de  $PO_4$  en forma de fosfato inorgánico.

7.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho aditivo es añadido al medio en una proporción que da desde aproximadamente 1 a 10 mg/ml. de adenina en el medio.

8.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pH es mantenido en un valor de entre 5,5 y 7,5 una vez que dicho aditivo es añadido a dicho medio.

9.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho medio nutricional contiene glucosa.

10.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho microorganismo es seleccionado del grupo que consta de Corynebacterium, esp. ATCC21084, Corynebacterium mycetoides ATCC 21134, Micrococcus sodonensis ATCC 15932 y Arthrobacter, esp. ATCC 21085.

11.- Un procedimiento para producir trifosfato de adenosina y difosfato de adenosina, que comprende cultivar un microorganismo que pertenece a un género seleccionado del grupo que consta de Corynebacterium Micrococcus



5 y *Arthrobacter* bajo condiciones aeróbicas, a una temperatura de desde aproximadamente 20° a 40°C y a un pH de aproximadamente 5 a 9, en un medio acuoso nutritivo que contiene aproximadamente 0,4 % a 1,6 % en peso de PO<sub>4</sub> en forma de fosfato inorgánico y un aditivo seleccionado del grupo que consta de adenina, derivados de adenina y sustancias que contienen adenina o un derivado de la misma, acumular trifosfato de adenosina y difosfato de adenosina en el caldo de cultivo resultante, y recuperar éstos a partir del caldo.

10 12.- Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho aditivo es añadido al medio nutritivo después del comienzo del cultivo.

15 13.- Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que el pH es mantenido en un valor de entre 5,5 y 7,5 una vez que dicho aditivo es añadido a dicho medio.

20 14.- Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho aditivo es añadido al medio en una proporción que da desde aproximadamente 1 hasta 10 mg/ml de adenina en el medio.

25 15.- Un procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicho microorganismo es seleccionado del grupo que consta de Corynebacterium, esp. ATCC 21084, Corynebacterium mycetoides ATCC 21134, Micrococcus sodonensis ATCC 15932 y Arthrobacter, esp. ATCC 21085.

30 16.- Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que dichos derivados de adenina son seleccionados del grupo que consta de adenosina y ácido adenílico.

17.- Un procedimiento según la reivindicación



11, en el que dicho medio nutricio contiene glucosa.

18.-Un procedimiento para producir trifosfato de adenosina y difosfato de adenosina.

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

Esta Memoria consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 11 D ENE. 1968

P. A.

Alberto de Elzaburu  
*[Handwritten signature]*

23.12.67

JMS/.

-13-