

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo  
con los datos que figuran en la pre-  
sente descripción y según el con-  
tenido de la Memoria adjunta.

19 ES 11  
21  
22  
10 A 1  
NUMERO  
**465948**  
FECHA DE PRESENTACION  
**73 ENE 1978**

**PATENTE DE INVENCION**

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
1310/77 10622/77	13-1-77 14-3-77	INGLATERRA INGLATERRA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL <b>C07D</b>	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	---	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION  
PROCEDIMIENTO DE FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE ACIDO (+)-2-(5 BETA-N-BUTIL-4 BETA-HIDROXI-2-OXO-TETRAHIDROFURAN-3 BETA-IL)-2 ALFA-METILACETICO.

71 SOLICITANTE (S)  
IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED

DOMICILIO DEL SOLICITANTE  
Imperial Chemical House, Millbank, Londres SW1P 3JF, Inglaterra

72 INVENTOR (ES)  
David Cecil Aldridge,  
Roger Bowling,  
John Charles Swait

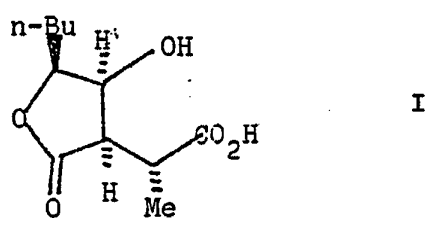
73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE  
GOMEZ-ACEBO

Esta invención se relaciona con un procedimiento de fermentación y, más particularmente, con un procedimiento de fermentación para preparar ácido (+)-2-(5β-n-butil-4β-hidroxi-2-oxo-tetrahidrofuran-3β-il)-2α-metilacético que posee valiosas propiedades para la curación de úlceras.

La producción de dihidrocanadensolida junto con hasta 3% p/p de canadensolida por fermentación de Penicillium canadense y en particular de la cepa identificada con el número 95.493 de Commonwealth Mycological Institute, Kew, Inglaterra, en un medio nutriente acuoso, ha sido descrita en la Patente Británica No. 1.434.595, reduciéndose la cantidad de canadensolida mediante tiempos de fermentación incrementados. Se ha descubierto ahora, y en esto reside la invención, que si el medio nutriente para dicha fermentación (o de una fermentación de un organismo relacionado) se extrae con disolvente a un pH dentro de una gama específica, se obtiene entonces de forma muy sorprendente la mono-lactona de ácido (+)-2-(5β-n-butil-4β-hidroxi-2-oxo-tetrahidrofuran-3β-il)-2-metilacético.

Según la invención, se proporciona un proceso de fermentación para la producción de ácido (+)-2-(5β-n-butil-4β-hidroxi-2-oxo-tetrahidrofuran-3β-il)-2α-metilacético que tiene la fórmula:

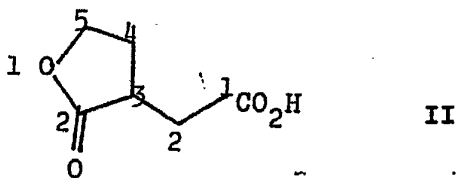


que comprende cultivar una dihidrocanadensolida productora de una cepa de la especie del género Penicillium o del género Aspergillus en un medio nutriente acuoso que contiene una fuente de carbono asimilable y una fuente de nitrógeno asimilable; extraer el fil

trado del cultivo a un pH de 3 a 7 con un disolvente orgánico prácticamente inmisible en agua; y evaporar el extracto hasta sequedad.

5. Debe entenderse que la estereoquímica mostrada en la fórmula I es relativa y que de hecho la configuración absoluta puede ser la imagen de espejo de la mostrada. Por conveniencia, se emplea en toda esta memoria el sistema  $\alpha/\beta$  de representación de la estereoquímica, estando basada la numeración en el ácido 2-(2-oxo-tetrahidrofuran-3-il)acético de fórmula:

10.



15. En esta memoria, una dihidrocanadensolida que produce una cepa de la especie del género Penicillium ó Aspergillus, significa una especie del género Penicillium ó Aspergillus que, tras el cultivo en un medio nutriente acuoso tal y como aquí se describe, seguido por extracción del filtrado de cultivo así obtenido con un disolvente orgánico prácticamente inmisible en agua, tal como aquí se describe, a un pH inferior a 3, y ulterior evaporación del extracto hasta sequedad, proporciona dihidrocanadensolida.

20. Una especie adecuada del género Penicillium es, por ejemplo, la especie Penicillium candense por ejemplo la cepa identificada con el No. 95.493 en el Commonwealth Mycological Institute (CMI), Kew, Inglaterra, o la especie Penicillium arenicola, por ejemplo, la cepa identificada con el No. 555.70 del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, Holanda.

25. Una especie adecuada del género Aspergillus es, por ejemplo la especie Aspergillus terricola var. indicus,

30.

por ejemplo, la cepa identificada como CBS No. 167.63.

Una cepa particularmente preferida de una especie del género Penicillium es, sin embargo, la identificada anteriormente como CMI No. 95.493.

5. Una fuente adecuada de carbono asimilable es, por ejemplo, glucosa, sucrosa o melazas, de las cuales se prefiere la glucosa. La fuente de carbono asimilable está presente generalmente en el medio nutriente en una concentración de 2 a 12% en peso y con preferencia de 8 a 10% en peso.
10. Una fuente adecuada de nitrógeno asimilable puede proporcionarse convenientemente, por ejemplo, mediante una sal amónica de un ácido inorgánico, por ejemplo, de ácido fosfórico, clorhídrico o sulfúrico, por una sal amónica de un ácido orgánico, por ejemplo, de ácido tartárico o acético o mediante una
15. fuente de nitrógeno orgánico, por ejemplo, un extracto de levadura. La fuente de nitrógeno asimilable está presente generalmente en el medio nutriente, en una cantidad tal que exista una concentración de 0,01 a 0,10% en peso de nitrógeno elemental, con preferencia de 0,02 a 0,04% en peso, disponible en el medio.
20. En adición, el medio contendrá también cantidades generalmente inferiores de elementos esenciales, tales como fósforo (por ejemplo, en la forma de dihidrógeno fosfato de potasio ó hidrógeno fosfato de diamonio), magnesio (por ejemplo, como carbonato o sulfato de magnesio), azufre (por ejemplo, como
25. sulfato metálico) y potasio (por ejemplo, como carbonato o cloruro de potasio), junto con cantidades generalmente aún más pequeñas de uno o más de los denominados elementos de traza, tales como hierro, cobre, zinc, manganeso o molibdeno, en forma de sales adecuadas.
30. El cultivo se efectua convenientemente a

una temperatura de, por ejemplo, 18 a 30°C, pero con preferencia se efectua en la gama de 24 a 27°C.

5. El proceso de fermentación se puede realizar utilizando condiciones de cultivo superficial convencionales o empleando condiciones de cultivo agitado y aireado convencionales, las cuales son las preferidas. Cuando se utilizan condiciones de cultivo con agitación, la fermentación se efectua preferiblemente durante al menos 7 días antes de realizar la filtración y extracción.

10. El proceso de fermentación se efectua preferiblemente con el pH del medio nutriente controlado en la gama general de 4 a 5,8 e inicialmente en o cerca de 4,5, por ejemplo a un pH de 4,3 a 4,8. El pH se puede controlar convenientemente, por ejemplo, por medios externos, por ejemplo por adición periódica de una base fuerte, tal como hidróxido potásico, o por medios internos, por ejemplo mediante inclusión de un tampon adecuado, por ejemplo hidrógenomalato de sodio, citrato de trisodio o lactato de sodio.

20. Aunque el compuesto de fórmula I se puede aislar del filtrado de cultivo (obtenido del caldo de fermentación) por extracción a un pH de 3 a 7 con un disolvente orgánico sustancialmente inmisible en agua, un pH preferido al cual se realiza la extracción del filtrado de cultivo es de, por ejemplo, 3,8 a 5, especialmente de 4 a 4,5.

25. Un disolvente orgánico inmisible en agua practicamente, adecuado, es, por ejemplo, cloroformo, acetato de etilo ó acetato de butilo, prefiriéndose entre todos estos el acetato de etilo. La evaporación de los extractos hasta sequedad se efectua preferiblemente en la forma tan rapidamente como sea posible, bajo presión reducida, y a una temperatura inferior a

30.

30°C.

Como anteriormente se ha establecido, el compuesto de fórmula I, que se puede obtener por el proceso de la invención, posee valiosas propiedades curativas de úlceras. Estas

5. propiedades se pueden demostrar convenientemente en un ensayo en donde el compuesto a evaluar se dosifica oral o subcutáneamente, diariamente, durante 21 días, a ratas en las cuales se ha producido una ulceración duodenal por aplicación de ácido acético al duodeno. La actividad curativa de úlceras se evalúa entonces sobre
10. la base de una reducción sustancial en el tamaño o incidencia de las úlceras duodenales en comparación con las úlceras de un grupo de control sin dosificar. En este ensayo, el compuesto de fórmula I muestra una actividad significativa a una dosis oral diaria de 5 mg/kg y durante el período del ensayo no se observan signos de
15. sobre-toxicidad en el compuesto de fórmula I.

- Quando se utiliza para producir un efecto curativo de úlceras en animales de sangre caliente, se administra un compuesto de fórmula I, preferiblemente como una composición farmacéutica adecuada, bajo una dosis oral o subcutánea, diaria,
20. de 50 mg/kg o menos, preferiblemente de 0,25 a 5 mg/kg, repetida si es necesario a intervalos de 4-5 horas. En el hombre, esto equivale a una dosis de 12,5 a 250 mg, 4 veces por día.

- La invención se ilustra, pero no se limita, por los siguientes ejemplos, en los cuales "Oxoid", "Cerelese" y "Gas-chrom Q" son marcas registradas y los rendimientos (cuando se indiquen) son puramente ilustrativos y no han de ser considerados como los máximos obtenibles:
- 25.

EJEMPLO 1

- Se prepara un plano inclinado de agar de
30. medio nutriente (45 ml), que comprende:

Extracto de patata (a partir de 200 g de patatas peladas y cortadas hervidas en un litro de agua desionizada, durante 20 minutos y posterior colado)

- 5. Glucosa ("Cerelose") 20g.
- Agar ("Oxoid" No. 3) 20g.
- Agua desionizada hasta 1 litro.

y se esteriliza por ebullición durante 20 minutos a 1,05 kg/cm<sup>2</sup>.

El plano inclinado se inocula con Penicillium canadense C.M.I.

- 10. 95493 (previamente mantenido en un medio de agar conteniendo 2% p/v de extracto de patata, 2% p/v de extracto de zanahoria y 2,5% p/v de "Oxoid" agar No.3 y se incuba a 25°C, durante 24 días.

El micelio y las esporas del plano inclinado se frota al interior de 100 ml de agua esteril y la suspensión así obtenida se añade a un litro de un medio que contiene:

- 15. Acido D(+)-tartarico 0,266% p/v
- Tartrato diamónico 0,266% p/v
- Hidrógenofosfato diamónico 0,04% p/v
- Carbonato potásico (anhidro) 0,04% p/v
- Carbonato de magnesio trihidratado 0,027% p/v
- 20. Sulfato amónico 0,016% p/v
- Sulfato de zinc heptahidratado 0,0042% p/v
- Sulfato ferroso heptahidratado 0,0042% p/v
- Extracto de levadura ("Oxoid") 0,10% p/v
- Glucosa ("Cerelose") 5,0% p/v

- 25. Agua desionizada hasta 100.0%

el cual se había ajustado a un pH de 5,6 por adición de una solución acuosa de hidróxido potásico, esterilizándose entonces mediante autoclaveado a 1,05 kg/cm<sup>2</sup> durante 30 minutos. La mezcla se

- 30. sacude en un matraz cónico de 2 litros, empleando un vibrador rotativo, a 200 r.p.m. durante 2 días, a 25°C. Se utilizan dos por

ciones separadas (200 ml) del caldo resultante para inocular dos porciones separadas ( 1 litro) de un medio de inóculo A que contiene:

5.	Glucosa ("Cerelose")	5,0% p/v
	Tartrato diamónico	0,24% p/v
	Dihidrógenofosfato potásico	0,50% p/v
	Sulfato de magnesio heptahidratado	0,1% p/v
	Concentrado elementos traza	0,2% v/v
	Agua desionizada	hasta 100,0%

10. el cual había sido ajustado a pH 5,6 por adición de solución acuosa de hidróxido potásico, habiendo sido esterilizado a continuación mediante autoclaveado a 1,05 kg/cm<sup>2</sup> durante 30 minutos.

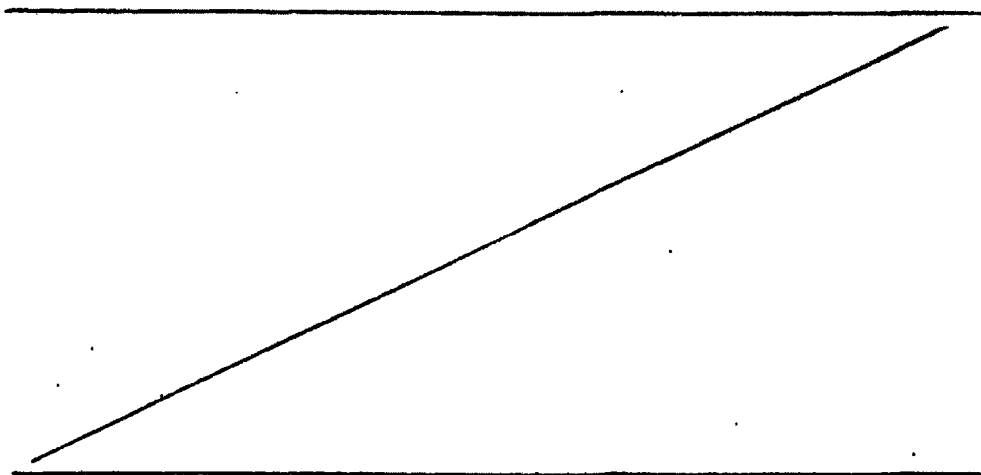
El concentrado de elementos de traza contenía los siguientes ingredientes:

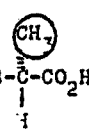
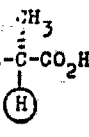
15.	Sulfato ferroso heptahidratado	0,1% p/v
	Sulfato cúprico pentahidratado	0,015% p/v
	Sulfato de zinc heptahidratado	0,1% p/v
	Sulfato de manganeso tetrahidratado	0,01% p/v
	Molibdato potásico	0,01% p/v
20.	Agua desionizada	hasta 100,0%

La mezcla resultante se sacude a 200 r.p.m. en un vibrador rotativo durante 5 días a 25°C.

El contenido de los matraces se añade a un recipiente de fermentación, de cristal, de 40 litros, que contiene 25. 33 litros de un medio de producción similar al medio de inóculo A descrito anteriormente, pero con la adición de 5% p/v más de glucosa ("Cerelose") y 0,45% p/v de hidrogeno malato de sodio. (El pH del medio de producción había sido primero ajustado a 5,6 y esterilizado mediante autoclaveado, siendo el pH a continuación 30. de 5,75).

- La fermentación se efectúa a una temperatura de 25°C con agitación a 410 r.p.m. y aireamiento a una velocidad de 15 litros/minuto. Después de 10 días de incubación, el caldo se filtra y el pH de 5,8 del filtrado de cultivo se ajusta a 4,5 por adición de ácido clorhídrico. Una porción (15 litro) del filtrado se extrae entonces con acetato de etilo (2 x 5 litros). Los extractos se combinan, se secan sobre sulfato de sodio y se evaporan hasta sequedad bajo presión reducida, a una temperatura no superior a 30°C, obteniéndose 37,7 gramos de un residuo semisólido. El residuo se tritura con 100 ml de éter, se filtra y el sólido así obtenido se lava con éter (2 x 20 ml) para dar 10,3 gramos de ácido (+)-2-(5β-n-butyl-4β-hidroxi-2-oxo-tetrahidrofuran-3β-il)-2α-metilacético. Este compuesto se purifica adicionalmente disolviendolo en un volumen mínimo de acetona a 20-25°C y añadiendo, con agitación, de 5 a 10 veces dicho volumen de petróleo ligero (p.e. 60-80°C). El precipitado cristalino puro resultante se filtra y se lava con petróleo ligero (p.e. 60-80°C) para dar material de p.f. 114-116°C,  $[\alpha]_D^{28} + 77$  (c, 2,5; metanol) de  $R_f$  0,45 (sobre placas de gel de sílice de 0,2 mm, desarrolladas en cloroformo:metanol:ácido acético, 90:5:5) y que tiene el siguiente espectro RMN característico:



Señal	$d_6$ -acetona				$d_6$ -acetona + TCAI		
	$\delta$	Tipo	Protón No.	Constante acoplamiento ( $H_z$ )	$\delta$	Tipo	Constante acoplamiento ( $H_z$ )
5 $\beta$ -n-butyl	0.89-1.72	m	9		0.90-1.72	m	
5 $\alpha$ -H	4.31	dt	1	$J_1 = 3$ $J_2 = 7$	4.6	dt	$J_1 = 3$ $J_2 = 7$
	1.46	d	3	$J = 6.5$	1.46	d	$J = 6.5$
	2.86	m	1		2.86	dq	$J_1 = 6.5$ $J_2 = 10$
4 $\alpha$ -H	4.49	dd	1	$J_1 = 3$ $J_2 = 4.5$	5.75	dd	$J_1 = 3$ $J_2 = 4.5$
3 $\alpha$ -H	2.86	m	1		3.2	dd	$J_1 = 4.5$ $J_2 = 10$

Observación a la Tabla:

Los datos del espectro RMN se determina a 100  $MH_2$  empleando tetrametilsilano como referencia interna y empleandose las abreviaturas convencionales para las interacciones complejas, por ejemplo:

m: multiplete, d: doblete, t: triplete, q: cuartete.

TCAI representa isocianato de tricloroacetilo

EJEMPLO 2

10. En primer lugar se prepara un plano inclinado de agar de medio nutriente (45 ml) que comprende :

Extracto de patata ( a partir de 200 g. de patatas peladas y cortadas hervidas en un litro de agua desionizada, durante 20 minutos, y posterior colado)

15. Glucosa ("Cerelose") 20 g.  
Agar ("Oxoid" No. 3) 20 g.

Agua desionizada hasta

1 litro

- y se esteriliza por ebullición durante 20 minutos a  $1,05 \text{ kg/cm}^2$ . Este plano inclinado se inocula con Penicillium canadense CMI No. 95493; previamente mantenido en un medio de agar que contiene 2% p/v de extracto de patata, 2% p/v de extracto de zanahoria y 2,5% p/v de "Oxoid" agar No. 3), incubándose entonces a  $25^\circ\text{C}$  durante 20 días. El micelio y las esporas del plano inclinado se frota del mismo al interior de 100 ml de agua esteril y la suspensión así obtenida se añade a un litro de un medio de inóculo que tiene
5. la misma composición que el medio de inóculo A del Ejemplo 1, y que previamente había sido ajustado a un pH de 5,6 por adición de una solución acuosa de hidróxido potásico y a continuación esterilizado mediante autoclaveado a  $1,05 \text{ kg/cm}^2$ , durante 30 minutos. La mezcla obtenida se sacude entonces a 200 r.p.m. en un vibrador ro-
10. tativo durante 7 días a  $25^\circ\text{C}$ .
15. Dos de tales porciones de la mezcla de inóculo así obtenida se añade a un recipiente de cristal de fermentación, de 40 litros, que contiene 33 litros de un medio de producción similar al medio de inóculo A descrito en el ejemplo 1, pero
20. conteniendo adicionalmente 5% p/v de glucosa ("Cerelose") y 0,45% p/v de hidrógeno malato de sodio. (El pH del medio de producción había sido ajustado previamente a 5,6 y esterilizado entonces por autoclaveado, siendo a continuación el pH de 5,5).
25. La fermentación se efectua a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  con agitación a 410 r.p.m., siendo la velocidad de aireamiento de 15 litros/minuto. Después de 14 días de incubación, el caldo se filtra y se ajusta el pH de 5,3 del filtrado de cultivo a 4 por adición de ácido clorhídrico. Se extractan entonces 12,5 litros de filtrado con acetato de etilo (2 x 6 litros). Los
30. extractos se combinan se secan sobre sulfato de sodio y se evapo-

ran hasta sequedad bajo presión reducida, a una temperatura no superior a 30°C, para obtener un residuo semisólido. Este residuo se tritura con 60 ml de éter, se filtra y el sólido así obtenido se lava con éter ( 2 x 20 litros) para dar 10,4 gramos de ácido (+)-2-(5 $\beta$ -n-butil-4 $\beta$ -hidroxi-2-oxo-tetrahidrofuran-3 $\beta$ -il)-2 $\alpha$ -metilacético, idéntico al material aislado en el Ejemplo 1 tal y como apreciarse por espectroscopia IR y RMN y comparación por cromatografía de capa fina.

EJEMPLO 3

10. En la forma descrita en el Ejemplo 2, se prepara un inóculo de Penicillium canadense (CMI No. 95493). Una porción (500 ml) de este inóculo se añade a un recipiente de cristal de fermentación de 14 litros que contiene 12 litros de un medio de producción consistente:

15.	Glucosa "Cerelese"	10% p/v
	Tartrato diamónico	0,24% p/v
	Dihidrógeno-ortofosfato de potasio	0,50% p/v
	Sulfato de magnesio heptahidratado	0,10% p/v
	* Concentrado de elementos de traza	0,20% p/v
20.	Agua desionizada hasta	100%.

Composición idéntica a la usada en el Ejemplo 17

( El pH de este medio había sido ajustado a 5,6 por adición de solución acuosa de hidróxido potásico, habiéndolo sido esterilizado a continuación por autoclaveado a 1,05 kg/cm<sup>3</sup>, durante 30 minutos).

25. La fermentación se efectúa a una temperatura de 25°C con agitación a 410 r.p.m. y aireamiento a una velocidad de 6 litros/minuto. Durante los primeros 5 días de la fermentación, el pH se mantiene en 4,3-4,6 por adición automática de solución acuosa de hidróxido potásico, controlándose median

30.

te un peachímetro. A continuación, el pH se deja subir de modo que después de 14 días de incubación, el pH del caldo sea de 5,1. El caldo se filtra entonces para dar 6,5 litros de filtrado de cultivo (C).

5. Una porción (6 litros) del filtrado C se ajusta a pH 4 por adición de ácido clorhídrico y se extracta entonces con acetato de etilo ( 2 x 3 litros) . Los extractos combinados se secan sobre sulfato de sodio y se evaporan hasta sequedad bajo presión reducida, a una temperatura de 30°C o inferior. El residuo semisólido obtenido se tritura con 60 ml de éter. Le mezcla se filtra y el sólido así obtenido se lava con éter ( 2 x 20 ml) para dar 6,2 gramos de ácido (+)-2-(5 $\beta$ -n-butyl-4 $\beta$ -hidroxi-2-oxo-tetrahidrofuran-3 $\beta$ -il)-2 $\alpha$ -metilacético idéntico al obtenido en el Ejemplo 1, tal y como se puede apreciar por espectroscopia IR y RMN y comparación por cromatografía de capa delgada.
10. 15.

#### EJEMPLO 4

- 500 ml de una porción del filtrado de cultivo C, obtenido en el Ejemplo 3, se extracta a diversos valores pH y la cantidad de ácido (+)-2-(5 $\beta$ -n-butyl-4 $\beta$ -hidroxi-2-oxotetrahidrofuran-3 $\beta$ -il)-2 $\alpha$ -metilacético (B) obtenida se estima por cromatografía gas-líquido después de su conversión al derivado bis (trimetilsililo), empleando el siguiente procedimiento:
- 20.

- Una parte alicuota del filtrado C (50 ml) (del Ejemplo 3) se ajusta a un pH particular y se extracta dos veces con acetato de etilo (30 ml, a continuación 15 ml, sacudiendo durante un minuto con cada una de las porciones). Los extractos combinados se secan sobre 10 gramos de sulfato sódico y se filtran. El residuo se lava con 5 ml de acetato de etilo y el filtrado y lavados combinados se completan a un volumen de 50 ml
25. 30.

- con más acetato de etilo. Se extrae una parte alicuota (50 µl.) de esta solución y se mezcla con (100 µl.) de piridina de calidad analítica y se añade una porción (50 µl.) de una solución recientemente preparada al 10% v/v de trimetilclorosilano en bis(trimetilsilil)acetamida. Después de una hora a 20-25°C, esta mezcla se analiza con respecto al derivado bis(trimetilsililo) de B por cromatografía gas-líquido, A, empleando una columna de cristal (1,5m x 4 mm.) que contiene caucho de goma de silicona, tipo E 301 (suministrada por Phase Separations Ltd., Queensferry, Flints hire, U.K.) revestida sobre un soporte particulado de tierra de diatomeas conocido como "Gas-chrom" Q (80-100 malla) (suministrado por Field Instruments Ltd., Orchard Road, Richmond, Surrey, U.K.) a una temperatura de 245°C y a una velocidad de flujo de nitrógeno de 60 ml/minuto empleando un detector de ionización de llama en un cromatógrafo de gas Pye Unicam Series 104 (suministrado por Pye Unicam Ltd., Cambridge, U.K.). Bajo estas condiciones, el derivado bis(trimetilsilil) de B tiene un tiempo de retención de 2 minutos.

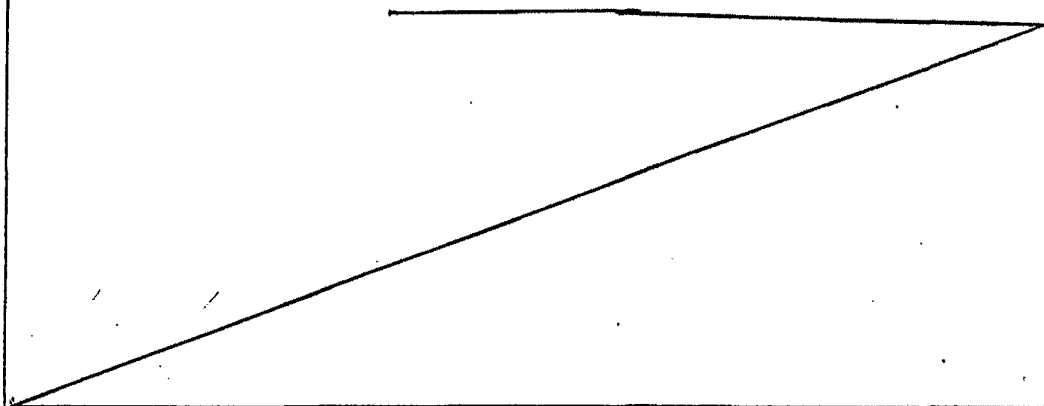
- Empleando el procedimiento anterior, se demuestra que las siguientes cantidades de B han sido extractadas del filtrado de cultivo C a un valor pH particular:

	pH	mg. de B/litro de C
	7,0	18
	6,5	89
25.	6,0	122
	5,5	316
	5,0	684
	4,5	663
	4,0	1275
	3,5	1357
30.	3,0	1263

EJEMPLO 5

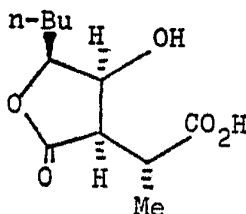
Un plano inclinado de agar de medio nutriente (preparado como en el Ejemplo 1) se inocula con Penicillium arenicola (CBS No. 555.70) y se incuba a 25°C durante 12 días.

5. El micelio y las esporas del plano inclinado se frotran del mismo a 100 ml de agua esteril. Se añaden 5 ml de está suspensión a un matraz cónico de 500 ml que contiene 100 ml del medio de producción descrito en el Ejemplo 1. El matraz se incuba a 25°C en un sacudidor rotativo.
  
10. Después de 14 días, el caldo se filtra y el filtrado de cultivo se ajusta a pH 4 por adición de ácido clorhídrico. El filtrado se extracta entonces con acetato de etilo (2 x 20 ml). Los extractos se secan y se evaporan en la forma descrita en el Ejemplo 1, 2 y 3, para dar material sólido que proporciona ácido (+)-2-(5 $\beta$ -n-butyl-4 $\beta$ -hidroxi-2-oxo-tetrahidrofuran-3 $\beta$ -il)-2 $\alpha$ -metilacético idéntico al obtenido en el Ejemplo 1, tal y como se demuestra por espectroscopía IR y RMN y por comparación según cromatografía de capa delgada.
  
15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.
  
- 20.



-REIVINDICACIONES-

1.- Procedimiento de fermentación para la producción de ácido (+)-2-(5 $\beta$ -n-butil-4 $\beta$ -hidroxi-2-oxo-tetrahidrofuran-3 $\beta$ -il)-2 $\alpha$ -metilácético, de fórmula



5. caracterizado porque comprende cultivar una cepa productora de dihidrocanadensolida de una especie del género Penicillium o del género Aspergillus, en un medio nutriente acuoso que contiene una fuente de carbono asimilable y una fuente de nitrógeno asimilable; extractar el filtrado de cultivo a un pH de 3 a 7 con disolvente orgánico practicamente inmisible en agua; y evaporar el extracto hasta sequedad.

10.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la especie del género Penicillium es la especie Penicillium canadense ó arenicola y la especie del género Aspergillus es la especie Aspergillus terricola var. indicus.

15. 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la cepa de la especie Penicillium canadense es la identificada como CMI No. 95493, la cepa de la especie Penicillium arenicola es la identificada como CBS No. 555.70 y la cepa de la especie Aspergillus terricola var. indicus es la

20. identificada como CBS No. 167.63.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la especie del género Penicillium es la especie Penicillium canadense y la especie del género Aspergillus es la especie Aspergillus terricola var. indicus.

5.- Procedimiento según la reivindicación

4, caracterizado porque la cepa de la especie Penicillium canadense es la identificada como CMI No. 95493 y la cepa de la especie Aspergillus terricola var. indicus es la identificada como CBS No. 167.63.

6.- Procedimiento según la reivindicación

1, caracterizado porque se cultiva la cepa de la especie Penicillium canadense identificada como CMI No. 95493.

7.- Procedimiento según la reivindicación

1, caracterizado porque la extracción se efectúa a un pH de 3,8 a 5.

8.- Procedimiento según la reivindicación

1, caracterizado porque el pH del medio nutriente se controla en la gama de 4 a 5.

9.- Procedimiento según la reivindicación

8, caracterizado porque el pH del medio nutriente se controla por medios externos mediante adición periódica de una base fuerte.

10.- Procedimiento según la reivindicación

8, caracterizado porque el pH del medio nutriente se controla por medios internos incluyéndolo en el mismo un tampón adecuado elegido entre malato ácido de sodio, citrato trisódico y lactato sódico.

11.- Procedimiento según la reivindicación

1, caracterizado porque el cultivo se efectúa empleando condiciones de cultivo agitado, aireado, convencionales, durante al menos 7 días de realizar la filtración y extracción.

12.- Procedimiento según la reivindicación

1, caracterizado porque la fuente de carbono asimilable es glucosa, sucrosa o melazas, y está presente en el medio nutriente en una concentración de 8 a 10% en peso.

13.- Procedimiento según la reivindicación

1, caracterizado porque la fuente de nitrógeno asimilable es una sal amónica de ácido fosfórico, clorhídrico, sulfúrico, tartárico ó acético ó un extracto de levadura, y está present en el medio nutriente de tal modo que exista una concentración de 0,02 a 0,04% en peso de nitrógeno elemental disponible en el medio.

14.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el cultivo se efectua a una temperatura de 18 a 30°C.

15.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las evaporación del extracto hasta sequedad se efectua tan rápidamente como sea posible, bajo presión reducida, y a una temperatura inferior a 30°C.

16.- Procedimiento de fermentación para la producción de ácido (+)-2-(5 $\beta$ -n-butyl-4 $\beta$ -hidroxi-2-oxo-tetrahidrofuran-3 $\beta$ -il)-2 $\alpha$ -metilacético, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 17 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid

25 SET. 1978

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED.

J. M. GOMEZ ABERO Y POMBO  
p. p. Firmador J. Suarez Diaz