



262 850

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

Por V E I N T E años

en España, a favor de la razón social "HOVIONE",  
Sociedad Industrial y Comercial de Productos  
Químicos, Ltda., entidad portuguesa, estableci-  
da en PORTUGAL, Travesía de Moinho de Vento, nº.  
6; cuya patente se refiere a:

"PROCESO DE FERMENTACION Y AISLAMIENTO DE LOS  
PRODUCTOS ACTIVOS DE LA MISMA".

.+.+.+.+.+.+.+.+

M E M O R I A D E S C R I P T I V A

La fermentación de varias especies de estrep-  
tomices y el aislamiento y purificación de los pro-  
ductos del metabolismo de acción bacteriana de los  
mismos, fué objeto de numerosísimas patentes y pu-  
blicaciones científicas.

5.-

/...



262850

Un grupo muy importante de estos productos de acción antibacteriana son las tetraciclinas, especialmente:

- Oxitetraciclina.-, producida por el "streptomices rimosus" (Sobein et al.: U.S. Patent. nº. 2.516.080, 1950 de Chas. Pfizer & Co. Inc.); "Streptomices platensis" (McGuire: Canadian Patent nº. 520.836, 1956.; Brit. Patent. nº. 713.795, 1.954, de Eli Lilly & Co); "streptomices griseoflavus" (Krainsky A. Zbl. f. Bakt /II/1.914, 41, 639.); "streptomices armillatus" (Mancy et al.: Ann. Inst. Pasteur, 1.954, 87.580); "Streptomices vendargensis" (Stehman A. et al.: Schweitz. Pat. nº. 331.988, 1.958) y "streptomices varsovensis" (Kurilowicz. Indian Patent. Apl. nº. 70.954, 1.960).

Clorotetracidina, producida por el "streptomices aureofaciens" (Duggar Ann. N.Y. Acord. Sci. 51, 177, 1948. de Lederle Lab.);

- 20.- Tetraciclina, producida por la estirpe de los "streptomices aureofaciens" en medio nutritivo exento de iones de cloro y por el "streptomices viridifaciens" (Heinemann: U.S. Patent. nº. 2.886.595, 1.959, de Bristol Lab. Inc.), sin hablar de otras tetraciclinas de menor importancia.



262850

5.- A pesar de que la presente lista está lejos de ser completa, parece que hemos demostrado que las diferentes tetraciclinas están producidas por las variadísimas estirpes de estreptomices, las cuales, por otra parte, son fácilmente aislables de la tierra de cualquier punto geográfico.

10.- El presente invento relata esencialmente la producción y aislamiento de tetraciclina, cloro-tetraciclina bajo la forma de base o sales y, además, la preparación de nuevos derivados de las tetraciclinas en general, de interés altamente elevado, ya sea para el aislamiento de las tetraciclinas, ya sea para uso médico directo, debido a sus propiedades farmacológicas favorables.

15.- El microorganismo usado durante la fermentación es el "streptomices lusitanus", estirpe aislada y seleccionada por nosotros y debidamente diferenciada de las estirpes ya conocidas, desde el punto de vista morfológico y de comportamiento fisiológico, de acuerdo con la tabla adjunta.

20.- A pesar de que otros numerosos ensayos de diferenciación han sido ejecutados, nosotros relatamos únicamente una selección escogida, según los ensayos habituales para la diferenciación de especies de estreptomices, como es des-



262 850

prende de la lectura de las patentes citadas anteriormente.

- 5.- En la tabla adjunta incluimos una estirpe, el estreptomices sp. (V.S. 117), amparada por la patente portuguesa nº. 36.308 (aislada por nosotros), productora de dehidrotetraciclina, dada la gran semejanza entre las dos estirpes, hasta el punto de que el "streptomices lusitanus" y el "streptomices sp." (V.S. 117), pueden ser considerados como pertenecientes a la misma especie, aunque sean productores de sustancias metabólicas, bien diferenciadas. A pesar de ello, la diferencia de las otras especies, hasta ahora descritas, es absolutamente característica.
- 10.-
- 15.- La estirpe de "Streptomices lusitanus", es productora de clorotetraciclina y, naturalmente, de tetraciclina en medio libre de iones de cloro.
- 20.- La estirpe de "streptomices lusitanus", siendo altamente seleccionada y dando concentraciones de producto activo, superior a 7 gr/l, presenta todas las ventajas para uso industrial, pero podemos también usar, por el simple hecho de la patente portuguesa nº. 33.767, haber sido abandonada (Bol. Prop. Ind nº. 3, página 400, 1.960), las estirpes ATCC. 11.652, 11.653 y 11.654, ahora del dominio público en Portugal, en lugar de la nuestra, aunque con un rendimiento menos favorable pa-
- 25.-

262850



ra laproducción del caldo fermentado de la tetraciclina o para clorotetraciclina, usando en el caldo una concentración de iones de cloro elevada.

5.-

Aunque la nueva estirpe "streptomices lusitanus", caracterizada por su elevadísimo rendimiento, casi dos veces mayor que la más alta referencia de la lectura de las patentes, es de por sí, un resultado científico de gran alcance,

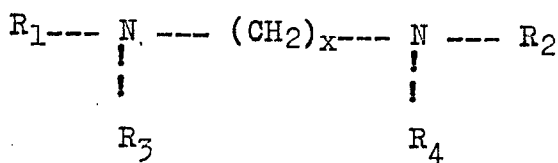
10.-

la presenta solicitud de patente presenta características absolutamente nuevas del aislamiento de productos activos, sea bajo la forma de tetraciclinas ya conocidas, o bajo la forma de nuevos derivados de las mismas.

15.-

Estos nuevos derivados son de los productos de la reacción de las tetraciclinas con diaminas de la fórmula:

20.-



en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos bencénicos o bencílicos, sustituidos o no, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> hidrógenos o grupos alquilos hasta 4 átomos, en cualquier combinación, y x representa un número de 1 a 3.

25.-

Todavía, los nuevos derivados diamínicos, pueden existir como complejos metalo-amínicos, cuando la precipitación es efectuada por adición



262850

de hidróxidos metálicos alcalinos o alcalino-térreos. La forma exente de metales se obtiene por adición de amonio para la precipitación de nuevos complejos.

5.-

La producción de los nuevos derivados de tetraciclina, puede ser hecha por varios métodos diferentes, siendo los principales:

a) Fermentación de un caldo adecuado por cualquier estreptomices, productor de tetraciclina en presencia de una de las diaminas citadas más arriba, o una sal de la misma, por ejemplo diacetato de dibenciletilenodiamina, seguido de purificación, como se indica más adelante:

10.-

b) Adición al caldo ya fermentado de una amina previamente identificada;

15.-

c) Reacción entre la misma amina y una tetraciclina ya purificada.

20.-

La presente solicitud se refiere esencialmente a los nuevos derivados de la clorotetraciclina y de la tetraciclina, siendo derivados diamínicos de otras tetraciclina, tales como los de la dimetil-deoxi-oxi-dehidro- tetraciclina, etc, objeto de una futura solicitud.

25.-

Los nuevos complejos diamínicos están caracterizados por su gran insolubilidad, formando base en medio alcalino y sales ácidas en medio ácido. La estabilidad de estos complejos (ya sea en



262850

5.- medio ácido o alcalino), es mucho más elevada que la de las tetraciclinas respectivas, lo que permite, juntamente con la gran insolubilidad selectiva, llegar a un aislamiento y purificación más simples y de rendimiento muy elevado.

10.- Podemos hidrogenar el complejo diamina-clorotetraciclina en medio ligeramente alcalino o neutro en presencia de un catalizador, como por ejemplo el paladio, resultando el complejo diamínico de la tetraciclina.

15.- La obtención de la tetraciclina simple, a partir de estos complejos básicos, puede ser efectuada, por ejemplo, por acidificación hasta el pH correspondiente al punto isoléctrico de la tetraciclina respectiva, en medio orgánico y después la precipitación de la tetraciclina correspondiente por adición de agua.

20.- Si la acidificación sobrepasa el punto isoléctrico, hasta la acidificación fuerte (pH 2 hasta 0,1), se obtienen sales ácidas de las tetraciclinas, o en presentación de clorato de sodio las sales ácidas de los complejos diamínicos de las tetraciclinas.

25.- Es interesante subrayar las ventajas primordiales del uso de las diaminas para el aislamiento de las tetraciclinas, resultando una pureza muy

262850



elevada (97 - 100% después de la primera cristalización, partiendo del caldo fermentado) y rendimiento del 60 hasta el 90%, conforme a las condiciones.

5.-

Dada la gran insolubilidad de los derivados diamínicos citados, el proceso puede ser aplicado a la recuperación de productos activos de los licores de descarga (agua mai) de cualquier proceso de aislamiento de las tetraciclina,

10.-

resultando el complejo respectivo en estado bastante puro, el cual puede ser utilizado directamente como suplemento de la alimentación del ganado, dada su inocuidad y fácil absorción o, todavía, para la recuperación de la tetraciclina pura correspondiente.

15.-

La preocupación del complejo diamínico se efectúa por adición de 1,0 - 5,0 gramos por litro de dibenciltilenodiamina diacetato (DBEDA) a un medio de cultivo, antes de la fermentación.

20.-

El medio puede ser uno de los usuales, tal como:

	Amido.....	60 gramos
	Oleo (lard-oil).....	1,8% v/v.
	Harina de Cacaoette.	3 gramos.
	Carbonato de calcio.	4 gramos.
25.-	Sulfato de amonio ..	4,5 gramos.
	Clorato de amonio...	1,5 gramos.
	Agua de aurido trigo (corn steep)	4 gramos por litro.



- Después de 120 horas el título llega a 6-10 gramos por litro. Después de acidificado y filtrado el caldo, se precipita el complejo diamínico por adición de amoníaco 10% hasta pH 8 - 8,5 o complejo metal-diamínico por adición de hidróxido de calcio hasta pH 8,0 - 8,8. Eventualmente la adición DBEDA en esta fase aumenta el rendimiento. El precipitado es estable, al contrario de las sales metálicas de la tetraciclina y no se observa, después de 36 - 48 horas de reposo, en esta mojado, una destrucción inferior al 1%.
- 5.-
- 10.-

- El precipitado filtrado y bien enjugado, sin ningún otro secado, es suspendido después en celosolve y acidificado con CH 1, hasta pH 0,3 - 2,0 bajo agitación, Manteniendo la agitación durante algunas horas, el hidrociorato puro se precipita, teniendo una pureza de 98 -100% y rendimiento del 55% hasta el 75%. En el caso de añadirse, antes de la acidificación, clorato de sodio a la suspensión (10 a 20% en peso por comparación al paso del precipitado básico) se cristaliza el complejo diamínico bajo la forma de sal de CH 1, teniendo un rendimiento en actividad de un 75 - 99% y una pureza en hidrociorato de complejo 97 - 99%.
- 15.-
- 20.-
- 25.-

262800



- El complejo dibenciletileno diamínico de la clorotetraciclina puede ser hidrogenado con la mayor facilidad por vía catalítica, usando carbón depaladio (3 a 10%), como catalizador y celosolve o alcohol butílico como disolvente y tetraciclina para mantener básico el pH. Es de subrayar que los cristales del complejo obtenidos después de la primera cristalización ácido, son de tal grado de pureza que pueden ser hidrogenados con buen rendimiento, sin recristalización suplementaria, en cuanto los procesos hasta ahora conocidos requieren, por lo menos, una cristalización más antes de la hidrogenación.
- 5.-
- 10.-
- 15.- Se dan los siguientes ejemplos para la ilustración del presente invento, sin restringir, sin embargo, su amplitud a los límites de los mismos:
- EJEMPLOS:
- 1).- Se inoculan 300 litros de medio de cultivo esterilizado como se especifica en la página 4 de la memoria descriptiva, conteniendo 2,5 gramos de dibenciletilenodiamina diacetato (DBEDA) por litro, con una suspensión de esporas de "Streptomyces lusitanus". La fermentación se efectúa a 26°C, bajo agitación, de manera aeróbica sumergida. bajo una sobrepresión por inflamiento de aire equivalente a 0,5 kg/cm<sup>3</sup>. Después de 120 horas
- 20.-
- 25.-



262850

- 5.- el título en complejo dibenciletilenodiamínico de clorotetraciclina, equivale a una actividad de 9,2 gramos por litro, expresado en actividad de clorotetraciclina. Después del filtrado del caldo acidificado con ácido sulfúrico diluido, el título desciende, debido a la disolución a 5,8 gramos, por litro. Se añaden otros 0,3 gramos por litro de DBEDA, con el fin de obtener una mayor exceso y 1,5 gramos por litro de una sal de amonio cuaternario de alquilo (por ejemplo "Arquade 16") y se añade una solución de 10% de amoníaco, hasta pH 8,2. El precipitado se filtra con una filtro adecuado y se lava con agua. Una vez bien enjugado el precipitado,
- 10.- mojado pasa a 7,2 kgs. Se suspende este precipitado en 6.300 c.c. de celosolve y se añade ácido clorhídrico concentrado, bajo fuerte agitación, hasta alcanzar pH 0,45 y se añaden 864 gramos de clorato de sodio, Después de 12 horas de agitación, se filtran los cristales, se lavan con celosolve, alcohol isopropílico y agua, obteniendo 1.753 gramos de complejo, teniendo una actividad de 835 gramos por litro, Rendimiento 63,5%. El complejo puro así obtenido tiene un punto de fusión de 223 - 231°C con descomposición, empezando a obscurecer a 209°C  $C[\alpha]_D^{20}$  (C, 1,5 en 1: 1 dimetilformamida-metanol).
- 15.-
- 20.-
- 25.-

262850



5.- 2) Se añade, a 250 litros de caldo acidificado y filtrado, fermentado por el estreptomices ATCC 11.653, conteniendo 3,6 gramos de actividad por litro, 250 gramos de DBEDA y 250 gramos de "Arquad 14" y se ajusta el pH a 8,3. Después del filtrado y lavado se obtienen 6,7 kilos de precipitado mojado. Suspendido el mismo en 6.000 c.c. de celosolve, se acidifica con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 1,4, añadiendo 804 gramos de clorato de sodio. Después de 8 horas se filtra, se lava con celosolve y alcohol isobutílico. Actividad 870 <sup>μ</sup>g/g. Rendimiento: 72%. Punto de fusión 226 -229°C, con descomposición, habiendo obscurecido desde 216°C (α)<sub>D</sub>- 215 (C, 1,5 en metanol).

10.-

15.-

3) Se procede como en el ejemplo 1, pero el caldo de la fermentación está libre de iones de cloro, teniendo la siguiente composición:

- 20.-
- Harina de soja ..... 35,0 gramos.
  - Amido ..... 5,0 "
  - Caseina predigerida ..... 1,0 gramo.
  - Nitrato de sodio ..... 3,0 gramos.
  - Carbonato de sodio ..... 0,4 "

25.- por litro de agua libre de iones de cloro, y su cristalización final en medio ácido, pasa a un pH de 1,8. El rendimiento en tetraciclina DBEDA hidrociorato, es de 1.203 gramos, teniendo una activi-



dad de 841<sup>u</sup> g/g.

5.- 4) Se añaden a 22 litros de caldo acidificado y filtrado, conteniendo 56 gramos de cloro tetraciclina, 22 gramos de Versene"

(sal de amonio cuaternario), 14 gramos de DBEDA y amoniaco (10%) hasta pH 8,3. Después de filtrado y lavado se obtienen 164 gramos de precipitado mojado, Se suspende este precipitado en 170 c.c. de celosolver, se adifi-

10.- ca hasta pH 0,4, con ácido clorhídrico concentrado, omitiendo ~~añadir~~ clorato de sodio, Se obtienen 37 gramos de clorotetraciclina clorhidrato, con una actividad de 1.000<sup>u</sup> g/g. y el rendimiento es de un 66%.

15.- 5) Se añaden a 21 litros de caldo filtrado y acidificado, conteniendo 96 gramos de clorotetraciclina, 30 gramos de Versene", 24 gramos de DBEDA y se ajusta el pH a 8,4 como amoniaco de 10%. El precipitado mojado pesa 785 gra-

20.- mos, Después de ser suspendido en 700c.c. de celosolve, se acidifica hasta pH 0,4 y se añaden 96 gramos de clorato de sodio, Después de 12 horas de agitación, se filtran los cristales y se lava con celosolve, alcohol isopropílico y agua. El producto seco pesao 91 gramos, teniendo una actividad de 838<sup>u</sup> g/g.

25.- 6) Se añaden a 6 litros de caldo filtrado y acidificado, conteniendo 35 gramos de clorote-



262800

- 5.- traciiclina, 9 gramos de "Arquad 16" y 8,8 gramos de DBEDA y se ajusta el pH, a 8,5 con hidróxido de calcio, se filtra, se lava y se seca el precipitado, El complejo calcio-DBEDA-clorotetraciiclina base así obtenido, tiene una actividad de 78<sup>M</sup> g/g.
- 10.- 7) Se disuelven 500 gramos de dibenciletílenodiamina-clorotetraciiclina-hidroclorato en 2.000 c.c. de celosolve y 290 c.c. de trietilamina y se añaden 50 gramos de carbón paladio (10%), en un aparato de hidrogenación, Se hidrogena entonces la mezcla de reacción a 45 - 50° C. bajo una presión de 2,4 kg/cm<sup>3</sup> hasta absorber 1,1 gramos mole de hidrógeno, Después se ajusta el pH 4,5 con ácido clorhídrico (15%) y se añaden 14 litros de agua. La base de tetraciiclina se precipita teniendo una actividad de 821<sup>M</sup> g/g. humedad 17,5%. Rendimiento 79%.
- 15.- 8) Se añade a una solución acuosa concentrada de 1 kilo de clorotetraciiclina hidroclorato puro, 260 gramos de DBEDA y se ajusta el pH a 8,3 con amoníaco (10%) y se filtra y lava el precipitado formado. El rendimiento en complejo DBEDA-clorotetraciiclina base es de 96%.
- 20.- 9) Se procede como en el ejemplo 8, pero en vez de clorotetraciiclina se usa tetraciiclina clorhidrato. Una vez obtenida la base mojada, se suspende en 1.800 c.c. celosolve y se ajusta el
- 25.-

262850



- 5.- pH a 1,8 con ácido clorhídrico concentrado y se añaden 120 gramos de clorato de sodios. Después de la agitación, se filtra y se lava el precipitado cristalino, resultando el clorhidrato del complejo de DBEDA-tetraciclina. Actividad 845  $\mu$ g/g. Rendimiento 91%.
- 10.- Se añaden a 1.000 litros de agua-mai de descarga de aislamiento clorotetraciclina (obtenida después de la precipitación por medio de complejo cálcico-magnésico, según el proceso ya conocido), teniendo una actividad 0,35 gr/l, 100 gramos de DBEDA y se ajusta el pH a 8,3. Se filtra, se lava y se seca el precipitado. La actividad del filtrado es de 0,06 gr/l. El complejo básico así obtenido, sirve para la preparación de suplemento de la alimentación del ganado.
- 15.- Descrita convenientemente la naturaleza del actual invento, así como la forma de poderlo llevar a la práctica para convertirlo en una realidad industrializables, se hace la aclaración de que en el mismo serán susceptibles de introducirse todas aquellas modificaciones de detalles que las circunstancias y la práctica pudieran aconsejar, siempre y cuando que con las variantes que se introduzcan, no se cambie, altere o modifique la esencialidad del objeto descrito.
- 20.-
- 25.-

262850



NOTA

Se declaran como de propiedad y novedad para todo el territorio español, el contenido de las siguientes,

5.- REIVINDICACIONES:

10.- 1ª).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, caracterizado por el hecho de fermentar, de manera sumergida y aeróbica, un medio nutritivo acuoso, conteniendo hidratos de carbono y ázoe orgánico asimilable a sales minerales, por microorganismos, especialmente con una nueva variedad de *Streptomyces* sp. debidamente diferenciada de las variedades ya descritas a una temperatura de 24 C a 30 C.

15.- 2ª).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, de acuerdo con la reivindicación 1ª., que se caracteriza por el hecho de que la sustancia activa es la clorotetraciclina en cuanto el medio contenga iones de cloro.

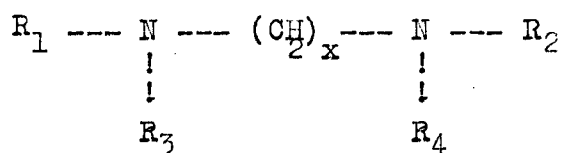
20.- 3ª).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, de conformidad con la reivindicación 1ª., caracterizado por el hecho de que la sustancia activa sea tetraciclina, en cuanto el medio está prácticamente libre de iones de cloro.

25.-



5.- 4a).- <sup>1</sup>Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, de conformidad con las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de ser recuperados los antibióticos, del caldo de fermentación.

10.- 5a).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, caracterizándose por contar con: tetraciclinas de rendimiento muy elevado, medios de cultivo fermentado, conteniendo cualquiera de las sustancias antibacterianas pertenecientes al grupo de las tetraciclinas; caracterizándose además por el hecho de que el producto activo es precipitado del caldo acidificado y filtrado, bajo la forma de nuevos complejos, por adición de una amina orgánica de fórmula general:



20.- en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos bencénicos o bencílicos, sustituidos o no; R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógenos o grupo alquilo hasta 4 átomos de carbono en cualquier combinación, la x representa un número de 1 a 3; o una sal de la misma amina de preferencia soluble en agua, y ajustar el pH entre 7 a 9,5.

25.- 6a).- <sup>1</sup>Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, caracterizado



202850

- 5.- por el hecho de ser la amina dibenciletilenodiamina bajo la forma de acetato y el pH ser ajustado por medio de bases inorgánicas, de preferencia de un metal escogido del 1º ó 2º grupo del sistema periódico de Mendelief, en cualquier combinación, juntamente de una manera facultativa con sales de los mismos metales.
- 7ª).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, caracterizado por el hecho de poner en íntimo contacto los nuevos complejos metalo-amínicos, de las tetraciclinas obtenidas según las reivindicaciones 4ª y 5ª, con un ácido mineral en presencia de los disolventes orgánicos.
- 10.-
- 8ª).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, caracterizado por el hecho de ser el disolvente un alcohol inferior, tal como metílico, isopropílico o butílico, mezclados eventualmente con alcoxietales inferiores y el ácido ser ácido clorhídrico concentrado.
- 15.-
- 9ª).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, caracterizado por el hecho de someter sucesivamente el caldo fermentado obtenido según las reivindicaciones segunda, tercera u onceava a los proceso descritos en las reivindicaciones 5ª, 6ª, 7ª y 8ª.
- 20.-
- 25.-



262850

- 10<sup>a</sup>).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, caracterizado por poseer tetraciclina del caldo fermentado por una de las estirpes de Estreptomices ATCC
- 5.- 11.652, 11.653 y 11.654, caracterizándose además, por el hecho de someter este caldo a los procesos sucesivos, como quedan descritos en las reivindicaciones 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> y 8<sup>a</sup>.
- 11<sup>a</sup>).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, caracterizado por el hecho de fermentar un medio nutritivo adecuado, de manera sumergida, aeróbica, por los microorganismos especificados en las reivindicación anterior, en presencia de una cantidad de iones de cloro, no habitualmente elevada.
- 10.- 15.-
- 12<sup>a</sup>).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, caracterizado por el hecho de hidrogenar catalíticamente el nuevo complejo metalo-amínico de la clorotetraciclina, obtenido según la reivindicación 9<sup>a</sup>, en presencia de un catalizador, tal como platino o paladio, finamente dividido, bajo una material inerte y de un disolvente a una presión de 1 a 3 kg/cm<sup>2</sup>., de manera que la hidrogenación transcurre en medio neutro o alcalino.
- 20.- 25.-
- 13<sup>a</sup>).- Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma, caracterizado por poseer sustancias antibacterianas, pertene-

262850



5.-

cientes al grupo de las tetraciclinas, caracteri-  
zándose además, por el hecho de añadirse a los li-  
cores de descagra, obtenidos por cualquier proceso,  
durante la fase de precipitación alcalina, una amina  
orgánica, conforme queda caracterizado en las rei-  
vindicación 5ª, y ajusta el pH entre 7 y 9,5.

14ª).- "PROCESO DE FERMENTACION Y AISLAMIENTO  
DE LOS PRODUCTOS ACTIVOS DE LA MISMA".

10.-

Todo ello conforme se describe y reivindica  
en la memoria que antecede que consta de VEINTE ho-  
jas, escritas a máquina por una sola de sus caras,  
acompañada de una tabla ilustrativa.

15.-

A efectos de la prioridad, y de conformidad con  
lo dispuesto en los convenios internacionales de los  
que España es signataria, se reivindica expresamen-  
te la obtenida en la solicitud formulada el día  
23 de Julio del año 1.960, en Lisboa, bajo el nú-  
mero 37.424.

20.-

Madrid, 29 de Noviembre 1.960

E. GONZALEZ VACAS  
P.P.

Agar nutritivo

Agar de agua de trigo  
(corn steep)

Leche purpura  
"Difco"

Explicación de  
abreviaturas. -

G: Desenvolvi-  
miento de la  
colonia.

AH: Desenvolvi-  
miento y/o color  
de las hifas aé-  
reas.

Sp: Esporulación

DP: Pigmentos di-  
fusibles.

R: Inverso de la  
colonia.

No hay peptorización

pH Ligeramente alca-  
lino, peptorización  
lenta, Desenvolvi-  
miento débil.

pH Invariable  
No hay peptorización  
Buen desenvolvimiento

pH Alcalino con pep-  
torización

Muy buen desenvolvi-  
miento

No hay desenvolvi-  
miento.

G: Moderado  
AH: No hay  
Sp: No hay  
DP: Castaño claro  
R: Amarillo crema

G: Abundante  
AH: Abundante  
Sp: Muy abundante  
DP: Amarillo verdoso  
R: Castaño

G: Regular/buena  
AH: No hay  
Sp: No hay  
DP: Color canela  
R: Amarillo fuerte

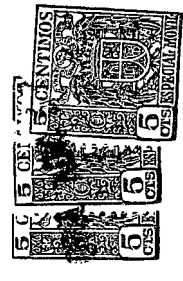
G: Abundante  
AH: Regular/buena  
Sp: Regular/buena  
DP: Color de vino tinto  
R: Amarillo fuerte

G: Abundante  
AH: Buena  
Sp: Muy buena  
DP: Encarnado acas-  
tañado  
R: Amarillo fuerte

G: Muy abundante  
AH: Muy abundante  
Sp: Muy abundante  
DP: Color de naranja

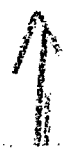
No hay desenvolvi-  
miento.

R: Encarnado acastañado  
despues bronceado



262850

E. GONZALEZ VACAS  
P. P.  
*[Signature]*



262850

Agar de glicerina asparagina

Agar de Czapek Dox

Agar de Glucose asparagina com dextrina

Streptomyces rimosus

G: No hay

G: No hay

AH: Blanco  
G: Moderado/bueno  
Sp: Debil  
DP: Amarillo claro  
R:

Streptomyces platensis

G: Bueno

AH: Abundante  
Sp: Fuerte  
DP: No hay  
R: Color aceituna fuerte

G: Moderado  
AH: Moderado; blanco gris y negro en mosaico  
Sp: Moderado  
DP: Castaño claro/ no hay  
R:

Streptomyces aureofaciens

G: Regular

AH: Blanco  
Sp: Debil  
DP: Amarillo  
R: Amarillo aceituna

G: Debil/regula  
AH: Debil  
Sp: Muy debil  
DP: No hay  
R: Pigmentado

Streptomyces viridifaciens

G: Bueno

AH: Bueno  
Sp: Bueno  
DP: Verde amarillento  
R: Castaño

G: Regular/bueno  
AH: Bueno  
Sp: Bueno  
DP: No hay  
R: Castaño clar

Streptomyces sp. (V.S.117)

G: No hay

G: Débil  
AH: Débil/blanco  
Sp: Muy debil/débil  
DP: Rosa opaco  
R: Pigmentado

G: Débil  
AH: No hay  
Sp: No hay  
DP: Rosa opaco  
R: Castaño

Streptomyces lusitanus

G: No hay

G: Débil  
AH: Blanco  
Sp: Debil  
DP: Color de leche rosada  
R: Pigmentado

G: No hay  
AH: No hay  
Sp: No hay  
DP: Rosa  
R: Castaño