

26 753 8



26 753 8

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años en España, por METODO DE PRODUCCION DE

UNA SUSTANCIA ANTIMICROBIANA

a favor de

ABBOTT LABORATORIES

domiciliado en 14th Street & Sheridan Road, North Chicago,

Illinois, EE.UU.

Inventor.- Alma Whitman Goldstein de nacionalidad norteamericana

Prioridad.-Solicitud de Patente U.S.A. nº 30.488 del 20-MAYO-1960

26 75 3 8



Esta invención se relaciona con nuevos compuestos que poseen propiedades antimicrobianas y con un proceso para la preparación de los mismos. Más particularmente, la invención se relaciona con una nueva composición de materia identificada aquí como agente antimicrobiano M-141, con un proceso para su producción por fermentación, con un método para su recuperación y concentración partiendo de soluciones crudas que incluyan los caldos de fermentación, con su purificación y con sus sales de adición ácida y la producción de las mismas.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo y útil agente antimicrobiano que sea activo contra una variedad de bacterias y organismos protozoarios, como por ejemplo la Bimeria tenella. Otro objeto de la invención es el proporcionar sales de adición ácida de este agente antimicrobiano. Otro objeto es el de ofrecer un proceso para la producción y recuperación de mi nuevo agente antimicrobiano. Otros objetos y características de la invención resultarán evidentes para los especialistas en la materia a que corresponde la misma tras la lectura de la siguiente descripción y adjuntas reivindicaciones.

Se ha descubierto que cultivando bajo condiciones controladas y en adecuados medios de cultivo una especie hasta ahora no descrita de Streptomyces, se obtiene una nueva composición de materia que se identifica aquí como agente antimicrobiano M-141. Se aisló el microorganismo de una muestra de tierra recogida cerca de Highland, Indiana. Mediante una comparación con especies de Streptomyces como se muestra en el "manual of Determinative Bacteriology" de Bergey, séptima edición, 1957, Williams and Wilkins Company, Baltimore, Meryland; "Actinomycetes and Their Antibiotics", Waksman, S.A. y Lechevalier, H.A., Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland, 1953, "A Guide for the Classification of Streptomyces According to Selected Groups" de Pridham, T.G., Hesseltine, C.W. y Benedict, R.G., "Applied Microbiology", volumen 6, núm. 1., págs. 52-79, Enero de 1958, y "Guide to the Identification of Bacteria and Actinomycetes", Sección Correspondiente a Actinomicetos,



26 75 3 8

editado por Routien, J.B., Chas. Pfizer and Company, Inc., 1957, de Krassilnikov, N.A., Academia de Ciencias U.R.S.A., Moscú, 1949, se seleccionaron dos especies más estrechamente parecidas al nuevo aislado de esta invención. Por las características de estructura biverticilada y la relativa falta de pigmento soluble entre otras, se seleccionó el Streptomyces cinnamoneus; por la estructura de micelio aéreo esporulador y esporas, así como por el color de las esporas, se seleccionó el Streptomyces netropsis. El nuevo aislado no satisfizo bastantes criterios taxonómicos para merecer su clasificación como idéntico a cualquiera de los dos anteriores organismos y ha recibido el nombre de Streptomyces flavopersicus, Novo sp. El específico epíteto deriva del latín flavus (de un amarillo brillante similar al oro, o como mazorcas de maiz maduras) y color persicus (de un color melocotón). El primero describe adecuadamente el color del micelio del substrato (reverso) de cultivos maduros en medios sólidos orgánicos y sintéticos, mientras que la palabra combinada se refiere al color amarillo claro melocotón o amarillo claro rosa, o rosa perla de la masa de esporas maduras en todos los medios que producen abundante esporulación. Se evitará la ulterior combinación del epíteto específico para describir la intensidad clara del color de las esporas, por razones de sencillez y eufonía.

Se ha depositado un cultivo del organismo vivo en el "Northern Utilization Research and Development Division of the Agricultural Research Service" del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en Peoria, Illinois, cuyo cultivo se ha añadido a su colección permanente como NRRL 2820.

La siguiente Tabla resume las semejanzas y diferencias entre el Streptomyces netropsis, el Streptomyces cinnamoneus y el Streptomyces flavopersicus. La referencia SAB aquí usada, en la Tabla, se refiere a un estudio en colaboración publicado en forma mimeográfica por el Sub

26 7538

20 MAY



comité de Taxonomía de Actinomicetos de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos en el Congreso anual de la Sociedad, St. Louis, Missouri, 1959. Los datos para la utilización de hidratos de carbono por el Streptomyces netropsis y el Streptomyces cinnamoneus fueron tomados de este informe. A efectos de comparación en la Tabla, los datos sobre el Streptomyces flavopersicus para utilización de hidratos de carbono incluyen solamente las trece fuentes duplicadas por el estudio en colaboración del Comité.

5

10

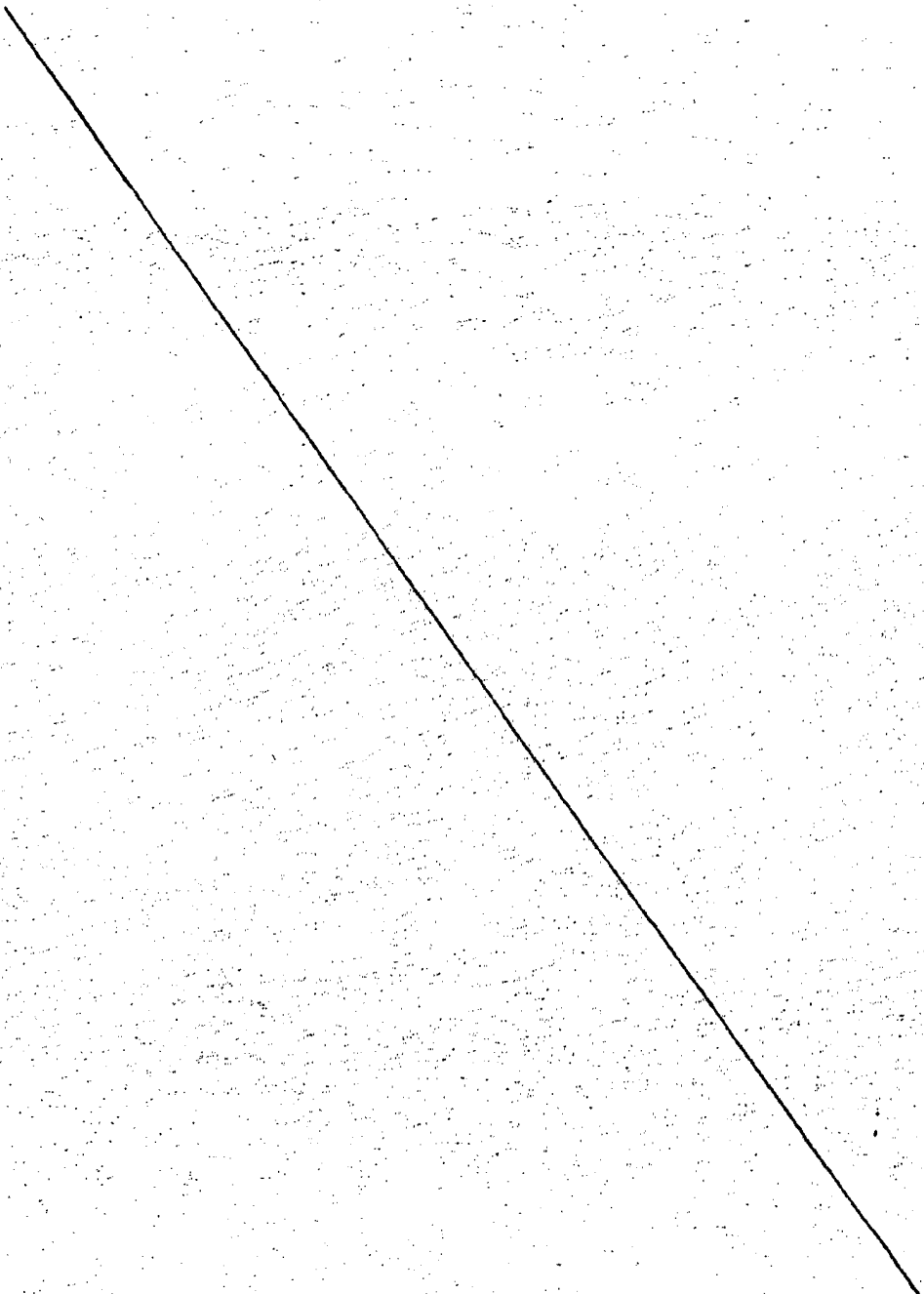


TABLA I

20 MAR

aración abreviada de S. flavopersicus, S. netropsis y S. cinnamoneus

<u>opersicus</u>	<u>S. netropsis</u>	<u>S. cinnamoneus</u>
cilada-Retinaculum	Biverticilada	Biverticilada
rizos abiertos, espiras s sueltas, sin verdaderas es o espiras apretadas, l media	Corta, rígida (Pat. U.S. No 2.586.762) Espiral (Pridham y otros, Appl.Microbiol. Vol 6, No. 1, Enero 1958): Espi- ral (2 de 10 colaboradores SAB ref.)	Sin espirales (Dvonch y otros Antibiotic and Chem., Vol. 4 No. 11, Nov. 1954). Corta, reo ta a tortuosa (microfotografía en Duggar y otros, Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 60, Arto. I).
icas, 0.4 u x 1.1 u	Cilíndricas, 0.65 u x 1.30 u	Esféricas 0.6 u
on amarillo claro, rosa	Cervato vinoso pálido	Tonalidades de rosa a espliego (SAB Ref.)
is claro (esporas diseminadas)	Aéreo blanco	Blanco a canela
la, concha, amarillo melocotón	Aéreo blanco, sin esporas	---
la, tinte concha a rosa y beis	Canela claro, canela rosáceo, carne a ante canela (SAB Ref.)	Rosa claro a rosa púrpura claro, a espliego (SAB Ref.)
me a albaricoque claro, rosa amarillo melón claro	Aéreo blanco	Aéreo blanco
la	Sin aéreo	aéreo gris claro a gris
o claro, amarillo pastel	Blanco rosa muy pálido, cre na (SAB Ref.); Oliva pálido ante (Pat. U.S. No.2.586.762)	Blanco (5 de 9 colaboradores SAB Ref.)
arillo dorado a oro viejo	Marrón	---
aza	Marrón oscuro	Amarillo verdoso claro a naran- ja amarillento mate
marrón dorado	Marrón oscuro, marrón inten- so, marrón negruzco (SAB Refl)	Marrón amarillento a marrón ca- cahueta (SAB Ref.)
	Ninguno (6 de 9 colaborado- res SAB Ref.)	Ninguno (9 de 9 colaboradores SAB Refl)
	Marrón	---
	Marrón	---



Carácter	<u>S. flavovirescens</u>	<u>S. netropsis</u>
Agar de pasta de tomate, harina de avena	Ninguno	Marrón, marrón oscuro
Tapon de patata	Decoloración canala mostaza	Marrón, medio a oscuro
5 Agar nutriente (de Waksman)	Ninguno	Marrón claro
Medio nitratado	Ninguno	Marrón
Gelatina	Pardo rojizo	Marrón
10 Leche tornasol	Sin coagulación, peptonizada, alcalina	Sin peptonización ni ción no cambiada (P. 2.586.762) - Coagulación neutra a ligera (SAB Ref.)
Gelatina-Simple	Licuada	Sin licuación (Pat.)
Gelatina-Nutriente	---	Licuada (SAB Ref.)
Almidón	Hidrolizada	Hidrolizado
Reducción nitrato	Positiva	Negativo
15 Hemolisis	Positiva	Positivo (SAB Ref.)
<u>Fuentes de carbono:</u>		
Utilizado	D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, lactosa, maltosa, salicina, inositol.	D-glucosa, D-fructosa, maltosa (SAB Ref.)
20 No utilizado	L-arabinosa, D-sorbitol, L-ranosa, D-sacarosa, D-rafinosa, D-manitol (Xilosa, lactosa, salicina, antes enumeradas fueron utilizadas lentamente).	D-xilosa, L-arabinosa, D-sacarosa, lactosa, D-sorbitol, D-manitol

5

10

15

20

25



20 MAY. 1961

<u>S. pombe</u>	<u>S. netropsis</u>	<u>S. cinnamomeus</u>
	Marrón, marrón oscuro (SAB. Ref.)	Ninguno (7 de 9 colaboradores SAB Ref.)
reacción canela mostaza	Marrón, medio a oscuro	Ninguno
	Marrón claro	---
	Marrón	---
rojizo	Marrón	Ninguno (SAB Ref.)
coagulación, peptonizada, a	Sin peptonización ni hidrólisis, reacción no cambiada (Pat. U.S. No. - 2.586.762) - Coagulación, peptonización neutra a ligeramente acida - (SAB Ref.)	Coagulada, peptonizada
	Sin licuación (Pat. U.S. No. 2.586.762)	---
	Licuado (SAB Ref.)	Licuado
hidrolizada	Hidrolizado	Hidrolizado
	Negativo	Negativo
	Positivo (SAB Ref.)	Positivo (SAB Ref.)
D-glucosa, D-fructosa, maltosa, salicina, i-	D-glucosa, D-fructosa, i-inositol, maltosa (SAB Ref.)	D-glucosa, D-fructosa, i-inositol, maltosa (SAB Ref. y Dronch y otros, supra).
sa, D-sorbitol, L-ramacárosa, D-rafinosa, (Xilosa, lactosa, sulfos enumeradas fueron lentamente).	D-xilosa, L-arabinosa, L-ramnosa, D-sacarosa, lactosa, rafinosa, D-sorbitol, D-manitol, salicina.	D-xilosa, L-arabinosa, L-ramnosa, sacarosa, lactosa, rafinosa, D-sorbitol, D-manitol, salicina.

26 75 3 8



Taxonomía del Streptomyces flavopersicus, Sp. Novo.

A excepción de la determinación de las características de cultivo y actividad proteolítica en gelatina, que se efectuó a 24°C., todas las características de cultivo en los medios standard seguidamente enumerados se obtuvieron mediante incubación a 28°C.

Las referencias clave sobre Colores están de acuerdo con el "Color Harmony Manual", tercera edición, Jacobsen, R.; Granville, W.C.; y Foss, C.E.; 1948; Container Corporation of America. Todas estas referencias constan de uno o más nombres de color seguido de paréntesis que incluyen una clave, como por ejemplo, amarillo dorado (2kb), correspondientes a una ficha de color plástico desprendible del manual usada para determinar el color de micelio inverso en el agar nutriente de Waksman después de una incubación de siete días.

A menos que se especifique pendiente de agar, cuña de patata o caldo, las características de cultivo se determinaron del cultivo sobre la superficie de 20,0 ml. de medios de agar en placas de Petri Standard de 100 mm. La superficie de agar se inoculó de tal manera que proporcionase una banda de cultivo confluyente de 1,0 cm. aproximadamente de anchura a un lado de la placa con colonias más o menos aisladas sobre el resto de la superficie de agar. Cuando se indican los diámetros de las colonias, tales colonias se hallaban bien aisladas o estaban ordinariamente separadas en más de 1,0 cm. de otras colonias.

Agar nutriente de Waksman.-

3 días - abundante desarrollo, blanco aéreo (a), micelio del substrato (reverso) amarillo pastel (1-1/2 hb), sin pigmento soluble. Las colonias aisladas son convexas, bordes enteros, moderadamente aéreas en la porción elevada central, diámetro 3,0 mm.

7 días - micelio aéreo en rayas de desarrollo confluyente, blanco ostra (b) a gris claro (c) substrato entre maíz (2hb) y amarillo dorado (2kb), sin pigmento soluble, desarrollo deprimido en la superficie del

26 75 38



agar. Algunas colonias se caracterizan por una fisura o derpensión diametral; de otro modo, la superficie de desarrollo es lisa.

5 15 días - micelio aéreo como en el día 7, substrato ahora oro mostaza, oro viejo (2ne), sin pigmento soluble, colonias aisladas caracterizadas por unos centros ligeramente elevados y abundante aéreo gris claro (c), sin esporas, rizado de superficies de colonias confinadas a una fisura diametral ocasional y a una rara fisura radial adicional.

10 21 días - micelio aéreo gris claro (c), esporulación virtualmente ausente, sustrato oro mostaza (2pg) a marrón mostaza (2pi). Se extiende un ligero desarrollo plumoso sobre la superficie de agar en uno o dos mm. desde los bordes de colonias aisladas de 5,5 a 7,0 mm. de diámetro.

Agar de glucosa.-

15 Características de desarrollo esencialmente paralelas a las del agar nutriente de Waksman. Micelio aéreo gris claro (c), micelio de substrato (reverso) entre oro mostaza, oro viejo (2ne), y oro mostaza (2pg), sin pigmento soluble, sin rizamiento de colonias (fisuras diametrales o radiales) a través de 21 días de incubación.

20 Agar de harina de avena de Carvajal.-

25 3 días - abundante desarrollo, micelio aéreo gris claro (c), substrato amarillo pálido (1ca), sin pigmento soluble. Colonias aisladas bajas convexas con porción central elevada. Aéreas de colonias aisladas limitadas principalmente a papilas centrales embotadas. Una zona discernible de aclaramiento parcial de opacidad del medio se muestra junto al desarrollo, por ejemplo 8,0 mm. de aclaramiento alrededor de una colonia de 3,0 mm.

30 7 días - Micelio aéreo abundantemente productor de esporulas, concha rosa perla (3ca), substrato crema (1-1/2 ca), sin pigmento soluble. El desarrollo secundario se extiende de manera plana sobre la

26 75 3 8



superficie de agar desde un borde denso de colonias primarias a un borde exterior dentado.

5 15 días - micelio aéreo densamente esporulado con un aspecto veloso, rosa perla, concha (3ca) a amarillo melón claro (3ea), substrato bambú, gamuza (2gc), sin pigmento difundible (o cambio de color del medio circundante). Colonias moderadamente aisladas se extienden en forma plana a un diámetro de 7,0 mm. desde una porción central convexa de 3,0 mm.

10 21 días - el micelio aéreo en masa es entre rosa perla, concha (3ca) y amarillo melón claro (3ea). Crestas elevadas de rosa carne, rosa perla, rosa concha (4ca) aparecen a través de rayas de desarrollo confluentes. Centro de micelio de substrato (reverso) de área de desarrollo confluyente color bambú, gamuza (2go), en el borde de las rayas y centro de colonias aisladas el substrato es canela mostaza claro (2ie) a canela mostaza (2lg). Colonias aisladas esparcidas en forma plana en 7,0 mm. de superficie lisa. No se ha desarrollado ningún pigmento soluble.

Solución de Czapek con dextrosa. Agar.-

20 3 días - desarrollo escaso, en forma de película, no aéreo, en rayas con pocas colonias aisladas del tamaño de puntas de alfiler.

7 días - micelio aéreo blanco (a) moderado a abundante en rayas de desarrollo confluyente y cubierto de colonias aisladas convexas de 2,0 mm., substrato crema (1-1/2ca), sin pigmento soluble.

25 15 días - aéreo blanco (a) a tinte rosado claro, substrato colorante bambú, paja, trigo (2fb), sin pigmento soluble. Colonias aisladas con centros pronunciadamente convexas de 3,0 mm. extendiéndose a bordes ligeramente dentados de 4,0 mm., superficies de desarrollo lisas.

30 21 días - micelio aéreo blanco ostra (b) a rosa claro, substrato amarillo claro, amarillo pastel, amarillo sol (1 - 1/2 ca), sin pigmento soluble, superficies de desarrollo no rizadas, colonias aisladas



26 7538

pronunciadamente convexas de 3,0 a 4,0 mm., aéreo completo, con brotes irregulares y ligeramente esparcidos desde los bordes de algunas colonias.

Agar asparagina-dextrosa.-

5 3 días - desarrollo moderado, blanco moderado (a) a gris claro (c) en el aéreo, substrato crema (1-1/2ca), sin pigmento soluble, colonias convexas aisladas de 1,0 mm. de diámetro.

10 7 días - buen desarrollo, abundante aéreo blanco (a) a gris claro (c), substrato crema (1-1/2ca) a amarillo claro, amarillo pastel, amarillo sol (1-1/2ea). Colonias aisladas marcadamente convexas, 3,5 mm., con brotes plumosos irregulares ligeros desde el borde.

15 15 días - aéreo con abundante esporulación rosa perla, concha (3ca), centro del substrato de rayas con desarrollo confluyente bambú, ante, paja, trigo (2fb), de colonias aisladas maiz (2hb) a amarillo dorado (2kb). Colonias marcadamente convexas de 3,0 mm. con desarrollo irregular extendido en forma plana sobre la superficie de agar hasta un diámetro de 7,0 mm. Sin pigmento soluble.

20 21 días - aéreo concha, rosa perla, (3ca) con penachos ocasionales de blanco ostra (b), centro del substrato de rayas de desarrollo confluyente bambú, ante, paja, trigo (2fb), substrato de centro de colonias aisladas mostaza, oro viejo (2le), sin pigmento soluble. Sobre la superficie del agar se extiende un brote plano arborescente desde la porción convexa de colonias aisladas seguido de 2,0 a 3,0 mm. de desarrollo subsuperficial plumosa claro. Las superficies de desarrollo no son rugosas.

25 Agar de glicerol-asparagina.-

30 El desarrollo de micelios es bueno en este medio pero la esporulación es dispersa a moderada incluso en el día 21. Las siguientes características en los días 15 y 21 de incubación se indican solamente para compararlas con las del agar de asparagina dextrosa.



26 7538

15 días - aéreo gris claro (c) con penachos diseminados de blanco ostra (b) en rayas de desarrollo confluyente, substrato amarillo claro, amarillo pastel, amarillo sol (1-1/2ea) a amarillo polvoriento (1-1/2gc), sin pigmento soluble.

5 21 días - aéreo blanco ostra (b) a gris claro (c) con ocasionales penachos de aéreo diseminado a moderadamente esporulador rosa muy claro, substrato de centro de rayas de desarrollo confluyente amarillo claro, amarillo pastel, amarillo sol (1-1/2ea), substrato de centro de colonias aisladas y borde de raya oro mostaza, oro viejo (2le), sin pigmento soluble.

10 La morfología de las colonias, como en el agar de dextrosa-asparagina.

Agar de malato cálcico.-

15 3 días - desarrollo moderado, aéreo diseminado a moderado en raya y centro de colonias aisladas planas de 0,5 mm., sin pigmento soluble, sin digestión visible (aclaramiento) de malato.

7 días - aéreo abundante blanco (a) en rayas y en pequeñas colonias convexas bajas, sin pigmento soluble, sin digestión visible.

20 15 días - micelio aéreo blanco (a) con ocasionales penachos de aéreo marrón muy claro en zonas menos pobladas, sin pigmento soluble, sin digestión.

21 días - igual que en el día 15.

Agar de extracto de levadura, dextrosa, NH_4NO_3 , almidón de maíz.-

25 3 días - abundante desarrollo, aéreo moderado en el centro de colonias aisladas convexas, zona de 7,0 mm. de hidrólisis del almidón alrededor de 3,0 mm. de colonias y 5,0 mm. desde el borde de rayas de desarrollo confluyente, sin pigmento soluble.

30 7 días - aéreo en borde de raya y en colonias aisladas densamente esporuladas rosa perla, concha (3ca), substrato crema (1-1/2ea) sin pigmento soluble, hidrólisis (aclaramiento) marcada.



26 7538

20

5 15 días - micelio aéreo y esporulación como en el día 7, substrato masilla (1-1/2ec). Colonias aisladas de 4,0 mm. marcadamente convexas con ligera depresión central y un adicional no-aéreo ligeramente plumoso que se extiende planamente sobre la superficie del agar desde la base de la colonia primaria.

10 21 días - pocos penachos de aéreo esporulado aparecen ahora en la porción central de la raya de desarrollo confluyente. Aéreo de borde de raya densamente esporulado y colonias aisladas entre rosa perla, concha (3ca) y amarillo melón claro (3ea), substrato (reverso) de estas zonas mostaza, oro viejo, (2le), substrato del centro de raya crema (1-1/2ca). Porción convexa de colonias aisladas de 4,0 mm. extendiéndose luego planamente por encima y debajo de la superficie hasta 9,0 mm. Hidrolisis casi completa sobre toda la placa. Sin pigmento soluble.

15 Agar de almidón soluble, sales inorgánicas.-

3 días - desarrollo moderado plano e incoloro, raros penachos de micelio aéreo en raya de desarrollo confluyente, sin pigmento soluble, sin hidrolisis visible.

20 7 días - abundante aéreo, buena esporulación, rosa perla claro, concha (3ca), substrato entre tinte amarillo (1ba) y pergamino (1cb), sin pigmento soluble, sin hidrolisis visible.

15 días - micelio aéreo esporulado entre rosa carne, rosa perla, rosa concha, rosa de té (4ca) y albaricoque claro (4ea), sin hidrolisis (aclaramiento) visible.

25 21 días - igual que el día 15.

Agar de sangre de triptosa.-

3 días - abundante desarrollo, sin aéreo, sin pigmento soluble (decoloración), hemolisis dudosa. Colonias aisladas convexas bajas, bordes enteros, superficie amortiguadamente lustrosa.

30 7 días - sin aéreo, hemolisis de 6,0 mm. desde el borde de raya



26 7538

de desarrollo confluyente, sin pigmento soluble apreciable, eritrocitos intactos marrones, colonias aisladas de 2,0 mm. con lustre apagado y pequeñas papilas centrales.

5 15 a 21 días - igual que el día 7, sin incremento en la zona de hemolisis.

Agar de extracto de malta, extracto de levadura.-

10 3 días - abundante desarrollo, abundante blanco (a) a blanco oscura (b) en el aéreo, substrato amarillo pastel claro (1-1/2fb) sin pigmento soluble. Colonias bien aisladas de 4,0 mm. convexas bajas con abundante aéreo excepto un estrecho margen no aéreo.

7 días - aéreo de raya de desarrollo confluyente con tinte rosa claro, substrato entre bambú, ante, paja, trigo (2fb) en el centro de la raya a maiz (2hb) en el borde, sin pigmento soluble. Colonias aisladas de 6,0 mm.

15 15 días - esporulación moderada, aéreo rosa perla, concha (3ca) en áreas de esporulación más intensas, aéreo de esporulación veloso, elevado sobre aéreo disminado o sin esporulación, substrato oro miel, oro claro (2ic), colonias aisladas de 7,0 mm. con aéreo completo y depresión central ligera de 2,0 mm., sin rugosidades.

20 21 días - aéreo entre rosa perla, concha (3ca) y bizcocho, beis claro, (3ec), substrato de centro de raya (2ec) y de menos pobladas colonias oro mostaza (2pg), sin pigmento soluble. Morfología de las colonias igual que el día 15.

Agar de harina de avena con pasta de tomate.-

25 3 días - abundante desarrollo y micelio aéreo blanco (a), numerosos penachos elevados de material veloso en raya de desarrollo confluyente, substrato amarillo pálido, sin pigmento soluble (sin cambio de color del medio). Colonias bien aisladas de 3,0 mm., bordes enteros, convexos, con aéreo en porción central elevada.

30 7 días - Abundante esporulación en el micelio, perla, tinte concha (3ba), substrato entre maiz (2hb) y amarillo dorado (2kb), sin pig-

267538



mento soluble. Aclaramiento en opacidad del medio visible, junto al desarrollo. Colonias bien aisladas marcadamente convexas de 5,0 mm. de diámetro, aéreo de esporulación plena.

5 15 días - aéreo entre rosa perla, concha (3ca) y bizcocho, beis claro (3ec), substrato ámbar, topacio (3pe) a marrón dorado (3pg), el micelio subsuperficial se extiende profundamente en el agar más allá del borde de desarrollo superficial. Colonias bien aisladas de 6,0 mm. convexas, suaves, de aéreo plenamente esporulador veloso.

10 21 días - aéreo esporulado veloso bizcocho, beis claro, (3ec), centro de substrato de raya ámbar, topacio (3pe), borde de substrato de raya y centro de colonias aisladas marrón dorado (3pg), sin pigmento soluble. Morfología de las colonias igual que en el día 15, extensión del desarrollo subsuperficial de 3,0 mm. más allá del borde de la raya y colonias aisladas de 6,0 mm.

15 Agar de peptona.-

3 días - buen desarrollo, sin aéreo, sin pigmento soluble; substrato (reverso) amarillo pálido (1ca). Colonias aisladas de 2,0 mm. de diámetro, convexas bajas, apagadamente lustrosas.

20 7 días - sin aéreo, sin pigmento soluble, substrato pergamino (1-1/2 db).

15 días - sin aéreo, sin pigmento soluble. Colonias aisladas de 2,5 mm. convexas, con periferia ligeramente plana.

21 días - sin aéreo, sin pigmento soluble, micelio superficial y del substrato (reverso) amarillo pálido (1ca).

25 Agar de glicerol, glicina.-

3 días - desarrollo incoloro, en forma de película, plano y pobre a regular, sin aéreo, sin pigmento soluble. Colonias aisladas de 0,5 a 1,0 mm.

30 7 días - buen desarrollo, aéreo pleno blanco (a) en raya de desarrollo confluyente, substrato amarillo pálido (1ca), sin pigmentos so-



26 753 8

lubles. Colonias bien aisladas de 2,5 mm. de diámetro, convexas bajas, bordes ligeramente plumosos, algunas colonias con poco o ningún aéreo.

15 días - aéreo blanco (a), substrato amarillo ligero, amarillo pastel, amarillo sol, (1-1/2ea), sin pigmento soluble.

5 21 días - aéreo blanco (a) a gris claro, sin esporas, substrato igual que el día 15, sin pigmento soluble. Superficie de raya de desarrollo confluyente ligeramente rugosa, coincidiendo con un aspecto de tablero de damas del micelio (reverso).

Pendientes de agar con reducción de nitrato.-

10 4 días - desarrollo pobre, desarrollo reesparcido sobre la superficie rizada.

12 días - desarrollo bueno, aéreo abundante blanco (a), prueba para nitrito negativa.

18 días - nitrito negativo.

15 25 días - ensayo para nitrito ligeramente positivo.

Tapón de gelatina.-

3 días - desarrollo moderado localizado principalmente en el fondo de una porción licuada de 4,0 mm. Pocas colonias no aéreas en la unión de la superficie con la pared del tubo, micelio marrón rojizo.

20 7 días - licuación de un cm., buen desarrollo subsuperficial, pigmento soluble marrón rojo oscuro en porción líquida por encima del desarrollo.

25 15 días - el pigmento soluble se extiende hasta 6,0 mm. por debajo de la superficie, abundante micelio por debajo de la capa de pigmento, el desarrollo superficial ha descendido al fondo del medio líquido.

21 días - pigmento soluble marrón rojo a 1,0 cm. por debajo de la superficie, 4,0 mm. adicionales ocupados por micelio, licuación marcada, resto del tapón verde parduzco.

30 Cuña de patata.-

3 días - abundante desarrollo no-aéreo amarillo claro, patata



decolorada canela claro.

26 75 38

7 días - sin aéreo, desarrollo amarillo pálido (1ca), patata en las proximidades del desarrollo entre tendón natural (2do) y gris cubierta (2fe).

5 15 días - gris claro (c) en el aéreo en la parte superior de la pendiente, esta porción de patata canela mostaza clara (2ie).

21 días - aéreo en la parte superior de la pendiente rosa perla, concha (3ca), colonias no aéreas en el extremo amarillas claras, reverso de patata canela mostaza (2lg).

10 28 días - aéreo rosa claro veloso, esporulación confirmada por examen microscópico.

Leche de tornasol.-

3 días - ligero desarrollo en la unión del tubo y la superficie líquida sin aéreo visible, sin cambio en la leche.

15 7 días - anillo amarillento de desarrollo extendido en 3,0 mm. por encima de la superficie sobre los lados del tubo, sin película, sin coagulación, ligera peptonización.

15 días - anillo de desarrollo de 6,0 mm., completa peptonización, pH 8,0.

20 En la Tabla 2 se muestra la asimilación de carbono de varios orígenes por el Streptomyces flavopersicus. La presencia o ausencia de esporulación, carácter de micelio inverso y presencia o ausencia de pigmento soluble se anotaron también en este medio básico variado mediante el substrato carbónico añadido. Las esporas fueron profusas en todos los casos de rápido desarrollo hacia el séptimo o decimoquinto día de incubación y aproximadamente hacia el día 21 en muchos casos de desarrollo moderado. Uniformemente, el color del micelio de esporulación concordaba en color con los medios precedentes, es decir, un color melocotón muy claro o amarillo-crema claro teñido de rosa. Anotado este color en el manual de colores usado como rosa perla, concha (3ca) o como una tonalidad más oscura en algunas masas de esporas envejecidas

25

30

26 75 3 8



como rosa carne (4ca) a albaricoque claro (ea). El micelio del substrato (reverso) era de las tonalidades más brillantes de amarillo variando en intensidad con el tiempo de incubación desde amarillo muy claro (amarillo pastel) a amarillo dorado. No se produjo ningún pigmento soluble.

5

TABLA 2

Utilización de Fuentes Carbónicas por el Streptomyces flavopersicus.

10

	<u>Fuentes</u>	<u>Utilización</u>	<u>Ritmo de desarrollo</u>	
10	Pentosas	Xilosa	+	lento
		Arabinosa	-	-
		Ramnosa	-	-
15	Exosa	Glucosa	+	rápido
		Galaotosa	+	moderado
		Manosa	+	rápido
	Cetosas	Fructosa	+	rápido
		Sorbosa	-	-
20	Di-sacáridos	Sacarosa	-	-
		Lactosa	+	lento
		Maltosa	+	rápido
		Celobiosa	+	moderado
	Tri-sacárido	Rafinosa	-	-
25	Poli-sacáridos	Almidón soluble	+	rápido
		Celulosa	-	-
	Glucósido	Salicina	+	lento

30

-sigue-

26 7538



	<u>Fuente</u>	<u>Utilización</u>	<u>Ritmo de desarrollo</u>	
5	Alcoholes	Glicerol	+	rápido
		Manitol	-	-
		Dulcitol	+	Moderado
		Inositol	+	moderado
		Sorbitol	-	-
10	Acidos	Citrato sódico	+	rápido
		Lactato sódico	+	lento
		Succinato sódico	+	moderado
		Acetato sódico	+	moderado
		Tartrato sódico-potásico	-	-
	Control	Sin fuente carbónica	-	-

Morfología del micelio esporulador. Microscopía ligera.-

15

La morfología de las cadenas de esporas y de las esporas era consistente en todos los medios en los que se produjeron esporas, tanto orgánico como sintético. La siguiente descripción deriva de la observación y microfotografías del desarrollo del medio básico de Pridham y Gottlieb con dulcitol como substrato carbónico.

20

La estructura ramificada del micelio esporulador es biverticilada, produciéndose cadenas de esporas en verticilos empenchados en los extremos de ramas primarias cortas que a su vez surgen como verticilos de un lugar común alrededor del filamento micelial aéreo. Estas ramas primarias son generalmente dos, tres o cuatro. No se observaron ramas aisladas conteniendo penachos de esporas y a menudo se sospechó la existencia de más de cuatro. Las cadenas de esporas en los penachos son numerosas, no habiéndose observado menos de cuatro cadenas por penacho. Las cadenas de esporas individuales de longitud media se encuentran en ganchos o cañas, rizos abiertos y espirales sueltas. No se ob-

25

30

26 75 3 8



servaron espirales apretadas ni auténticas formaciones en espiral a modo de tirabuzón. Las esporas son cilíndricas con extremos embotados de sección cuadrada, raramente elipsoicales y nunca esféricas. Típicamente, las esporas aparecían en una longitud doble o triple a su espesor, con lados rectos. Las dimensiones efectivas se determinaron mediante microscopía electrónica a 8500, 14.600 y 28.000 diámetros.

Microscopía electrónica.-

La microscopía electrónica confirmó las características antes anotadas, es decir, morfología biverticilada de micelio aéreo esporulador, existencia de cadenas de esporas en rizos abiertos y espirales sueltas y la morfología cilíndrica y de lados rectos de las esporas. Se realizaron microfotografías electrónicas y estudio visual del desarrollo sobre sales inorgánicas, agar de almidón soluble y de un duplicado de la placa usada para registrar los anteriores estudios microscópicos ligeros.

Mediante placas metálicas y otros preparados usados para las microfotografías electrónicas se determinaron los siguientes detalles adicionales. Las esporas son de tipo liso. Aunque aparecen ligeras irregularidades superficiales en placas sombreadas de esporas a 28000 diámetros, la superficie de las esporas se halla exenta de espinas, crestas o espirales. El tamaño medio de las esporas es de 0,4 por 1,1 micras, su anchura oscila entre 0,3 y 0,5 micras y su longitud entre 0,9 y 1,3 micras.

Los filamentos principales del micelio aéreo son de un espesor de 0,3 a 0,4 micras, ensanchándose a 0,5 micras en el lugar inmediatamente adyacente al punto de ramificación verticilada. Las ramas de los verticilos se aproximan al tamaño del micelio principal, siendo las bases más espesas que el filamento distal.

La presente invención, como anteriormente se ha indicado, abarca un proceso para el desarrollo del Streptomyces flavopersicus bajo con-

26 7538



5 condiciones controladas que incluyen una temperatura de 24 a 32°C, fermentación sumergida con agitación adecuada y aireación usando un medio consistente en una fuente carbónica tal como glucosa, glicerol, aceites vegetales trans-esterificados o combinación de los mismos; una

10 fuente de nitrógeno orgánico tal como harina de soja; una fuente de sustancias y minerales de desarrollo tales como solubles de destilados; sales minerales tales como cloruro sódico, un agente amortiguador insoluble para impedir la acumulación de ácido tal como carbonato cálcico, y un agente desespumador atóxico tal como aceites vegetales trans-esterificados o aceite de soja más anti-espuma de metilpolisiloxano.

15 Cuando el desarrollo del organismo ha producido una cantidad satisfactoria de sustancia antibiótica indicada mediante ensayo con el método de la zona de inhibición del Escherichia coli, se filtra el cultivo y se recupera el agente antimicrobiano del filtrado. La porción principal del material activo se encuentra en el líquido y relativamente poco en el micelio de la pasta del filtro. El proceso que implica el uso de una resina de cambio iónico eliminará la actividad del filtrado. La sustancia antimicrobiana se obtiene fácilmente como sulfato cristalino o sal hidrocioruro. Los procedimientos empleados se hallan

20 más ampliamente descritos e ilustrados en los ejemplos. Una sustancia específica así obtenida posee propiedades únicas y valiosas. Presenta características que le distinguen de las sustancias antimicrobianas conocidas y previamente descritas.

25 Puede obtenerse un inculador adecuado para uso en matraces agitados mediante el uso del desarrollo de pendientes de agar de tripton. Este medio puede usarse también para mantener mediante transferencia de pendiente a pendiente, adecuados cultivos viables que producen la sustancia antimicrobiana. Sin embargo, en la práctica general, ha demostrado ser un procedimiento más seguro el mantenimiento del

30 Streptomyces flavopersicus en tierra o bajo liofilización. El desarrollo sobre pendientes de agar se emplea para inocular matraces agita-

267538



dos que a su vez pueden usarse para inocular fermentadores del tamaño utilizado a efectos de investigación.

Otro procedimiento consiste en usar los matraces agitados para inocular adecuados recipientes metálicos que contengan un medio apropiado que se utiliza para inocular fermentadores de escala piloto o los depósitos de semillas para el equipo mayor. En general, la producción del agente antimicrobiano en fermentadores que oscilan entre 23 y 2000 litros de tamaño alcanzan su máximo en 5 días. No hay ninguna ventaja en prolongar la fermentación durante mas de 5 días. A los efectos de producir inoculador, se obtiene un buen desarrollo del cultivo en 24 horas. Las condiciones aeróbicas se mantienen en los fermentadores forzando aire estéril a través de un dispositivo dispersador situado en el fondo del fermentador. El volumen de aire forzado en el medio de cultivo varía bastante con el tamaño y forma del recipiente de fermentación. Un grado de aireación de 4/5 volumen por un volumen de aire por volumen de cultivo por minuto es satisfactorio. La espumación del medio de cultivo durante la fermentación puede controlarse con aceites vegetales atóxicos, tales como aceites vegetales trans-esterificados, que también sirven de fuente carbónica, o un anti-espuma de metilpolisilixano disuelto en un aceite vegetal tal como aceite de soja. A través del período de fermentación, el medio de cultivo es vigorosamente agitado por medios mecánicos. Sin embargo, en una fase de la preparación del inoculador en la que la producción de la sustancia antimicrobiana en el propio inoculador no es de importancia principal, se efectúa una suficiente agitación para un satisfactorio desarrollo introduciendo burbujas de aire a través del líquido. En contraste, cuando la producción de la sustancia antimicrobiana es importante, la agitación se efectúa mediante dispositivos removedores que forman parte de las unidades de fermentación. El grado de agitación depende del diseño de los recipientes de fermentación de tamaños variables, puesto que como

26 75 3 8



es bien sabido los depósitos de fermentación pilotos de tamaños comerciales se destinan para uso general más bien que para un proceso específico de fermentación. El organismos Streptomyces flavopersicus puede producir el deseado agente antimicrobiano en cantidades satisfactorias en una variedad limitada de medios de cultivo, en una gama de temperaturas de 24 a 32°C por lo menos, no siendo necesario, evidentemente, mantener una aireación exacta o una intensidad precisa de agitación mecánica.

Los siguientes ejemplos ilustran la formación, recuperación, concentración, purificación e identificación del agente antimicrobiano M-141 y sus sales de adición ácida. Estos ejemplos son de naturaleza meramente ilustrativa, no debiendo considerarse como limitativos.

EJEMPLO I

Producción en fermentadores de 23 litros con un medio de harina de soja-glucosa-cloruro sódico.-

En un matraz de Erlenmeyer de 500 ml. se añaden 150 ml. de un medio seminal conteniendo los siguientes ingredientes en las concentraciones indicadas:

	<u>Gramos por litro</u>
Monohidrato de glucosa	15
Harina fibrosa de soja (harina de soja desgrasada y finamente molida)	15
Cloruro sódico	5
Carbonato cálcico	1

El matraz y su contenido se esterilizan mediante autoclave durante un periodo de 25 a 30 minutos a una temperatura de 121°C. Después de enfriarse se inocular el matraz con una sección de la superficie de una pendiente de agar de triptona sobre la que se ha desarrollado Streptomyces flavopersicus durante 6 días por lo menos. Se agita el matraz inoculado a 28°C en un agitador giratorio dotado de una carrera de 2-1/4 pulgadas y que funciona aproximadamente a una velocidad de 230

267538



rpm durante un periodo de 48 horas. Se prepara un segundo paso del cultivo de semilla usando el anterior cultivo para inocular adicionales matraces preparados y esterilizados como queda indicado. Cada matraz es inoculado con 3 ml. aproximadamente del cultivo de 48 horas. Los matraces con semillas son incubados y agitados como se acaba de describir durante 48 horas.

En un depósito de fermentación de una capacidad de 23 litros se disponen 12 litros de un medio de fermentación de la siguiente composición:

10

Gramos por litro

Monohidrato de glucosa	25
Harina de soja	20
Carbonato cálcico	1
Cloruro sódico	5
Aceite de soja	5
Antiespuma de metilpolisiloxano	1

15

El fermentador y su contenido son esterilizados mediante autoclave durante 75 minutos a 121°C. Después de enfriarse, se inocula asépticamente el fermentador con el contenido de 3 de los matraces antes descritos del segundo paso del cultivo de semillas. Se desarrolla el cultivo en el fermentador a 28°C durante 5 días, en cuyo tiempo se agita el caldo mecánicamente y se pasa aire estéril al fondo del depósito a razón de 0,8 volumen aproximadamente de aire por volumen de caldo por minuto. La máxima actividad biológica se alcanza después de unos 5 días. La presencia del agente antimicrobiano en el medio fermentado está indicada por una zona de inhibición de 17 mm. que rodea a un disco de papel de 13 mm. de diámetro saturado con el líquido de cultivo clarificado y colocado sobre agar sembrado de Escherichia coli. Bajo las mismas condiciones, se produce una zona de inhibición de desarrollo de 18 mm. mediante una solución de cloroanfenicol de una concentración de 0,08 mg. por ml.

20

25

30

26 7538



EJEMPLO 2

Producción en fermentadores de 23 litros con un medio de harina de soja-glucosa-solubles de destiladores-glicerol.

En un depósito de fermentación de 23 litros de capacidad se disponen 12 litros de un medio de fermentación de la siguiente composición:

	<u>Gramos por litro</u>
Monihidrato de glucosa	15
Harina de soja	15
Cloruro sódico	5
Solubles de destiladores de melazas secadas	5
Glicerol	2,5
Carbonato cálcico	1
Aceite de soja	5
Antiespuma de metilpolisiloxano	1

El fermentador y su contenido se esterilizan a 121°C durante 90 minutos. Después de enfriarse, se inocula asepticamente el fermentador con el contenido de 3 matraces de semillas preparados como en el Ejemplo 1. Se agita el cultivo y se airea a 28°C durante 5 días como en el citado ejemplo. La presencia de la sustancia antimicrobiana en el líquido de fermentación queda demostrada por una zona de inhibición que rodea a un disco de papel sobre agar sembrado con Escherichia coli. El diámetro de la zona de inhibición alrededor de un disco de 13 mm. de diámetro es de 17 a 18 mm. bajo condiciones tales que una solución de cloroanfenicol de una concentración de 0,08 mg/ml. proporcione una zona de inhibición de 18 mm.

EJEMPLO 3

Producción en fermentadores de 200 litros con un medio de harina de soja-glucosa.-

Se desarrolla el organismo, Streptomyces flavopersicus, sobre pendientes de agar de triptona durante 6 días a 28°C. Se suspende el desarrollo de una pendiente de agar en algunos mililitros de agua estéril y se inoculan dos matraces de Erlenmeyer de 500 ml., conteniendo cada uno 150 ml. del siguiente medio seminal:



26 75 3 8

Gramos por litro

Monohidrato de glucosa	15
Harina fibrosa de soja (harina de soja desgrasada finamente molida)	15
Cloruro sódico	5
Carbonato cálcico	1

5

Se esterilizan los matraces con un contenido de 150 ml. de este medio mediante autoclave mediante un período de 25 a 30 minutos a 120°C.

Después de enfriarse, se inoculan los matraces con el desarrollo del cultivo de agar como se acaba de describir. Los matraces inoculados son agitados a 28°C durante 48 horas en un agitador giratorio provisto de una excéntrica de 2-1/4 pulgadas y que funciona aproximadamente a 230 rpm.

10

La totalidad del contenido de estos matraces se emplea para inocular 10 litros del siguiente medio contenido en una botella metálica aireada de una capacidad aproximada de 12 litros.

Gramos por litro

15

Monohidrato de glucosa	15
Harina fibrosa de soja	15
Cloruro sódico	5
Carbonato cálcico	1
Aceites vegetales trans-esterificados	5

El recipiente metálico y su contenido fueron previamente esterilizados durante 80 minutos a 120°C y enfriados a 28°C.

20

Se incuba la botella aireada a 28°C durante 48 horas. Se introducen burbujas de aire a través del medio de cultivo desde un tubo situado en el fondo a razón de 10 litros aproximadamente por minuto. Luego se usa la totalidad del contenido de la botella para inocular un fermentador de 200 litros de capacidad que contiene 125 litros del siguiente medio, que había sido previamente esterilizado a 124°C durante 45 minutos y enfriado a 28°C.

25

Gramos por litro

Monohidrato de glucosa	25
Harina de soja	20
Carbonato cálcico	1
Aceite de soja	5
Anti-espuma de metilpolisiloxano	1

30

El medio inoculado en el fermentador se mantiene bajo vigorosa



26 7538

agitación a una temperatura de 28°C durante 5 días mientras se airea a razón de un volumen por volumen de medio por minuto. El ensayo sobre el sobrenadante del caldo después de la centrifugación es de 400 unidades por ml.

5

EJEMPLO 4

Producción en fermentadores de 2000 litros con un medio de soja-glucosa.

El inoculador para el fermentador de semillas se prepara por el procedimiento de botella aireada que se describe en el ejemplo 3. Se emplea el contenido total de una de las botellas metálicas de cultivo para inocular un fermentador de semillas de 200 litros de capacidad que contiene 125 litros del siguiente medio, que se esteriliza a 124°C durante 45 minutos y se enfría a 28°C:

10

Gramos por litro

Monohidrato de glucosa	25
Harina de soja	20
Carbonato cálcico	1
Aceites vegetales trans-esterificados	30

15

Se mantiene el fermentador de semillas a 28°C durante 24 horas con vigorosa agitación mecánica y aireación a razón de un volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto. Al cabo de este periodo de 24 horas se emplea todo el contenido del fermentador para inocular 1250 litros del mismo medio en un fermentador de una capacidad de 2000 litros. Se mantiene el medio inoculado bajo vigorosa agitación mecánica a una temperatura de 28°C durante 5 días. Se introduce aire estéril para aireación del medio de cultivo a razón de un volumen por volumen de medio por minuto. El ensayo sobre el sobrenadante del caldo después de la centrifugación es de 1000 unidades por mililitro.

20

25

EJEMPLO 5

Recuperación de agente antimicrobiano M-141 hidrocloreuro de cerveza de un fermentador de 23 litros.-

Se filtran con succión unos 7 litros de cerveza producida como en el Ejemplo 1, empleando la ayuda de un filtro para producir 5,6 litros de filtrado. La cerveza filtrada es pasada sobre 500 ml. de una

30



267538

resina de cambio iónico de bajo enlace en cruz (es decir, una resina blanda y porosa) que tiene grupos ácidos carboxílicos como grupos activos. La resina se contiene en una columna de vidrio de unos 3 cm. de diámetro y se usa en la forma sódica. Después de haber pasado la cerveza a través de la columna, se lava ésta con agua y se desarrolla con 0,25 N ClH. Se recogen fracciones y se ensaya su actividad antibacteriana. Se combinan las fracciones activas de la columna, se ajustan a un pH 4 y se evaporan hasta formar un residuo. Se extracta este residuo con metanol, se trata la solución metanólica con ácido sulfúrico para precipitar la mayor parte del calcio como sulfato y se ajusta luego a un pH 6 aproximadamente con hidróxido sódico y se filtra. El filtrado es evaporado hasta su secamiento y se disuelve el residuo en 5 ml. de agua y se filtra. Al añadirse 15 ml. de acetona a la solución, el hidrocloreuro de M-141 es cristalizado en una producción de 900 mg.

EJEMPLO 6

Recuperación de agente antimicrobiano M-141 hidrocloreuro de cerveza en un fermentador de 23 litros.-

Se filtran mediante succión aproximadamente 14 litros de cerveza producida en dos fermentadores como se describe en el Ejemplo 2, utilizando la ayuda de un filtro para producir 12 litros de cerveza filtrada. Se pasa ésta a través de una columna que contiene aproximadamente 500 ml. de una resina de cambio iónico del tipo de ácido carboxílico en su forma sódica. Una vez lavada la columna con agua se efectúa la elución del producto antimicrobiano con ácido clorhídrico semi-normal. La solución del producto de esta elución es neutralizada con hidróxido sódico y evaporada hasta su sequedad, produciendo un residuo que contiene cloruro sódico y cálcico y la sal de adición de ácido clorhídrico de la sustancia deseada. Se extracta el residuo varias veces con pequeñas porciones de metanol, que deja la mayor parte del cloruro sódico. Los extractos metanólicos, en un volumen total

26 75 3 8



aproximado de 100 ml., son combinados y tratados con sulfato sódico para precipitar la mayor parte del calcio como sulfato cálcico. Se separa el precipitado por filtración y se evapora el filtrado hasta su sequedad, quedando aproximadamente 1,4 gramos de la sal hidrociorura cruda de la base M-141.

Aproximadamente 350 mg. del hidrocioruro M-141 crudo preparado como queda descrito se disuelven en 5 ml. de agua, se agitan con 2 mg. de carbono activado para separar impurazas coloreadas, se filtra y se diluye con 4 volúmenes de acetona. Después de unos minutos, el hidrocioruro de M-141 empieza a cristalizar en largas agujas blancas. Se mantiene la solución durante la noche a 5°C para completar la cristalización. Se separa el producto del sobrenadante por filtración y se seca a la temperatura ambiente para producir 260 mg. de cristales.

EJEMPLO 7

Recuperación de agente antimicrobiano de hidrocioruro de M-141 usando una resina de cambio ácido sulfónico.-

Se pasan 16 litros de cerveza filtrada producida en tres fermentadores como en el Ejemplo 2 sobre 450 ml. de una resina de cambio catiónico del tipo de ácido sulfónico en una columna de vidrio de 5 cm. de diámetro. Se lava la columna con agua y se efectúa la elución de la sustancia antimicrobiana con 2,7 litros de cloruro sódico acuoso al 5 %. El producto de la elución es evaporado hasta su sequedad y el residuo extractado con 100 ml. de metanol. A la solución metanólica se añade lentamente una solución de ácido sulfúrico al 20 % hasta que no se forma más precipitado. Se neutraliza el sobrenadante con hidróxido sódico causando la precipitación de sulfato sódico, que se separa por filtración. Se evapora el filtrado hasta su sequedad y se disuelve en 15 ml. de agua. Al reposar durante la noche a la temperatura ambiente, la sustancia antimicrobiana cristaliza. Los cristales son lavados con una solución 2:1 de acetona-agua y secados al aire a la temperatura ambiente para producir 120 ml. de la sal hidrocioruro de M-141.

26 753



EJEMPLO 8

Recuperación de agente antimicrobiano M-141 hidrocioruro de cerveza en un fermentador de 200 litros.-

Se filtra el líquido de cultivo de 2 depósitos de cerveza producida como en el Ejemplo 3, para obtener 140 litros de cerveza filtrada.

5 Se colocan 8 litros de la forma sódica de una resina de cambio iónico del tipo de ácido carboxílico de enlace en cruz bajo en una columna de vidrio de 10 cm. de diámetro y se pasa la cerveza filtrada sobre la resina a razón de 600 ml. por minuto. La resina retiene virtualmente toda la actividad antibacteriana de la cerveza. Se lava la resina con agua y se recupera la sustancia activa pasando ácido clorhídrico 0,5 normal sobre la resina a razón de 350 ml. por minuto hasta que se ha recogido un total de 40 litros en fracciones de 1 litro. Se ensaya la actividad antibacteriana de las fracciones mediante el tipo de pruebas normales de placa y las fracciones activas son combinadas, 10 ajustadas a un pH de 6,5, concentradas mediante evaporación a 900 ml., diluidas con 3 litros de acetona y mantenidas a 5°C durante 6 horas. El precipitado que se forma es recogido, disuelto en 500 ml. de agua, agitado con 2,5 gramos de carbono activado, filtrado y diluido con 4 volúmenes de acetona. Tras reposar durante varias horas a la temperatura ambiente y durante la noche a 5°C, precipita un hidrocioruro cristalino de la solución acetónica. El producto hidrocioruro es recogido por filtración, lavado con acetona al 80 % y secado al aire a la temperatura ambiente. Peso = 20 gramos.

EJEMPLO 9

Recuperación de agente antimicrobiano M-141 hidrocioruro de fermentaciones de 1250 litros.-

25 Se agrupan los cultivos completos de 3 fermentadores de 2000 litros producidos como en el Ejemplo 4. Esta agrupación de 3000 litros aproximadamente ensaya 700 unidades por ml. Se prepara una solución de oxalato amónico disolviendo 3840 gramos de ácido oxálico en 45 litros de agua. Se ajusta el pH de esta solución a 6,0 con hidróxido amónico 30



26 7538

concentrado. La solución de oxalato amónico y 300 libras de una ayuda filtrante se añaden a la totalidad del cultivo. Después de agitar la mezcla durante 30 minutos, se filtra aquella y se lava la masa con 150 litros adicionales de agua y se seca.

5

El filtrado, que mide aproximadamente 2700 litros, es pasado sobre 280 litros de una resina de cambio iónico del tipo de ácido carboxílico en la forma sódica. Se pasa el filtrado a través de la resina a razón de unos 20 litros por minuto. Las muestras del efluente que se toman cada 10 a 15 minutos indican que menos de un 1 % de la actividad no es absorbida. Se vuelve a lavar luego la resina con agua desionizada hasta que el efluente es claro e incoloro. Se efectúa la elución de la resina con 450 litros de ácido clorhídrico 0,179 normal, seguido de 780 litros de ácido clorhídrico 0,5 normal. Los productos de las eluciones son recogidos en fracciones en la forma siguiente:

10

Productos de elución no.	Volumen (litros)	Ensayo (unidades m/l.)
1	380	0
2	140	0
3	180	0
4	190	637
5	210	3800
6	190	4450

15

Se ajustan los pH de los productos de las eluciones 4,5 y 6 a los valores de 5,0 a 6,5 con una solución de hidróxido sódico al 25 %. Se combinan los productos de las eluciones como sigue y se concentran aproximadamente a 35°C bajo reducida presión:

20

Producto de elución no.	Volumen (litros)	Ensayo (unidades m/l.)
1-2	15,5	818
3	10	1550
4,5,6	43	37625

25

Se determina el total de sólidos en cada uno de los productos de elución combinados y se determina también la potencia.

30

Productos de elución Concentrados	Ensayo (unidades m/g)
1-2	4,8
3	8,2
4,5,6	94



26 75 38

Al concentrarse estos productos de elución, precipita el material activo. Los precipitados de los productos de elución concentrados son recogidos sobre un filtro con el auxilio de una ayuda filtrante. La masa del filtrado que contiene la porción principal de la actividad es extractada 3 veces con porciones de 7,6 litros de metanol. El extracto metanólico es concentrado bajo reducida presión a 13 litros y enfriado durante 18 horas. Se separan los sólidos y se concentra el filtrado a 5 litros. Se añaden al concentrado 6 litros de agua y se reduce el volumen total del concentrado a 6 litros mediante destilación al vacío. Se enfría el concentrado durante la noche y se forman cristales. Se recogen éstos por filtración, se lavan con acetona y se secan en un horno al vacío a 50°C. Se obtiene una producción de 156 gramos de cristales que muestran un ensayo de 1070 unidades por ml.

Se concentran más aún los licores madres a 4 litros y se enfrían. Se obtiene una segunda producción de cristales con un peso de 752 gramos que muestran un ensayo de 1033 unidades por ml.

Se combinan y disuelven los dos materiales cristalinos en 4 litros de metanol. Se añaden 10 gramos de carbón vegetal activado para decolorar el producto. Se filtra la solución para separar el carbono y se concentra el filtrado al vacío. Durante la concentración se añaden 3600 ml. de agua al tiempo que se está separando el metanol por destilación. El material activo cristaliza de la solución acuosa al refrigerarse esta solución durante la noche. Se recogen los cristales por filtración, se lavan con acetona y se secan en un horno al vacío a 50°C.

Se vuelven a tratar los licores madres de esta cristalización con 40 gramos de carbón vegetal activado y se concentra el filtrado a 1500 ml. Se recoge una segunda producción de cristales y se elaboran de igual manera. Se obtiene una producción total de 678 gramos de agente antimicrobiano M-141 cristalino hidrocloreuro, que muestra un ensayo de 1200 unidades por ml.

26 75 3 8



EJEMPLO 10

Preparación de sulfato de M-141.-

5 Se añade una solución de 100 ml. de hidrocloreto de M-141 en 2 ml. de agua a una solución de 62 ml. de sulfato de plata en 7 ml. de agua. El cloruro de plata precipitado es separado y el sobrenadante ensayado para determinar su contenido de cloruro. Después de verificar la ausencia de iones cloruro, se trata el sobrenadante con gas de sulfuro de hidrógeno para precipitar cualquier exceso de plata. Se pasa una corriente de aire a través de la solución hasta que ha sido completamente expulsado el sulfuro de hidrógeno. Se evapora la solución hasta su sequedad y se disuelve el residuo en 0,8 ml. de agua. Tras la adición de 1 ml. de metanol y 2 ml. de acetona a la solución, el sulfato de M-141 cristaliza en pocos minutos. Después de recrystalizar de metanol acuoso al 50 %, la producción es de 50 ml. de sulfato de M-141, cuyo análisis es el siguiente: C = 33,37 %; H = 6,88 %; N = 5,67 %; S = 6,35 %; O = 47,04 %. Calculado para el $C_{14}H_{26}N_2O_7 \cdot H_2SO_4 \cdot 3.5H_2O$: C = 33,93 %; H = 7,12 %; N = 5,65 %; S = 6,47 %; O = 46,82 %. El sulfato se descompone por encima de 190°C y cristaliza en placas rectangulares delgadas y planas. En luz polarizada cruzada, los cristales exhiben elevada birrefringencia con algunos colores de interferencia y muestran una aguda extinción paralela al eje más largo.

10
15
20
25
30 El diseño de difracción por rayos X del sulfato de M-141 cristalino se obtuvo sobre película fotográfica usando radiación de $CuK\alpha$ filtrada con níquel ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) con una cámara de polvo de la General Electric normal de 7,16 cm. de radio que permitía la detección de espaciados d de hasta 20 \AA . Las intensidades relativas de las líneas de difracción se observaron visualmente. Los espaciados d e intensidades se muestran en la siguiente tabla:



26 75 3 8

Diseño de difracción por rayos X del sulfato de M-141

Espaciado-d en Angstroms	Intensidad relativa calculada.	Espaciado-d en Angstroms	Intensidad relativa calculada.
14,8	2	2,72	2
8,3	4	2,55	2
7,3	8	2,48	3
6,5	10	2,42	2
6,0	7	2,35	4
5,6	8	2,28	2
5,2	3	2,23	1
4,9	2	2,18	1
4,68	3	2,15	1
4,41	5	2,11	2
4,21	7	2,04	3
4,02	1	2,01	2
3,90	4	1,94	1 amplio
3,75	3	1,89	1
3,61	2	1,81	1
3,50	2 amplio	1,78	2
3,33	1	1,72	2 amplio
3,22	4	1,64	1
3,13	1	1,62	1
3,02	9	1,57	1
2,94	2	1,50	1
2,84	4	1,42	1 amplio

5

10

15

20

25

30

El ensayo del agente antimicrobiano M-141 se efectúa mediante una modificación de la técnica de Loo y otros publicada en el "Journal of Bacteriology"; volumen 50, páginas 701-709 (1945).

Se prepara una solución del hidrocloreuro de M-141 cristalino a 10,0 mg/ml., y se almacena congelada o a 4°C para uso diario. El valor asignado al hidrocloreuro cristalino a efectos de ensayo es de 1000 microgramos de actividad por miligramos.

El medio de ensayo usado es el Ensayo Antibiótico Difco No. 5 con un 0,1 % por peso por volumen de glucosa añadido después de esterilizar. El medio de agar estéril es sembrado con un volumen conveniente de un cultivo en caldo de Escherichia coli ATCC 26 y se vierte en platos de Petri de fondo plano de 100 mm. corrientes con 7,0 ml. de agar sembrado por plato. Se desarrolla el inculador de Escherichia coli sobre un agitador giratorio entriptona, extracto de carne de buey 0,1 % p/v de caldo de glucosa.

Se diluye la solución de material hidrocloreuro cristalino en un amortiguador de fosfato potásico al 5 % de pH de 8,5 a 400, 200,



267538

100, 50 y 25 mcg/ml. Se prepara el amortiguador combinando un 5 % p/v de soluciones acuosas de PO_4HK_2 y KH_2PO_4 . La sensibilidad del ensayo está comprendida entre 12,5 y 25 mcg/ml.

5 Los materiales cuya potencia ha de ensayarse son diluidos en convenientes diluciones teóricas en el mismo amortiguador usado para el standard. Se incuban placas durante la noche a 32°C y se calculan potencias de soluciones desconocidas mediante métodos standard.

10 La respuesta de dosis mostrada por el agente antimicrobiano M-141 es una línea ligeramente curvada cuando se traza sobre papel semi-logarítmico con los diámetros de las zonas como ordenadas contra el logaritmo de la concentración como abcisa.

15 En gran parte del trabajo inicial con agente antimicrobiano M-141 la zona de inhibición contra Escherichia coli era el único ensayo disponible. El punto de referencia bajo estas condiciones era una zona de inhibición producida por una cantidad conocida de cloroanfenicol ensayado bajo las mismas condiciones. Los ensayos se indicaron simplemente como diámetros de zonas.

20 Como anteriormente se ha indicado, esta invención se relaciona con un nuevo agente antimicrobiano que se obtiene en forma de sus sales de adición ácida. La base libre hipotética, que no ha sido aislada, tiene la fórmula empírica $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$. El agente antimicrobiano se produce desarrollando el organismo Streptomyces flavopersicus sp. nov. en un proceso de fermentación sumergida sobre un medio nutriente que contenga fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas hasta que se halle presente en el medio una cantidad sustancial del producto antimicrobiano y recuperando la sustancia en forma de una de sus sales de adición ácida mediante técnicas de cambio iónico que aprovechan su basicidad.

30 La sal hidrocloreuro del agente antimicrobiano M-141 cristaliza de solución acuosa en cristales incoloros, transparentes, largos, es-

26 75 38



trechos y de puntas afiladas. En luz polarizada cruzada los cristales muestran muchos colores de interferencia, elevada birrefringencia y aguda extinción paralela.

En solución acuosa, el hidrocioruro es dextrogirotorio $\alpha_D^{25} = 25$.

5 No hay absorción característica de luz ultravioleta. La titración de una solución acuosa del hidrocioruro con solución de hidróxido sódico revela la presencia de dos grupos titulables con valores pKa de aproximadamente 7,0 y 9,0, que se convierten en 5,0 y 7,5 en solución de formaldehído al 4 %. El peso molecular derivado de los datos de titulación es de 490 aproximadamente. La sal hidrocioruro que funde a 10 210°C es muy soluble en agua, bastante soluble en metanol e insoluble en otros disolventes orgánicos comunes tales como acetona, cloroformo y éter.

Después de su recristalización de agua, el hidrocioruro de M-141 15 analiza como sigue: C = 34,03 % ; H = 7,46 % ; O = 38,83 % ; N = 5,56 % ; Cl = 14,19 % ; pérdida al secarse = 19,1 % ; C-metilo = 4,76 % ; O-metilo = 0 % ; Calculado para el $C_{14}H_{38}O_{12}N_2Cl_2$: C = 33,9 % ; H = 7,7 % ; N = 5,6 % ; Cl = 14,3 % ; O = 38,7 % ; pérdida al secarse = 18,1 %. La pérdida 20 da al secarse concuerda estrechamente con la presencia de 5 moléculas de agua de cristalización, de manera que la fórmula de la base de M-141 es $C_{14}N_2O_7$.

El diseño de difracción por rayos X para el hidrocioruro M-141 cristalino se obtuvo como anteriormente se describe para el sulfato. Los espaciados d y las intensidades se muestran en la siguiente tabla:

25 Diseño de difracción por rayos X para el hidrocioruro de M-141

Espaciado d en Angstroms	Intensidad relativa calculada	Espaciado d en Angstroms	Intensidad relativa calculada
11,5	3	2,78	4
9,2	5	2,66	4
7,9	2	2,60	2
7,1	6	2,54	2
6,6	8	2,45	3
6,1	9	2,36	2

-sigue-

30

26 75 3 8



Espaciado d en Angstroms	Intensidad relativa calculada.	Espaciado d en Angstroms	Intensidad relativa calculada.
5,8	1	2,31	2 amplio
5,2	1	2,28	2 amplio
4,64	9	2,23	1
4,36	4	2,18	4 amplio
4,10	2	2,12	1
3,85	6 amplio	2,06	2
3,71	1	1,99	2
3,61	1	1,91	1
3,50	3	1,87	1
3,40	1	1,84	2
3,30	10	1,77	1 amplio
3,16	1	1,74	1
3,09	4	1,70	1
2,95	4	1,65	1
2,87	3	1,56	1

Los intentos de preparación de la base libre han resultado hasta ahora insatisfactorios debido a la inestabilidad de la misma al elevado pH requerido para separar el ácido de la función básica teniendo un pKa de 9. Sin embargo, no es necesario obtener la base libre a fin de convertir el hidrocloreuro o sulfato en cualquier sal deseada. En el proceso de recuperación de la sustancia antimicrobiana del líquido de cultivo puede emplearse una resina de cambio catiónico. La sustancia antimicrobiana puede obtenerse por elución de la resina mediante el ácido deseado, y el producto será entonces la sal deseada. Sin embargo, es conveniente cristalizar una sal de la base antimicrobiana a fin de liberarla de bases orgánicas indeseadas. Las sales hidrocloreuro y sulfato son fácilmente cristalizadas de acetona acuosa o de sus soluciones acuosas sobresaturadas. Es por consiguiente, conveniente preparar el hidrocloreuro o sulfato cristalino y convertirlo luego en otras sales deseadas por cualquier medio conveniente. El uso de una resina de cambio aniónico cargada con el ácido deseado es un método general de sustitución de un ácido por otro. Como ejemplos ilustrativos de las sales que pueden prepararse de esta manera, figuran el formato, carbonato, oxalato, salicilato, citrato, benzoato y similares.

Cuando se produce un espectro infrarrojo de agente antimicrobiano M-141 como la sal hidrocloreuro cristalina en forma de una muselina

267538



Nujol, usando un espectrofotómetro de doble haz, se ven las siguientes bandas de absorción:

Espectro infrarrojo

	<u>Longitud de onda en micras</u>	<u>Frecuencia en centí- metros recíprocos</u>	<u>Intensidad</u>
5	2,9 - 3,4	3400 - 2940	S (amplio)
	3,45	2900	Nujol
	5,95 - 6,15	1680 - 1625	M (amplio)
	6,36	1572	M
	6,85	1460	Nujol
	7,27	1376	Nujol
	7,39	1353	W
	7,51	1332	W
	8,49	1177	W
10	8,73	1145	M
	8,90	1124	W
	9,01	1110	M
	9,2	1087	M
	9,29	1076	M
	9,54	1048	M
	9,63	1039	M
	9,72	1029	M
	9,97	1003	M
	10,45	957	M
15	10,62	941	W
	10,79	927	S
	11,16	896	W
	11,39	878	W
	11,58	864	S
	12,21	819	W
	13,73	728	M
	13,9	719	Nujol

S = Fuerte; M = Medio y W = Débil.

20

En el dibujo adjunto se muestra el espectro completo de absorción infrarroja del hidrocloreuro cristalino del agente antimicrobiano M-141. En dicho dibujo las letras A-A indican la absorción y el lado B la longitud de onda (micras).

Cromatografía en papel del hidrocloreuro de M-141 cristalino.-

25

Los siguientes valores aproximados de R_f se obtuvieron cromatografiando 1,0 mcg del hidrocloreuro cristalino de M-141 mediante técnica ascendente a 28°C. Se obtuvieron bioautografías usando medio de ensayo antibiótico Difco núm. 5 sembrado con esporas de Bacillus subtilis ATCC 10707.

30



267538

Sistema disolvente 1.-n-butanol saturado con agua desionizada a 28°C.

Equilibrio con vapores disolventes - 3 horas

Irrigación o desarrollo - 16,5 horas

Rf = 0,03

5

Sistema disolvente 2.- Igual que el disolvente 1 con adición de un 2,0 % p/v de ácido p-toluenosulfónico.

Tiempo de equilibrio - 3 horas

Irrigación o desarrollo - 16,5 horas

Rf = zona principal 0,25 - 0,30; zona menor aproximadamente 0,40;

10

Tamaño de zona reducido en comparación con el disolvente 1.

Sistema disolvente 3.- Igual que el disolvente 1 con adición de un 2,0 % p/v de ácido p-toluenosulfónico y un 2,0 % de piperidina, v/v.

Equilibrio - 3 horas.

15

Tiempo de irrigación o desarrollo - 16,5 horas.

Valor Rf - aproximadamente 0,45.

La zona de inhibición de este sistema es marcadamente reducida respecto a la producida por el sistema 1 y apreciablemente menor que la producida en el sistema 2.

20

La invención no se limita a la producción del agente antimicrobiano M-141 mediante las especies descritas de Streptomyces. Se entiende que los procesos fermentadores de esta invención abarcan también otras razas de Streptomyces flavopersicus productoras del agente antimicrobiano M-141 y producidas mediante exposición del organismo descrito a medios modificadores tales como rayos X, luz ultravioleta y agentes químicos tales, por ejemplo, como mostazas nitrogenadas.

25

El agente antimicrobiano M-141 en forma de sus sales de adición ácida se caracteriza por un amplio espectro antibacteriano. La actividad de dicho agente contra organismos ilustrativos se muestra en la siguiente tabla:

30

26 7538



Espectro antimicrobiano

Concentración inhibitoria
mínima después de 48 ho-
ras en mcg/ml.

5

10

15

20

25

30

Organismo	Concentración inhibitoria mínima después de 48 horas en mcg/ml.
Aerobacter aerogenes	> 100
Escherichia coli 6880	25
Escherichia coli Juhl	50
Klebsiella pneumoniae	25
Neisseria catarrhalis	12,5
Salmonella enteritidis	50
Salmonella typhimurium	100
Shigella sonnei	75
Proteus vulgaris	400
Proteus mirabilis	100
Pseudomonas aeruginosa BMN # 10	25
Pseudomonas aeruginosa BMN # 1	> 100
Pseudomonas aeruginosa BMH # 4	> 100
Pseudomonas aeruginosa BMH # 6	> 100
Pseudomonas aeruginosa 10145	> 100
Pasteurella multocida	25
Bacillus subtilis	50
Clostridium sporogenes	> 400
Corynebacterium species	50
Diplococcus pneumoniae	50
Lactobacillus casei	25
Sarcina lutea	50
Staphylococcus aureus 209P	100
Staphylococcus aureus Smith	200
Staphylococcus aureus Treaster	> 100
Staphylococcus aureus Wise 391	> 100
Staphylococcus albus	100
Streptococcus faecalis	> 100
Streptococcus pyogenes	50
Candida albicans	> 100
Saccharomyces cerevisiae	> 100
Actinomyces bovis	12,5
Aspergillus niger	> 100
Chaetomium globosum	> 100

El agente antimicrobiano M-141 en forma de sus sales de adición ácida tiene un bajo orden de toxicidad y puede emplearse por vía oral o endovenosa. La toxicidad del hidrocloreuro de M-141, empleado por ejemplo por vía endovenosa, ha resultado tener un LD₅₀ de 1000 mg/kg aproximadamente. Oralmente, la toxicidad del hidrocloreuro de M-141 ha resultado proporcionar un LD₅₀ demás de 5000 mg/kg. El agente antimicrobiano M-141 es extremadamente útil en el control de la coccidiosis. En operaciones representativas, se ha descubierto que cuando el agente antimicrobiano de hidrocloreuro de M-141 se incorpora en el alimen-

7538 JUL



to de los pollos a una concentración de 0,9 a 1,8 gramos por 1,5 kg. de alimento y se administra a pollos intensamente infectados de coccidias debido a la presencia del organismo protozoario Himeria tenella resultaba un excelente control de dicha enfermedad.

NOTA

En resumen: La Patente de Invención que se solicita, recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Método de producción de una sustancia antimicrobiana que comprende el cultivo del organismo Streptomyces flavoparsicus bajo condiciones aeróbicas sumergidas en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de hidrato de carbono, nitrógeno orgánico y sales inorgánicas hasta que se produzca una sustancial actividad antimicrobiana por dicho organismo en el referido medio de cultivo.

2ª.- Método de producción de una sustancia antimicrobiana, que comprende el cultivo del organismo Streptomyces flavopersicus bajo condiciones aeróbicas sumergidas en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de hidrato de carbono, nitrógeno orgánico y sales inorgánicas hasta que se produce una sustancial actividad antimicrobiana por dicho organismo en el citado medio de cultivo, y la recuperación del agente antimicrobiano del referido medio de cultivo.

3ª.- Método según la reivindicación 2, en el que el organismo es el Straptomyces flavopersicus ERRL 2820.

4ª.- Método según la reivindicación 2, que incluye las operaciones de clarificar el medio de cultivo, absorber el agente antimicrobiano del medio de cultivo clarificado con un absorbente sólido y efectuar la elución del material absorbido.

5ª.- Método según la reivindicación 2, en el que el medio de cultivo se mantiene a una temperatura comprendida entre 24 y 32°C aproximadamente y el desarrollo del organismo se lleva a cabo durante un periodo de 1 a 5 días.



26 753 828 JUL

6º.- Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita "METODO DE PRODUCCION DE UNA SUSTANCIA ANTIMICROBIANA".

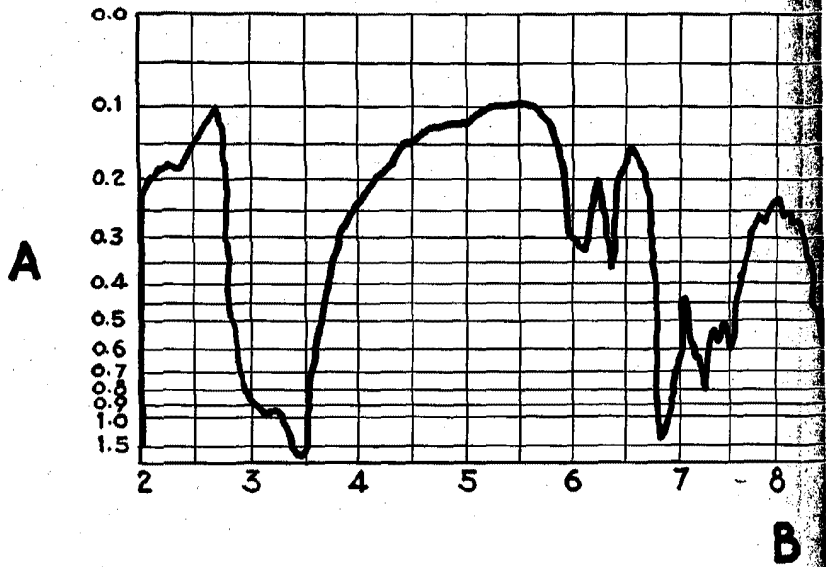
5 Todo conforme se reivindica en la presente memoria, que consta de cuarenta y una hojas escritas a máquina y dibujos que se acompañan.

Madrid, 20 de mayo de 1961

ALFONSO UNGRIA

ABBOTT LABORATORIES

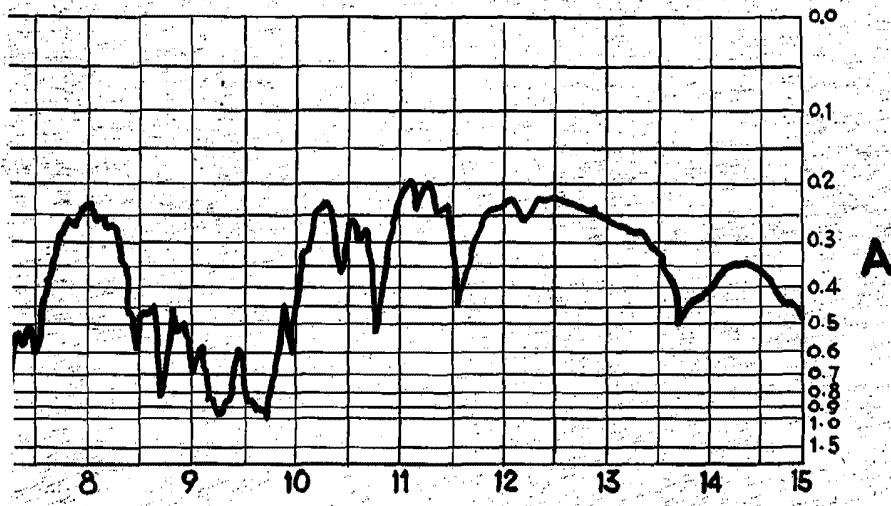
26 753 8



HOJA UNICA



20 MAY 1961



ESCALA VARIABLE

Madrid, 20 de MAYO de 1961

ALFONSO UNGRIA

P.P.