



308176

P A T E N T E   D E   I N T R O D U C C I O N

Por DIEZ años

en España, a favor de la firma HOVIONE SOCIEDAD INDUSTRIAL Y COMERCIAL DE PRODUCTOS QUIMICOS LIMITADA, de nacionalidad portuguesa, residente en Travessa - Do Ferreiro, A Lapa nº 1 (LISBOA), cuya patente -- tiene por objeto:

"PROCEDIMIENTO DE FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE OXITETRACICLINA".

-----

M E M O R I A   D E S C R I P T I V A

El presente invento se refiere a la producción de oxitetraciclina, y en especial a la producción de oxitetraciclina por medio de la fermentación sumergida por una cepa mutante de Streptomyces -

5.-      alboflavus.



La mencionada cepa mutante fué depositada en la colección del Centralbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda, bajo la designación de Streptomyces alboflavus M-108-OX.

5.-

El Streptomyces alboflavus es una especie conocida y, según el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (Manual de Bacteriología Determinativa), 7ª Edición, editado por la casa "The Williams & Wilkins Company", Baltimore, 1957, fué des-

10.-

crita primeramente por Waksman y Curtis en 1.916 y reclasificado por Waksman y Henrici en 1.948.

15.-

Sin embargo, el Streptomyces alboflavus, tal como está descrito o es suministrado por las diversas colecciones de cepas, no es adecuado para la producción, experimental o industrial, de oxite-traciolina.

20.-

La cepa original de Streptomyces alboflavus, la cual fué sometida a mutación y selección a fin de obtener un mutante utilizado en el presente procedimiento de invención, se obtuvo de la colección del Centralbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda, (designada más adelante por CBS), siendo a su vez descendiente directa de la cepa madre de Waksman. Esta cepa produce esencialmente --

25.-

antibióticos, con mucha probabilidad, del grupo de las actinomicinas, teniendo  $R_f$ s de 0,85 a 0,95 tras



la cromatografía en papel del caldo fermentado y un color rojo a la luz de Wood.

La mutante objeto del presente invento, se obtuvo por irradiación ultravioleta de los cultivos de espora única de la cepa del tipo original antes citado, seguida de una cuidadosa selección conforme a los criterios y técnicas conocidas. De las diversas mutantes formadas fueron escogidas, tras la valoración analítica, para la producción de oxitetraciclina, varios tipos, uno de los cuales se describe aquí de manera detallada.

Con la finalidad de, por una parte, caracterizar la mutante *Streptomyces alboflavus* M-108-OX, y por otra de demostrar una amplitud de variaciones características, se da a continuación una descripción comparativa entre:

El *Streptomyces alboflavus* obtenido de la cepa tipo Waksman CBS.

El *Streptomyces alboflavus* M-108-OX, mutante obtenida por nosotros de la cepa anterior,

El *Streptomyces rimoeus*, (Sobin, Finlay et al.), cepa madre obtenida del CBS.

La última cepa fué incluida en la presente descripción únicamente a título comparativo, por ser un microorganismo mejor conocido como productor de oxitetraciclina.



Las tres cepas se cultivaron simultáneamente en 14 medios de cultivo y se observaron y describieron las características tales como color de cultivo y de esporulación (en el caso de presentarse esta), color de formación de los pigmentos, etc. -  
5.- Tras cultivos repetidos, se observaron las siguientes características, después de 16 días de incubación a 26° C.

1) Medio acuoso de fermentación de mijo -  
10.- al 0,6 % con la composición:

	Agar agar	10 gr.
	Agua de maceración de mijo (corn steep liquor) 50 %	3 gr.
15.-	Glucosa	15 gr.
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2,5 gr.
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7,5 gr.
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 gr.
20.-	$\text{MnCl}_2$	0,002 gr.
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,002 gr.
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025 gr.
	Agua	500 cc.
	pH 7, después de la esterilización.	

El *Streptomyces alboflavus* forma colonias  
25.- brillantes, bien separadas, de color amarillo sucio, sin formación de esporas ni de pigmento, mientras -



que el *Streptomyces alboflavus* mutación M-108-OX -  
forma colonias esporuladas de color blanco ligera--  
mente oscurecido con pigmento difusible marrón cla--  
ro; el *Streptomyces rimosus* crece poco, sin esporu--  
5.- lación, formando colonias grises con muy poco micedio  
aéreo y con poco pigmento difusible de color -  
marrón claro.

2) Medio acuoso de maceración de mijo --  
0,4 %, con composición igual a la del primero, sien--  
10.- do la cantidad de corn steep liquor 2 gr. en lugar -  
de 3 gr.

Las tres cepas se desenvuelven de manera -  
similar a la obtenida en el medio 1), aunque el cre--  
cimiento parece más lento.

15.- 3) Medio de gelatina, con la fórmula.

Extracto de carne	1,5 gr.
Peptona	2,5 gr.
Gelatina	80 gr.
Agua destilada	500 gr.

20.- pH 6,2 antes de la esterilización.

Las tres cepas se desenvuelven bastante -  
bien bien en este medio, provocando una licuefac--  
ción muy lenta, siendo el *Streptomyces alboflavus*  
var. M-108-OX el único en formar un pigmento de co--  
25.- lor naranja.

4) El medio N° 4 de nuestra relación habi-

- 6 -  
308176



tual para fines taxonómicos no fué usado.

5) Medio de Czapek-Dox-Dextrina, con la fórmula:

	Dextrina	5 gr.
5.-	$\text{NaNO}_3$	1 gr.
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5 gr.
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 gr.
	KCl	0,25 gr.
	$\text{FeSO}_4$	un cristal pequeño
10.-	Agar agar	7,5 gr.
	Agua destilada	500 cc.

pH 6,8 después de la esterilización.

El *Streptomyces alboflavus* forma colonias

15.- bien separadas, redondas, de color gris claro rodeadas por una aureola blanca, formada por micelio aéreo nuevo, con muy poco pigmento difusivo gris claro, mientras que el *Streptomyces alboflavus* var. M-108-OX forma colonias juntas, de color marrón oscuro, formando lentamente un micelio aéreo blanco que cubre el color inicial. El *Streptomyces rimosus* crece poco después sin formar micelio aéreo con colonias juntas de color marrón, y forma un pigmento difusible de color grisáceo intenso.

25.- 6) Medio de patata.

Se lava un trozo de patata ( $\emptyset$  1,5 cm., 3,6 cm. de altura) con una solución de - - -



10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se esteriliza en un tubo de ensayo -  
junto con 1,5 cc. de agua destilada.

- 5.- El Streptomyces alboflavus forma un cre-  
cimiento vegetativo grisáceo rosado y poco micelio  
aéreo de color blanco sucio a grisáceo , mientras -  
que el Streptomyces alboflavus var. M-108-OX forma  
micelio rápidamente, denso, de aspecto rugoso, de -  
color blanco. El Streptomyces rimosus se desenvuel-  
ve bien, cubriendo la superficie del pedazo de pa-  
10.- tata con un crecimiento alveolar de color bronce a  
bronce rojo brillante, sin formar micelio aéreo. -  
El color del trozo de patata queda inalterado don-  
de no hay crecimiento, exceptuándose el caso del --  
Streptomyces rimosus que provoca la aparición del -  
15.- color marrón claro.

7) Medio de Benett, con la fórmula:

	Extracto de levadura	0,5 gr.
	Extracto de carno	0,5 gr.
	Caseina hidrolizada	1 gr.
20.-	Glucosa	5 gr.
	Agar agar	10 gr.
	Agua destilada	500 gr.

El pH, ajustado a 7, da tras la esterili-  
zación pH 6,7.

- 25.- En este medio, el Streptomyces alboflavus  
produce un crecimiento vegetativo sin pigmento y -



sin micelio.

5.- El Streptomyces alboflavus, var M-108-OX produce un crecimiento vegetativo, de color azul - acero intenso con un micelio aéreo blanco a blanco ceniciento y un pigmento difusible marrón oscuro.

El Streptomyces rimosus crece más lentamente formando colonias vegetativas de color gris - intenso y micelio aéreo raro de color ceniciento - claro.

10.- 8) Medio de glicerina- asparagina, con la fórmula:

	Glicerina	5 gr.
	Asparagina	0,25 gr.
	Extracto de carne	1 gr.
15.-	$K_2HPO_4$	0,25 gr.
	Agar agar	7,5 gr.
	Agua destilada	500 cc.
	pH 6,9 después de la esterilización.	

20.- El Streptomyces alboflavus forma colonias distintas brillantes de color blanco sucio sin micelio aéreo o pigmento, mientras que el Streptomyces alboflavus var. M-108-OX forma colonias de color marrón oscuro, casi negro, formando micelio -- aéreo blanco y pigmento difusible de bronce rojizo.

25.- El Streptomyces rimosus produce colonias de color gris claro, con muy poco micelio aéreo, blanco su-



cio y pigmento difusible amarillo claro.

9) Medio de Czapek-Dox, con fórmula:

	$\text{NaNO}_3$	1	gr.
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5	gr.
5.-	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	gr.
	KCl	0,25	gr.
	$\text{FeSO}_4$	un cristal	pequeño
	Agar Agar	7,5	gr.
	Agua destilada	500	cc.

10.- pH 7,1 después de la esterilización.

En este medio no hay crecimiento exceptuando un pobre desenvolvimiento vegetativo, amarillo claro, en el caso del *Streptomyces alboflavus*.

10) Medio de Emerson, con la fórmula:

15.-	Extracto de levadura	2	gr.
	Almidón soluble	7,5	gr.
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5	gr.
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	gr.
	Agar Agar	10	gr.
20.-	Agua destilada	500	cc.

pH 7, después de la esterilización:

En este medio el *Streptomyces alboflavus* forma colonias bajas poco rugosas de color amarillo parduzco y pigmento difusible del mismo color, y sin micelio aéreo, mientras que el *Streptomyces alboflavus* var. M-108-OX y el *Streptomyces rimosus*

308176



crecen de la misma manera, formando colonias vegetales de color amarillo a parduzco y pigmento amarillo castaño, siendo un poco más claro en el caso de la última cepa.

5.- 11) Medio de Czapek-Dox-Almidón, con fórmula:

	Almidón soluble	5 gr.
	NaNO <sub>3</sub>	1 gr:
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 gr.
10.-	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 gr.
	KCl	0,25 gr.
	FeSO <sub>4</sub>	un cristal pequeño.
	Agar agar	7,5 gr.
15.-	Agua destilada	500 cc.

pH 7, después de la esterilización.

Las tres cepas se desenvuelven exactamente como en el medio -5- de Czapek-DoxDextrina.

20.- 12) Medio de leche de púrpura; medio comercial de la casa Difco ("Purple milk"), pH 6,45 antes de la esterilización.

Las tres cepas crecen bien, sin cambio del pH.

25.- 13) Medio nutritivo, con la fórmula:

	Extracto de carne	1,5 gr.
	Peptona	2,2 gr.

3.8176

1.



Agar agar 7,5 gr.

Agua destilada 500 cc.

pH 6,8 después de la esterilización.

- 5.- El Streptomyces alboflavus forma colonias distintas, redondas brillantes, vegetativas de color blanco sucio a ligeramente amarillo con pigmento -- difusible muy ligero de color amarillo claro, mientras que el Streptomyces alboflavus var. M-108-CX - y el Streptomyces rimosus tienen la misma apariencia
- 10.- y crecimiento vegetativo de color grisáceo a amarillento, con pigmento difusible ligero de color anaranjado claro.

14) Medio de Glucosa- asparagina, con la fórmula:

- 15.- Glucosa 1 gr.
- Asparagina 0,25 gr.
- Extracto de carne 1 gr.
- $K_2HPO_4$  0,25 gr.
- Agar Agar 7,5 gr.
- 20.- Agua destilada 500 cc.

El pH. después de la estrilización -- - es 6,9.

- Los aspectos de las tres cepas en este medio son similares a los del medio anterior siendo al
- 25.- crecimiento más lento y los pigmentos formados más - claros.



15) Medio de Azúcar - dextrina - nitrato,

con la fórmula:

	Dextrina	5	gr.
	$\text{NaNO}_3$	1	gr.
5.-	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	gr.
	KCl	0,25	gr.
	Dextrosa	15	gr.
	$\text{FeSO}_4$	un cristal pequeño	
	Agua destilada	500	cc.
10.-	pH 7 después de la esterilización.		

- En este medio, el *Streptomyces alboflavus* produce micelio aéreo de blanco a grisáceo, desarrollándose rápidamente, con pigmento difusible amarillo claro. El *Streptomyces alboflavus* var. M-108-OX
- 15.- forma un crecimiento vegetativo casi negro con pigmento difusible marrón oscuro y micelio aéreo raro de color blanco. El *Streptomyces rimosus* produce -- un crecimiento vegetativo y pigmento difusible ambos de color amarillo castaño, sin formación de micelio aéreo.
- 20.-

Los medios descritos fueron preparados con productos de la casa E. Merck Darmstadt (compuestos inorgánicos y asparagina) y los restantes productos de la casa Difco.

- 25.- El *Streptomyces alboflavus* var. M-108-OX produce conidios en gran número, contrariamente a --



su cepa madre. Las cadenas de conidios forman muchas veces espirales abiertas. Los conidios son elipsoidales, midiendo de 0,7 a 0,9 por 1,0 a 1,5 micrones y son de superficie lisa. El color de las esporas -

5.- en conjunto es el de la aceituna negra madura.

El *Streptomyces alboflavus* var. M-108-OX es adecuado para la fermentación industrial sumergida dando rendimientos elevados.

10.- El mejor nutriente acuoso para la fermentación industrial contiene un origen de sodio asimilable, un origen de carbono y sales minerales.

15.- Como fuente de sodio se puede utilizar un hidrolizado de caseína, extracto de malta de cebada o de mijo, agua de maceración de mijo, harina de cacahuete, harina de soja, etc.

20.- Como fuente de carbono se pueden usar -- diversos carbohidratos como glucosa, dextrosa, maltos, amido, dextrina, etc. Además de sales minerales, presentes en vestigios, tales como sales de -- hierro, cobre, cobalto, zinc, el medio contiene -- carbonato de calcio y fosfato de amonio con la finalidad primordial de regular el pH del medio.

La cantidad y proporción de los elementos nutritivos se indican en los ejemplos.

25.- La adición de N,N' dibenciletilenodiamina (DBED) a los medios nutritivos habituales preparados conforme al párrafo anterior provoca un rendi-



miento más elevado en comparación a los ensayos para  
lelos similares sin la adición de DBED. La cantidad  
de DBED para dar buenos resultados es del orden de -  
10 a 3000 mgs/ litro de medio. Se obtienen mejores -  
5.- resultados añadiendo el DBED bajo forma de acetato  
o lactato en diversas fracciones durante la fermentación,  
siendo añadida la cantidad inicial incorporada al medio antes  
de la inoculación, comprendida entre 10 a 100 mgs/litro. La  
fermentación se hace -  
10.- a una temperatura de 24 a 30° C con una aireación fuerte,  
de un orden de 0,1 a 0,7 partes del volumen a fermentar,  
variando según la fase de fermentación.

Para obtener los mejores resultados, el -  
pH deberá estar entre 7 a 7,5 al iniciarse la fermentación,  
15.- descendiendo después lentamente a 5,2 - 5,6 y subiendo después  
a 6,2 - 6,5 al final de la fermentación.

El tiempo de fermentación hasta obtener -  
al máximo rendimiento es de 96 a 150 horas conforme  
20.- a las condiciones de la fermentación.

Una vez concluida la fermentación, el -  
antibiótico se extrae por acidificación del medio hasta  
pH - 1 a 2 con un ácido y entonces se filtra el -  
medio acidificado. El antibiótico se encuentra esencialmente  
25.- en el filtrado, de donde se puede aislar



por cualquiera de los métodos, conocidos, por precipitación o por extracción en disolvente orgánico etc., seguido de recristalización. Puede preferirse el método DBED, procediendo de la manera siguiente:

- 5.- Se aumenta el pH del filtrado de la extracción ácida hasta pH 5 ó 6 con amoníaco del 12% y se añade acetato de DBED hasta obtener una concentración de un décimo a un quinto en peso de oxitetraciclina contenida en el medio fermentado (descontando todavía la cantidad adicionada de DBED durante la fermentación en el caso de haberla). Después se ajusta el pH a 8,5 a 9 con amoníaco al 12% provocando la precipitación en estado casi puro de los complejos de DBED de oxitetraciclina, teniendo una composición casi equivalente a la Oxitetraciclina .<sup>2</sup>  
DBED.Ca, (en el caso de contener el medio iones de calcio). Pueden formarse también complejos de otra composición de menor importancia. Se filtra el precipitado del complejo, se lava con agua y se seca en vacío a 35 a 60° C. Después de pulverizado el complejo se recristaliza en un alcohol alifático, con 1 a 3 átomos de carbono, acidificándolo hasta pH 1 a 2 con ácido clorhídrico gaseoso. El clorhidrato formado así se cristaliza después de 6 horas.
- 25.- Acidificándose el complejo hasta el punto isoeléctrico en medio acuoso se precipita la oxite-



traciclina bajo forma de base con la fórmula de --  
 $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot 2H_2O$  y la composición centesimal ---  
siguiente:

- 5.- Calculado: C 53,22%, H 5,68%, N 5,64%,  $H_2O$  7,26%  
Hallado: C 53,16%, H 5,61%, N 5,7%,  $H_2O$  7,4 %  
Punto de fusión: 180 a 183° C con descomposición.-  
La rotación óptica es  $[\alpha]_D -196,5$   
(C = 1 en 1/10 N HCl). Absorción en ultravioleta -  
en tampón de fosfato (0,1 molar) el pH 4,5  
10.- ( $K_{1cm}^{1\%}$  240 a 298 m $\mu$ . 322 a 276 m $\mu$ , 300 a 353 m $\mu$ ).

- Sea el producto obtenido hidrocioruro o -  
base, comparado con los standard de referencia --  
(de la Food and Drug Administration) de oxitetraci-  
clina, es idéntica desde el punto de vista analítico  
15.- y de la acción antibacteriana. La ventaja industrial  
del presente procedimiento de invención utilizando -  
la mutación artificial *Streptomyces alboflavus* -  
M-108-OX consiste principalmente en los rendimientos  
elevadísimos obtenidos, que sobrepasan con mucho a  
20.- los más altos ya publicados utilizando cepas de --  
*Streptomyces rimosus*.

Para ilustración del presente procedimien-  
to, de invención sirven los siguientes ejemplos:

EJEMPLOS:

- 25.- 1) Todos los medios fueron preparados con  
agua decentada. Se inoculó un litro de medio esteri-



lizado con la composición:

	Agua de maceración de mijo (corn steep liquor)	10 gr.
	Azúcar	10 gr.
5.-	CaCO <sub>3</sub>	1 gr.
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 gr.
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 gr.
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 gr.
	Agua	1.000 cc.
10.-	con 1 ml. de suspensión de esporas de Streptomyces alboflavus var. M-108-OX incubado a 25° C en un - agitador rotativo durante 36 horas. Despues se -- inoculó un fermentador piloto conteniendo un medio esterilizado de fórmula:	
15.-	Agua decentada	120 l.
	Almidón	6 kgs.
	Agua de maceración de mijo (50%)	2,7 kgs.
	CaCO <sub>3</sub>	0,72 kgs.
20.-	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,8 kgs.
	NH <sub>4</sub> Cl	0,2 kgs.
	CoCl <sub>2</sub>	0,180 gs.
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,6 gs.
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6 gs.
25.-	FeSO <sub>4</sub>	0,180 gr.
	Aceite de tornasol	0,2 gr.

con el precultivo de 36 horas mencionado.

3081765



Se realizó después la fermentación sumergida a 26° C con agitación y aireación estéril:

En diversos intervalos se determinó el pH del medio y la cantidad de oxitetraciclina formada, dando los valores siguientes:

5.-

Tiempo de fermentación en horas.	pH	Contenido de tetraciclina.	mcg/ml.
0	7,2	-	-
36	6,2		180
10.- 46	5,9		1200
62	5,7		2100
85	5,3		3400
110	5,6		4900
135	6,3		6000
15.- 150	6,35		6600

Pasadas 150 horas se interrumpió la fermentación, teniendo una concentración final de oxitetraciclina de 6,6, gr. por litro.

20.- 2) Ejemplo conforme al anterior, pero -- en el que se añadió N-N'-dibenciletilenodiamina -- diacetato al medio, en varias fracciones: 8,4 grs. antes de la inoculación, 8,4 grs. pasadas 50 horas de fermentación y 8,4 grs. después de 120 horas. - Pasadas 140 horas, el contenido de oxitetraciclina era de 8,1 gr./litro de caldo.

25.-

3) El caldo fermentado en el ejemplo -1- se acidificó con ácido sulfúrico al 25% hasta -



- pH 1,5, filtrándose y el micelio se lavó con agua .  
El filtrado reunido tenía un volumen de 240 litros.  
Se añadieron entonces 2 gr./litro de tetraacetato -  
de etilenodiamina sódica (agente secuestrador). El
- 5.- pH se ajustó después a pH 6 con amoniaco al 12% y  
se incorporaron entonces 150 grs. de diacetato de  
N,N' dibenciletilenodiamina y se aumentó el pH --  
hasta 9,5 con amoniaco al 12%. Después de 3 horas  
de agitación se lavó y se filtró el precipitado --
- 10.- formado hasta llegar el pH de las aguas de lavada  
a pH 7. Se secó el precipitado a 50° C bajo vacío.  
El precipitado obtenido se molió y después se sus-  
pendió en dos veces su peso de metanol. Después de  
30 minutos de agitación se acidifico con ácido --
- 15.- clorhídrico gaseoso hasta pH 2 y después con ácido -  
clorhídrico (36%) se bajó el pH hasta 1,5 y se --  
agitó. Se filtró y se lavó con metanol y se secó -  
en vacío durante 6 horas. El rendimiento en clorhi-  
drato de oxitetraciclina es del 81 %.
- 20.- 4) Se suspende el producto obtenido en el  
ejemplo 3) en peso igual de metanol y se ajusta su  
pH a 7,8 con una mezcla 1:1 de metanol y trietila--  
mina. Se filtra la solución obtenida así. Se ajusta  
entonces el pH a 5 y se añade en agua cinco veces
- 25.- el volumen de la solución. Se cristaliza la oxi-  
tetraciclina base. Después de filtrar se seca en -  
vacío y se obtiene la base con un rendimiento ---

308176



del 92 %.

NOTA.-

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

5.- siguientes:

REIVINDICACIONES

10.- 1ª.- "Procedimiento de fermentación para la producción de oxitetraciclina" caracterizado - por el hecho de fermentarse un caldo nutritivo, de manera aerobia, a una temperatura comprendida en-- tre los -22- y los 30º C, por mutantes de Strepto-- myces alboflavus (Waksman & Curtis) y aislar suce-- sivamente la oxitetraciclina formada durante la -- fermentación.

15.- 2ª.- "Procedimiento de fermentación para la producción de oxitetrociclina", según la reivin-- dicación 1ª caracterizado por el hecho de ser su-- mergida la fermentación y estar compuesto el caldo nutritivo por un origen de carbono y de sodio asimi-- 20.- lables y de sales minerales favorables al desarro-- llo del microorganismo.

25.- 3ª.- "Procedimiento de fermentación para la producción de oxitetraciclina" según las reivin-- dicaciones anteriores caracterizado por el hecho -- de ser obtenido el mutante a partir de una cepa de "Streptomyces alboflavus" (Waksman & Curtis), Waks-



- mann, del Centralbureau Voor Schimmelcultures, --  
Baarn, estando este mutante productor de oxitetraciclina depositado simultáneamente con el presente pedimento en la misma colección con la designación de "Streptomyces alboflavus, M-108-OX".
- 5.- 4ª.- "Procedimiento de fermentación para la producción de oxitetraciclina" según la reivindicaciones anteriores caracterizado por el hecho de un aislamiento de oxitetraciclina del medio fermentado, realizada por medio de complejos de N,N' dibenciletilenodiamina de oxitetraciclina, preferiblemente en presencia de iones de calcio.
- 10.- 5ª.- "Procedimiento de fermentación para la producción de oxitetraciclina" conforme a las reivindicaciones 1ª a 3ª caracterizado por el hecho de realizarse una fermentación en presencia de una sal hidrosoluble, con preferencia acetato de N,N' dibenciletilenodiamina, añadida en varias porciones durante la fermentación al medio de cultivo, en una cantidad total comprendida entre 100 a 3.000 mg/l y, seguidamente ser aislada la oxitetraciclina en estado puro, bajo forma de complejos, sales o base.
- 15.- 6ª.- "PROCEDIMIENTO DE FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE OXITETRACICLINA".
- 20.-
- 25.-

- 22 - 308176



Todo ello, conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de VEINTIDOS hojas escritas a máquina por una sola de sus caras y dibujos que la ilustran.

Madrid, 15 de Enero de 1.965