

332435



MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

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

formulada el 19 de Octubre de 1.966, con el número 332.439

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de CHINOIN GYÓGYSZER-ÉS VEGYÉSZETI TERMÉKEK GYÁRA RT., entidad húngara, establecida en Tó utca 1-5, Budapest, Hungría, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PRIMICINA"

Es conocido que el antibiótico primicina, que originalmente se obtenía por cultivo de la familia o cepa de hongos *Streptomyces primycini*, muestra propiedades terapéuticas muy valiosas. El antibiótico producido a partir de los hongos era aislado por la extracción directa del líquido de fermentación o por la acidificación del líquido de fermentación y por la denominada adsorción con precipitación, o por salificación (véase Nature 174, 1105

5



(1954); Pharmazie 11 304 (1956); patente húngara 146.332 (1958) y 151.197 (1963).

5 La familia *Streptomyce primycini* mostraba en diversos medios nutrientes, ricos en manantiales de nitrógeno, una capacidad de producción muy baja, la cual no podía ser elevada hasta un nivel que hiciese posible la producción industrial racional ni por utilización de otros nuevos medios nutrientes diferentes del original, ni por ensayos de selección y purificación, El cultivo de variantes naturales aptas para la producción de esta familia era
10 también bastante difícil por el hecho de que la familia *S. primycini* no producía ni micelios aéreos ni esporas en diversos medios nutrientes sólidos (véase Acta Pharm. Hung. XXXI, 3, 133, 140).

15 El objeto del presente invento es un nuevo procedimiento adecuado para la producción industrial y que proporciona altos rendimientos, para la preparación de primicina; este procedimiento está caracterizado porque se cultiva la nueva familia de microorganismos *Thermopolyspora galeriensis*, que fue depositada en el Instituto Nacional Húngaro para Sanidad con el número 650.707, o derivados, variantes o mutantes de esta familia, en un medio nutriente que contiene manantiales orgánicos de carbono, manantiales orgánicos de nitrógeno, sales inorgánicas y ventajosamente grasas, aceites, alcoholes grasos y ácidos
20 grasos naturales y/o sintéticos, en un cultivo sumergido agitado y aireado, y porque después de alcanzar una concentración adecuada en material activo se aísla desde el medio de fermentación la primicina bruta producida.

30 La familia *Thermopolyspora galeriensis* utilizada en el procedimiento según el invento se diferencia



micromorfológicamente de manera esencial de las familias que se incluyen en el género *Streptomyces* y por lo tanto se diferencia también del *Streptomyces primycini* y, de acuerdo con los sistemas de clasificación de Waksman y de

5 *Krasilnikow* puede ser incluida en el género *Thermopolyspora* o *Mikromonospora*. Los micelios aereos de esta familia no muestran las propiedades estructurales características del género *Streptomyces*, es decir los micelios no se fragmentan en esporas, sino que las esporas redondas u ovaladas que aparecen individualmente o en grupos se desarrollan en las cortas ramificaciones de los micelios. La nueva familia utilizada según el invento se diferencia por lo tanto de la familia antes descrita de *Streptomyces primycini* entre otras cosas también por las propiedades morfológicas fundamentales de que produce grandes cantidades de esporas y en los medios nutrientes utilizados por los solicitantes forma micelios aereos bien desarrollados. El micelio muestra en sus posteriores etapas de desarrollo - dependiendo de los medios nutrientes utilizados - una tendencia a la lisis o disociación celular.

10

15

20

La familia *Thermopolyspora galeriensis* aislada por los solicitantes supera con su alta producción de antibióticos a todas las variantes del *Streptomyces primycini* precedentemente descrito, que generalmente pueden producir de forma estable como máximo de 250 a 300 γ /ml de primicina. En efecto, esta familia precedente proporcionaba también en algunos casos de manera transitoria rendimientos sobresalientes (así, por ejemplo la familia descrita en la patente Hungara número 151.197 proporcionaba también 1.100 γ /ml), pero estos no pudieron ser mante

25

30



nidos de manera estable bajo las condiciones de trabajo. Por el contrario, las variantes obtenidas a partir de la nueva familia por ulteriores tratamientos mutágenos y por selección se mostraron totalmente apropiadas para la producción industrial económica de antibióticos con una capacidad de producción estable de 2.000 a 4.000 γ /ml.

La familia *Thermopolyspora galeriensis* muestra en diversos medios nutrientes colores ampliamente diferentes; dependiendo en parte de la composición del medio nutriente, en parte también de otras influencias o acciones (radiación, agentes químicos, etc) y también de la edad del micelio se pueden observar casi todos los tonos de colores desde el blanco sucio pasando por el amarillo claro y el pardo amarillo hasta el verde oscuro.

Las colonias de cultivo muestran generalmente - en medios nutrientes óptimos - una forma de surcos radiales, que sobresale en forma de cráteres, del tamaño de lentejas y redonda; sin embargo, parcialmente por mutaciones espontáneas, parcialmente por diversas influencias o acciones (por ejemplo por radiación de rayos X o Roentgen) se pueden obtener colonias concéntricamente acanaladas o irregularmente arrugadas. En medios nutrientes insuficientes se obtienen colonias más pequeñas, incluso solo puntiformes.

Cuando se utiliza un medio de inoculación con centrado y grueso, las colonias se reúnen en medios nutrientes óptimos para formar una capa gruesa con surcos.

Sin embargo de manera totalmente independiente de la forma, tamaño y color de las colonias, se obtienen en medios nutrientes apropiados siempre resultados de fer



mentación uniformemente buenos. Para el desarrollo de estos hongos es todavía más favorable una temperatura más alta (37°C) que la generalmente usual (27°C) en los *Streptomyces*, pero bajo ciertas condiciones de trabajo se pueden alcanzar también buenos resultados a 27-28°C.

Los micelios aéreos son finos y delgados, aparecen en ellos ya de forma relativamente temprana (después de 48 horas) las pequeñas esporas características, cuyo número se hace posteriormente muy considerable. Los micelios, dependiendo de la composición del medio nutriente y de la temperatura, pueden ser objeto de lisis después del tercero o cuarto día.

El comportamiento de esta nueva familia de *Thermopolyspora* fué observado en 97 medios nutrientes distintos. Los resultados de estas observaciones fueron reunidos en las siguientes Tablas I a III.

La Tabla I muestra los fenómenos de crecimiento característicos que se pueden observar en los medios nutrientes de identificación denominados de Waksman reconocidos internacionalmente como base para identificación. En la primera columna de la tabla se dan los datos de la variante blanca de *Thermopolyspora galeriensis*, en la segunda columna se dan los datos de una variante verde y en la tercera columna se dan los datos de una variante amarilla.

Se observó continuamente el crecimiento de los microorganismos y las observaciones fueron registradas a diversos intervalos de tiempo, por ejemplo después de 72, 120, 168, 240 y 336 horas de incubación.

TABLA I



Comportamiento de tres variantes de *Thermopolyspora galeriensis* en diversos medios nutrientes. (Serie de Waksman)

I = *Th. galeriensis*, variante blanca

I/1 = *Th. galeriensis*, variante verde

I/2 = *Th. Galeriensis*, variante amarilla

5

	Medio nutriente	Magnitud del crecimiento		
		I	I/1	I/2
10	agar de Czapek	(+)	(+)	(+)
	agar de Asparagina-glucosa	+++	+++	+++
	agar de glicerina	-	-	-
	agar de tirosina	+++	+++	++
	agar de peptona-carne	++++	++++	++++
15	agar de peptona-glucosa	++++	++++	++++
	gelatina-peptona-glucosa	++++	++++	++++
	gelatina-peptona-carne	(+)	(+)	(+)
	gelatina-peptona	(+)	(+)	(+)
20	agar-almidón con manantiales inorgánicos de nitrógeno	(+)	(+)	(+)
	agar-almidón con manantiales orgánicos de nitrógeno	+	+	+(+)
	agar-proteinas o albumina	+	(+)	+
	agar-patata	++++	++++	++++
25	agar-glucosa-patata	++++	++++	++++
	agar NO ₃ -almidón	(+)	+	(+)
	Caldo de cultivo de glucosa	(+)	(+)	(+)
	Caldo de cultivo nutriente	+++	+++	+++
30	Solución de Czapek	-	-	(+)



(Continuación)

	Medio nutriente	Magnitud del crecimiento		
		I	I/1	I/2
	solución de almidón	-	(+)	-
	Extracto de levadura (A)	+++	+++	+(+)
5	Extracto de levadura (B) (Mg + Fe)	++	++	+(+)
	agar-glucosa-levadura	++++	++++	++++
	agar de Emerson	-	-	(+)
	Líquido de maceración de maíz	++++	++	++(+)
10	Medio nutriente de hari- na de soja	++++	++++	++++
	Medio nutriente de lacta to sintético	-	-	-
	Medio nutriente de mala- to de calcio	+	+	+(+)
15	Medio de digestión de celulosa	-	-	-
	Leche de Lakmus	no coagula débil colo ración de rojo	no coagula débil colo ración de rojo	no coagula débil colo ración de rojo
20	gelatina-peptona	se licúa	se licúa	se licúa
	Medio nutriente de ni trato	(+)	(+)	++
	Rodajas de patatas	++++	+++	+
	Rodajas de zanahorias amarillas	(+)	(+)	(+)
25	Medio nutriente de cis- tina	ninguna formación de H ₂ S		

La variante I/1 produjo en cultivo de agar-pep-
tona-glucosa y en rodajas de patatas una coloración o pig-
mentación verde, mientras que a partir de la variante I/2
se produjo una coloración parda en cultivo de agar y tiro-
sina.

30



Explicación de los signos:

	Crecimiento muy bueno	++++
	Crecimiento bueno	+++
5	Crecimiento bueno-medio	++(+)
	Crecimiento medio	++
	Crecimiento malo-medio	+(+)
	Crecimiento malo	+
	Crecimiento muy malo	(+)
10	Ningún crecimiento	-

La influencia de diversos manantiales de nitrógeno sobre el crecimiento de *Thermopolyspora galeriensis* fue investigada substituyendo en el medio nutriente de Czapek-Dox el nitrato presente como manantial inorgánico de nitrógeno por cantidades equivalentes (calculadas sobre el nitrógeno) de los diversos manantiales orgánicos de nitrógeno.

En la siguiente Tabla II se reunieron las propiedades de crecimiento, observadas en medios nutrientes de Czapek-Dox modificados por diversos manantiales orgánicos de nitrógeno, de las tres variantes de *Thermopolyspora galeriensis*. El crecimiento y la producción de coloración o pigmentación de las colonias fueron registrados en diversos momentos del período de crecimiento de la familia (después de 72, 120, 168, 240 y 336 horas).

Tabla II

Crecimiento de las tres variantes de *Thermopolyspora galeriensis* en medios nutrientes que contienen diversos ma-



nantiales de nitrógeno.

	Manantial de nitrógeno	Magnitud del crecimiento		
		I	I/1	I/2
	dl-tirosina	+(+)	++(+)	++
5	uracilo	+	(+)	+
	dl-glutamina	+++	++	++
	dl-fenil alanina	++(+)	++	++
	ácido adenilico	++(+)	++	+(+)
	dl-leucina	++(+)	++	++
10	citosa	+	(+)	+
	Acido timonucleico	(+)	+	++
	Hipoxantina	+	(+)	+
	dl-norleucina	++	++	++
	dl-valina	++(+)	++(+)	++(+)
15	dl-serina	++	++(+)	+++
	l-ornitina	++	++(+)	++
	l-asparagina	++(+)	++	++(+)
	l-cisteina	++	++	++
	sarcosina	(+)	(+)	(+)
20	citidina	++(+)	++	++(+)
	d-alanina	+	+	+(+)
	dl-prolina	+(+)	+	+(+)
	l-treonina	++(+)	++(+)	++
	glicocola	++(+)	++(+)	++
25	l-lisina	++	++	+
	l-arginina	+(+)	+(+)	+(+)
	uridina	+	+	+
	l-histidina	+(+)	++	+(+)
	l-triptofano	+	(+)	+(+)
30	l-citrulina	+(+)	++(+)	+(+)



(Continuación)

Manantial de nitrógeno	Magnitud del crecimiento		
	I	I/1	I/2
ácido dl-alfa-amino-n-butirico	+(+)	++	+(+)
(NH ₄) ₂ SO ₄	+++	+++	++
Acido ribonucleico	++	+	+(+)

Explicación de los signos: (véase Tabla I)

10 La familia I produce en medios nutrientes que contienen l-triptofano una coloración parda.

La variante I/1 produce en varios manantiales de nitrógeno distintos (dl-tirosina, dl-fenil alanina, citidina, l-lisina, l-arginina, sulfato de amonio, etc.)
15 una coloración verde.

La variante I/2 produce en medios nutrientes que contienen l-triptofano una coloración parda.

Para determinar la capacidad de aprovechamiento de carbono de la nueva familia se utilizó un medio nutriente de Czapek que contenía un manantial inorgánico de nitrógeno, cuyo contenido en hidrato de carbono fue susti
20 tuido por cantidades iguales de los hidratos de carbono enumerados en la Tabla III. El crecimiento de los microorganismos fue observado después de una incubación de 72,
25 120, 168, 240 y 336 horas. Los resultados obtenidos están reunidos en la Tabla III siguiente.



TABLA III

Crecimiento de las tres variantes de *Thermopolyspora galeriensis* en diversos manantiales de carbono.

5	Manantial de carbono	Magnitud del crecimiento		
		I	I/1	I/2
	Sacarosa	+	+	+(+)
	glucosa	+	(+)	+
	mannita	+	+	+(+)
10	galactosa	-	(+)	(+)
	sorbosa	-	-	-
	xilosa	-	-	-
	ramnosa	+(+)	+	++
	arabinosa	-	-	-
15	lactosa	-	-	-
	fructosa	-	-	(+)
	maltosa	-	-	-
	ribosa	-	-	-
	glicerina	+	+	+(+)
20	acetato de sodio	(+)	(+)	+(+)
	citrato de sodio	-	-	-
	tartrato de sodio	-	(+)	+(+)
	formiato de sodio	(+)	(+)	(+)

25 Explicación de los signos: (véase Tabla I)

Ya que según la experiencia de los solicitantes, los manantiales inorgánicos de nitrógeno no son generalmente favorables para el desarrollo de *Thermopolyspora galeriensis*, se ha investigado la influencia de diversos hidratos de carbono sobre el crecimiento de esta familia

30



también en presencia de un manantial orgánico de nitrógeno (l-asparagina).

5 Como medio nutriente se utilizó también aquí el medio nutriente de Czapek-Dox, pero cuyo contenido en nitrato de sodio fue sustituido por una cantidad equivalente de L-asparagina y el contenido en sacarosa por cantidades iguales de los diversos hidratos de carbono enumerados en la Tabla III.

10 El crecimiento de los microorganismos fue observado después de incubar durante 72, 120, 168, 240 y 336 horas a 37°C. Los resultados obtenidos fueron reunidos en la siguiente Tabla IV.

TABLA IV

15 Crecimiento de *Thermopolyspora galeriensis* en diversos manantiales de carbono, en presencia de manantiales orgánicos de nitrógeno (L-asparagina)

	<u>Manantial de nitrógeno</u>	<u>Magnitud del crecimiento</u>
	Sacarosa	++++
20	glucosa	++++
	mannita	++++
	galactosa	++
	sorbosa	-
	xilosa	-
25	ramnosa	++++
	arabinosa	-
	lactosa	++++
	fructosa	-
	maltosa	++
30	ribosa	-

(Continuación)



	<u>Manantial de nitrógeno</u>	<u>Magnitud del crecimiento</u>
	glicerina	++++
	acetato de sodio	++++
5	cittrato de sodio	-
	formiato de sodio	+
	tartrato de sodio	+

Explicación de los signos: (Véase Tabla I)

10 La familia *Thermopolyspora galeriensis* es cul-
tivada para la producción de primicina convenientemente
en un medio nutriente que contiene hidratos de carbono,
tales como almidón, o sacarosa como manantiales orgánicos
de carbono, sustancias orgánicas que contienen nitrógeno,
15 tales como harina de soja, suspensión de células de leva-
dura, etc. como manantiales de nitrógeno y parcialmente
como agentes inhibidores de la espuma, y parcialmente tam-
bién como nuevos manantiales de carbono, diversos aceites
y grasas animales o vegetales, o sus componentes, tales
20 como aceite de palma, aceite de girasol, ácido esteárico,
glicerina, etc., y como sales inorgánicas en primer lugar
fosfatos y cloruros alcalinos, y además carbonato de cal-
cio.

25 La fermentación se puede llevar a cabo venta-
josamente a temperaturas entre 27 y 40°C; a las temperatu-
ras superiores que ascienden hasta aproximadamente 37°C,
el crecimiento de los hongos es más rápido y de esta mane-
ra se puede acortar el tiempo de fermentación, pero bajo
ciertas condiciones de trabajo se pueden lograr también a
30 temperaturas de aproximadamente 27-28°C muy buenos resul-



tados y altos rendimientos. La fermentación se efectúa bajo agitación y aireación.

La primicina producida a partir de los microorganismos puede ser aislada a partir del producto de fermentación también según los métodos usuales de extracción, por ejemplo con n-butanol. En el procedimiento según el invento que produce, en comparación con los procedimientos de fermentación hasta ahora usuales, concentraciones mucho más altas en primicina, es sin embargo bastante difícil la utilización de los disolventes orgánicos usuales, ya que la primicina es insoluble en disolventes apolares y en general es difícilmente soluble en disolventes polares. Por ello, para aislar la primicina producida a partir de los micelios, se utiliza más ventajosamente una mezcla binaria o ternaria de disolventes polares, convenientemente por ejemplo alcohol metílico acuoso aproximadamente al 80%. En este caso se procede ventajosamente de la siguiente manera:

El contenido en material activo del líquido de fermentación es precipitado con los micelios a temperaturas superiores, aproximadamente entre 70 y 90°C, a partir de un medio débilmente ácido (pH = 5 a 7), el antibiótico es extraído después a partir del precipitado húmedo obtenido, por cocción o ebullición con una mezcla de disolventes polares, convenientemente con un alcohol acuoso, por ejemplo con metanol al 80%. El producto bruto de gran actividad antibiótica puede ser aislado entonces por concentración de esta mezcla de disolventes. La primicina, según es conocido, es termoestable, y, por ejemplo, en un medio acuoso con una cocción de 10 horas, no muestra nin-



guna pérdida de actividad; el material activo no es des-
compuesto por lo tanto al hervir el líquido de fermenta-
ción, sino que se separa adsorbido en los micelios desna-
turalizados por la cocción y en las otras proteínas pre-
sentes. El precipitado obtenido de esta manera y que con-
tiene el antibiótico en estado adsorbido, es separado en-
tonces por filtración o centrifugación. El líquido flotan-
te contiene solo cantidades insignificantes (de 2 a 20
5 γ /ml) de la primicina y puede ser desechado. El micelio
húmedo es hervido entonces ventajosamente con metanol acuo-
so, con lo que casi todo el contenido en material activo
pasa a la solución. La solución separada del precipitado
es concentrada entonces en vacío, separándose espontánea-
mente la primicina bruta, mientras que las impurezas solu-
bles en agua permanecen en su mayor parte en las aguas ma-
dres acuosas y pueden ser eliminadas por filtración en va-
cío fácilmente de la primicina separada. De esta manera,
se obtiene un producto bruto relativamente puro con alta
actividad antibiótica (40 a 70% de contenido en primicina)
15 con muy buen rendimiento (70 a 90% de la actividad anti-
biótica del líquido de fermentación).

La ulterior purificación del producto bruto
obtenido de la manera anterior y la obtención de la primi-
cina con una pureza de 100% se pueden llevar a cabo según
25 los métodos descritos en las memorias de patentes húngaras
números 146.332 (1958) y 151.197 (1963, patente de adición
a la patente húngara 146.332). Según estos métodos la pri-
micina es liberada en solución alcohólica-acuosa de las
proteínas solubles en alcohol por precipitación con sales
de plomo, las impurezas del tipo de pigmento todavía pre-
30



tes son adsorbidas con ayuda de una mezcla de carbón acti
vo con un agente de desprendimiento sólido químicamente
inerte de gran superficie específica (polvo de celulosa,
medio de filtración "Hyfllo", carbonato de calcio preci-
5 pitado, etc), y la primicina es aislada de manera conoci-
da a partir de la solución ya pura.

La preparación de primicina según el invento
por fermentación de la nueva familia de microorganismos y
el aislamiento de la primicina bruta a partir del líquido
10 de fermentación se ilustran más aun con ayuda de los si-
guientes ejemplos.

Ejemplo 1.

15 Fermentación de Thermopolyspora galeriensis en el
laboratorio.

Para la producción del medio de inoculación
se utiliza el siguiente medio nutriente: harina de soja,
2,0%; fécula de patata 2,0%; carbonato de calcio 0,5%;
cloruro de sodio 0,3%; fosfato de potasio y dihidrogeno
20 0,1%; aceite de palma 0,5%; pH antes de la esterilización
8,5.

El medio nutriente preparado con la anterior
composición es calentado durante 24 minutos en un autocla
ve bajo 1,5 atmósferas, después se inoculan en matraces
25 de Erlenmeyer de 500 ml, porciones de 100 ml del medio
nutriente con una suspensión de esporas y micelios de la
familia Thermopolyspora galeriensis y se agita a 27°C en
una mesa agitadora de 5 cm de longitud de recorrido duran
te 48 a 60 horas.

30 Con el medio de inoculación preparado de esta



manera se inocula entonces un medio nutriente de producción con la siguiente composición: harina de soja 4,0%; fecula de patata 4,0%; carbonato de calcio 0,5%; cloruro de sodio 0,3%; fosfato de potasio y dihidrógeno 0,1%;
5 aceite de palma 0,5%; ácido esteárico 0,3%; pH antes de la esterilización 8,8.

El medio nutriente preparado con la anterior composición es calentado durante 25 minutos en autoclave bajo 1,5 atmósferas, y después es distribuido en cantidades de 30 a 35 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml, y es
10 mezclado con 1 a 5% del medio de inoculación obtenido de la manera anterior. Los matraces son agitados a 28°C durante 97 a 120 horas. El contenido en primicina del producto de fermentación obtenido puede ser determinado por
15 mediciones biológicas.

Ejemplo 2.

Fermentación industrial de *Thermopolyspora galeriensis*.

20 Se prepara primeramente un medio de inoculación previa sobre un medio nutriente con la siguiente composición: harina de soja 4,0%; almidón de patata 4,0%; carbonato de calcio 0,5%; cloruro de sodio 0,3%; fosfato de potasio y dihidrogeno 0,1%; aceite de palma 0,5%; pH an
25 tes de la esterilización 8,5.

El medio nutriente es esterilizado durante 25 minutos en autoclave bajo 1,5 atmósferas, y después es distribuido en porciones de 100 ml en matraces Erlenmeyer, es inoculado con una suspensión de esporas o micelios de
30 la familia *Thermopolyspora galeriensis*, y se agita a



27°C durante 48 a 60 horas. El medio de inoculación previa obtenido de esta manera es llevado entonces a un medio nutriente de inoculación con la siguiente composición: harina de soja 4,0%; fecula de patata 4,0%; carbonato de calcio 0,5%; cloruro de sodio 0,3%; fosfato de dihidrogeno y potasio 0,1%; aceite de palma 1,0%; pH antes de la esterilización 8,8.

Después de esterilizar durante una hora entre 1,3 y 1,5 atmósferas, el anterior medio nutriente es mezclado en un fermentador de 100 litros de capacidad útil con 1 a 5 volúmenes % del medio de inoculación previa precedente y es incubado a 27°C durante 48 a 60 horas, agitando a 250 rpm. y con aireación. El cultivo obtenido de esta manera es utilizado entonces como medio de inoculación para la fermentación de producción.

Este es transferido a un fermentador de hierro o de acero inoxidable con una capacidad útil de 1 m³. En este fermentador se introduce un medio nutriente con la siguiente composición: harina de soja 4,0%; fecula de patata 4,0%; carbonato de potasio 0,5%; cloruro de sodio 0,3%; fosfato de potasio y dihidrogeno 0,1%; aceite de palma 0,6%; ácido esteárico 0,3%; pH antes de la esterilización 8,8 a 9,0.

El medio nutriente precedente es esterilizado durante una hora entre 1,3 y 1,5 atmósferas, y después es mezclado con 10 volúmenes % del medio de inoculación precedente. La fermentación se continua a 27°C durante 96 a 120 horas bajo continua agitación (al menos de 250 rpm) y aireación (al menos de 1:1).



Ejemplo 3.

Obtención de la primicina bruta a partir del producto de fermentación obtenido en el laboratorio.

5 El líquido de fermentación obtenido según el ejemplo 1, cuyo contenido en material activo determinado por valoración, era de 520 a 530 γ /ml (este contenido en material activo corresponde, calculado sobre un cultivo para agitación de 10 litros, a un contenido total en primicina pura de 5,2 g) fué ajustado a un pH de 5 a 6 con
10 H_2SO_4 1-N y fue calentado hasta 70°C para desnaturalizar los micelios. Los micelios separados, que también contenían adsorbida la cantidad predominante del contenido en material activo, fueron separados por centrifugación. El líquido flotante contenía solamente 11 γ /ml de antibiótico
15 (2,1% de la actividad antibiótica total producida) y por ello pudo ser desechado.

El precipitado húmedo fue calentado 6 veces en un baño de agua cada vez durante una hora con porciones de 1,5 litros de metanol al 80%, y fue separado de
20 nuevo por centrifugación. En este caso el antibiótico fue extraído en las fases metanólicas; los extractos metanólicos reunidos (de los cuales los dos últimos extractos, que ya no contienen casi primicina, pueden ser desechados sin pérdida esencial de material activo) fueron inoculados en vacío hasta un volumen total de 1,25 litros, el
25 producto bruto separado fue filtrado con succión y fue secado en vacío a 40°C. Se obtuvieron 10,6 g de primicina bruta; el producto bruto mostró en la medición biológica 41% de actividad antibiótica y contenía por lo tanto 4,35
30 g de primicina pura. El rendimiento, calculado sobre el



contenido total en primicina de 5,2 g, del producto de fermentación era por lo tanto de 84%. Las aguas madres mostraron todavía 5% de contenido en primicina.

Ejemplo 4.

5

Obtención de la primicina bruta a partir del producto de fermentación industrial.

El líquido de fermentación total (1 m³) obtenido según el Ejemplo 2, cuyo contenido en primicina determinado por valoración era de 1600 γ /ml, fue calentado entre 80 y 90°C y después fue filtrado en caliente a un pH = 6 a 7. El filtrado que mostraba sólo una insignificante actividad antibiótica (10 γ /ml), fué desechado y la masa de micelios que contenía 70% de humedad, con un peso total de 124,6 kg y un contenido total en primicina de 1,6 kg, fué tratada ulteriormente en dos porciones.

10

15

(a) La primera porción, que mostraba un peso total de 61,2 kg, del precipitado húmedo fue mezclada con 250 litros de metanol al 80%, fue hervida y fue agitada durante 3 horas. La fase líquida fue separada entonces por filtración; el filtrado obtenido (240 l) mostraba una actividad biológica de 2860 γ /ml, correspondiente a un contenido en primicina de 287 g de primicina pura (43% de la actividad total del líquido de partida).

20

25

(b) La segunda porción, que mostraba un peso total de 63,4 kg, de la precedente masa de micelios húmeda fue concentrada con la masa de micelios obtenida en (a), ya extraída de manera similar, pero hirviendo con 400 l de metanol al 80%. La solución metanólica de 430 litros separada por filtración mostraba una actividad antibiótica

30



de 2000 γ /ml, por lo tanto un contenido total de 860 g de primicina pura (54%).

(c) El precipitado húmedo de 80 kg remanente después de la segunda extracción fue hervido de nuevo con otros 400 l de metanol al 80%. El filtrado de 300 l obtenido tenía una actividad antibiótica de 50 γ /ml, y contenía por lo tanto ya solamente 16,5 g de primicina pura (1,03%). En estos tres extractos se obtuvo por lo tanto el 98% de la actividad antibiótica total del producto de partida; el tercer extracto metanólico obtenido en la extracción (c) pudo ser ya desechado a causa de su bajo contenido en antibióticos.

Los extractos (a) y (b) fueron reunidos y la solución metanólica acuosa de 670 litros así obtenida fue concentrada en vacío entre 40 y 45°C hasta un volumen de 9l litros, fue enfriada hasta + 6°C y fue dejada reposar durante 20 horas. La primicina bruta separada fue filtrada con succión en vacío. Estas aguas madres mostraron una actividad antibiótica de solamente 40 γ /ml.

El producto bruto separado por filtración fue secado en vacío a 40°C hasta peso constante. Se obtuvieron 1,93 g de primicina bruta, cuya actividad determinada por medición biológica correspondía a un contenido de 1,25 kg de primicina pura. El rendimiento calculado sobre la actividad antibiótica del producto de fermentación directo era por lo tanto de 78,3%.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Hungría, el 20 de Octubre de 1.965, bajo el número CI-577, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

5 1.- Un procedimiento para la preparación de primicina, caracterizado porque se cultivan microorganismos de la familia *Thermopolyspora galeriensis* o sus derivados, variantes o mutantes en un medio nutriente que contiene manantiales orgánicos de carbono, manantiales orgánicos de nitrógeno, sales inorgánicas y ventajosamente
10 grasas, aceites, alcoholes grasos y ácidos grasos naturales y/o sintéticos, en un cultivo agitado y aireado, y por que después de alcanzar una concentración adecuada en material activo se aísla desde el medio de fermentación
15 la primicina bruta producida.

 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en el medio nutriente utilizado para la producción de primicina se utilizan hidratos de carbono, convenientemente almidón y/o azúcar como manantiales de carbono, materiales naturales o sintéticos que
20 contienen nitrógeno, convenientemente amino-ácidos, bases orgánicas, amidas de ácido, harina de soja, líquido de maceración de maíz como manantiales de nitrógeno, y fosfatos, nitratos, cloruros y/o carbonatos como sales inorgánicas.
25



3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque al medio nutriente se añaden aceite de palma y/o ácido esteárico.

5 4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo entre 27 y 40°C con valores de pH de 6 a 9.

16 5.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se precipita la primicina producida con los micelios, a un pH = 5 a 7 por calentamiento del líquido de fermentación, y se extrae el antibiótico por cocción de la masa de micelios húmeda con una mezcla de disolventes polares, convenientemente con metanol acuoso.

15 6.- Un procedimiento para la preparación de primicina.

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

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

Madrid,

2 DIC. 1966

P. A.

Alberto de Ezaburu
for Poder