

P-33.877

S 4941-Z 1869
227/6/Km



334579

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

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

formulada el 16 de diciembre de 1966, bajo el nº 334.579

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD, entidad checoslo-
vaca, establecida en Praga, Checoslovaquia, por:

"METODO DE PREPARACION DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE UN
NUEVO ANTIBIOTICO FUNGICIDA".

=====

El objeto de la presente invención es un método
para preparar un cultivo para la producción de un nuevo an-
tibiótico fungicida.

De entre los antibióticos fungicidas se han veni-
do usando especialmente hasta ahora dos preparaciones pro-
ducidas por fermentación. Una de ellas, la fungicidina, es
5 producida por el actinomiceto *Streptomyces noursei* (patente
EE.UU. 2.797.183); la segunda, griseofulvina, es producida
por el hongo *Penicillium griseofulvum* (patente británica
10 784.618). Ambas preparaciones se aplican principalmente por



vía bucal; para su aplicación externa, las formas apropiadas de fungicidina se producen en forma de unguento o polvo de talco. En vista de esta situación, y del peligro, bien reconocido, de formación de microorganismos patógenos resistentes, el problema de obtener nuevos antibióticos fungicidas es aún muy tóxico. Una de las nuevas posibilidades de obtener tal antibiótico es el método descrito en la presente invención.

Según la invención, un cultivo sumergido para producir el nuevo antibiótico fungicida se prepara como sigue: se cultiva un cultivo puro del basidiomiceto *Oudemansiella mucida*, en un cultivo sumergido, a de 15 a 30°C durante de 6 a 8 días, en un medio líquido de crecimiento que contiene, como fuentes de carbono y nitrógeno asimilables, carbohidratos, lípidos, aminoácidos, sales amónicas, nitratos, o materias primas que contengan tales compuestos; y como sales minerales nutritivas, sulfatos, cloruros, fosfatos, yoduros, boratos y/o carbonatos de calcio, sodio, potasio o magnesio, cinc, cobre, cobalto, manganeso, hierro ferroso o férrico. Las fuentes asimilables de carbono y nitrógeno se aplican convenientemente en concentración de hasta 15%, y las sales en concentración de hasta 5%, referido al peso del medio nutritivo.

El antibiótico producido por el anterior basidiomiceto no se ha aislado todavía en forma químicamente pura. Sin embargo, se puede usar un concentrado del antibiótico para aplicación contra las micosis de la piel. 1 μ g del cual contiene aproximadamente de 30 a 50 unidades de actividad de fungicidina. Una solución apropiadamente concentrada de este extracto, en un disolvente orgánico adecuado, se puede usar directamente, externamente, contra diversas micosis de la piel.



En este tipo de aplicación, la preparación no tiene efectos tóxicos ni secundarios. El concentrado aceitoso es muy estable al calor, y su actividad antibiótica no disminuye ni siquiera después de 30 min a 100° C. Su solución en éster etílico u otro disolvente orgánico adecuado presenta unos picos de absorción específicos en la región ultravioleta, a 205, 211, 223, 229, 237, 284, 292, 299 y 312 m μ (+ 1 m μ), habiéndose establecido que los picos son debidos a la presencia del compuesto activo.

El espectro obtenido muestra que la sustancia activa no es idéntica a ninguno de los antibióticos fungicidas descritos hasta ahora.

El organismo que produce el nuevo antibiótico según la invención es el basidiomiceto *Oudemansiella mucida* (Schrad. ex Fr) Höhn, siendo sus sinónimos, según Singer (R. Singer: Los agaricales en la moderna taxonomía. Ed. J. Cramer, Weinheim, 1962): *Armillaria mucida* Kummer, *Collybia mucida* QuéL., *Lepiota mucida* Schröter, *Mucidula mucida* Pat. Pertenece al orden de los agaricales, familia de las agaricáceas, subfamilia de las collybioideas. El aspecto y la existencia de su cuerpo natural fructífero ha sido descrito por Singer y por Cartwright y Findlay (K.S.G. Cartwright y W.P.K. Findlay: Descomposición de la madera y su prevención, His Majesty's Stationery Office, Londres, 1964).

Se puede obtener un cultivo puro de laboratorio por trasplante estéril de un cuerpo natural fructífero, e incubando el trasplante en un medio de agar inclinado. El cultivo puro crece en agar de mosto de cervecería, en forma de un micelio blanco parecido a algodón-lana, que es -



5 asporogénico (que no produce esporas), forma montones e hifas ramificadas y partidas de 2 a 5 de espesor. En algunos casos, el cultivo puro da como resultado la formación espontánea de cuerpos fructíferos que alcanzan casi siempre menores tamaños que los naturales.

Método de producción de antibióticos.- El método de preparación aquí inventado transcurre partiendo de un cultivo inclinado de agar, que se usa para inocular un medio nutritivo en frascos agitadores. Los cultivos líquidos que aquí se hacen crecer se usan para inocular un medio de crecimiento en un depósito de inoculación, desde el cual se transfiere un inóculo a un medio de fermentación en un depósito de producción. De otra forma, el basidiomiceto *Oudemansiella mucida* se puede hacer crecer en un cultivo superficial. Teóricamente se podría obtener el antibiótico del hongo obtenido por recolección en campo de individuos que crecen en estado salvaje, pero este método está fuera de consideración para explotación industrial. Es más ventajoso aplicar una cultivación sumergida, según el método anterior.

El medio de crecimiento contiene una fuente de carbono asimilable y nitrógeno, orgánico o inorgánico, sales minerales nutritivas, y trazas de los diversos metales presentes principalmente como impurezas en los otros componentes del medio de crecimiento. Como fuente de carbono asimilable se pueden usar lípidos (aceites vegetales o animales), diversos políoles (por ejemplo glicerina), carbohidratos asimilables (por ejemplo glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, dextrina, almidón ordinario o soluble, derivados solubles de la celulosa), y otros carbohidratos



o sustancias que contienen carbohidrato, solubles en agua o al menos parcialmente solubles (por ejemplo melazas, mosto de cervecería, hidrol, etc.), Como fuente de nitrógeno asimilable se pueden usar diversos compuestos tales como aminoácidos o sustancias que contienen aminoácidos, por ejemplo caseína (también hidrolizada), harina de pescado, harina de soja, extractos de carne, peptona, residuos de alambique, levadura (también extractos o autolizados), líquido de maceración de grano, y otros compuestos nitrogenados de origen animal o vegetal. Además, como fuentes de nitrógeno se pueden usar diversos compuestos químicos que contienen nitrógeno de amonio, amina, amida, nitrato o nitrito. Se recomienda añadir diversas sales minerales tales como las de sodio (por ejemplo cloruro), calcio (por ejemplo carbonato), magnesio (por ejemplo sulfato), fosfatos, etc. El pH del medio de fermentación se fija, antes de la esterilización, entre 3 y 7, pero es mejor que esté comprendido entre 5,5 y 6,0. La fermentación puede transcurrir a temperaturas de 15 a 30°C, mejor de 18 a 25°C.

El desarrollo de un cultivo sumergido es más lento que con actinomicetos o con penicilios. El crecimiento máximo se alcanza usualmente al cabo de 5 a 6 días, y la fermentación se detiene después de 6 a 8 días, cuando es máxima la producción del antibiótico. Los valores del pH durante la fermentación cambian según la edad del cultivo y la concentración de la fuente de carbono empleada. Para un valor inicial del pH igual a 5,5 se observa una disminución de 5,0 a 4,7 durante los tres primeros días, seguida por una elevación gradual hasta el valor final de 6 a 7,5. La actividad antibiótica de las muestras de fermenta-



ción aumenta solo lentamente durante los 3 o 4 primeros días, tras lo cual sigue una rápida elevación, hasta el valor final de 10.000 a 70.000 unidades de fungicidina por ml; entonces cesa el procedimiento de fermentación.

5 La intensidad de aireación varía entre 0,5 y 2 litros de aire por litro de medio de crecimiento por minuto, sin ningún efecto sustancial sobre la producción de antibiótico.

La invención se puede aplicar en la práctica según los siguientes ejemplos, sin limitarse exclusivamente a estos ejemplos. La actividad del antibiótico producido se determinó mediante titulación microbiológica por difusión en placa, con la cepa *Candida albicans* SEU, usando fungicidina como norma de referencia, y se expresa en unidades de fungicidina por ml de medio de fermentación.

Ejemplo 1

Se trasplanta un bloque de tejido micelial de un cuerpo natural fructífero del basidiomiceto *Oudemansiella mucida*, usando un escalpelo estéril. Se transfiere a un tubo de ensayo con un medio inclinado de agar y mosto de cervecería, y se incuba a de 20 a 25°C. Después del crecimiento, el cultivo micelial se inocular de nuevo en tubos con medios inclinados de agar y mosto de cervecería.

25 Después de 10 días de crecimiento, los cultivos se mantienen en una nevera a + 4°C, y, cuando es necesario, se usan como inóculo para inocular frascos, o para nuevas inoculaciones en medios sólidos de agar.

Ejemplo 2

30 Se ponen en un fermentador de 50 litros 28 litros del si-



guiente medio de fermentación:

Glucosa	3%
Líquido de maceración de grano (50% peso en seco)	1,5%
Sulfato de magnesio cristalino	0,15%

5 El pH se ajusta a 5,5, y la esterilización se efectúa durante 60 min en vapor de agua que circula, y durante 60min a 120°C. Después de enfriar hasta 23°C, el fermentador es inoculado con un total de 1200 ml de cultivo sumergido de *Oudemansiella mucida*, procedente de tres
10 matraces Erlenmeyer de 2 litros que contienen, cada uno, 400 ml del mismo medio, previamente incubado durante 120 horas en un agitador alternativo. El cultivo del depósito de inoculación es aireado con 0,7 volúmenes de aire por volumen de medio de fermentación por min, y se agita durante
15 96 horas. Luego se usa para inocular el depósito de fermentación de producción, de 1000 litros de capacidad, que contiene 700 litros del siguiente medio:

Glucosa	5%
Líquido de maceración de grano (50% peso en seco)	2%
20 Sulfato de magnésio cristalino	0,15%

El pH se ajusta, antes de esterilizar, a 5,5. La fermentación transcurre durante 168 horas a 23±1°C, con una intensidad de aireación de 0,7 volúmenes de aire por volumen de medio por min, y 400 rpm del agitador. Después de un
25 primer descenso del pH, hasta 4,7, sigue un aumento hasta 6,4. La actividad antibiótica final del medio de fermentación es igual a 58.000 unidades de fungicidina por ml.

Ejemplo 3

Un fermentador de producción, de 1000 litros, se
30 llena con 700 litros del medio siguiente:



Glucosa	2%
Harina de soja	3%
Melazas	0,6%

5 El valor del pH se ajusta a 5,5, antes de esterilizar. La esterilización, inoculación y cultivo transcurren como en el Ejemplo 2. Al cabo de 144 horas, la concentración de antibiótico llega a un valor de 65.000 unidades de fungicidina por ml.

Ejemplo 4

10 Un fermentador de producción, de 1000 litros, se llena con 700 litros del medio siguiente:

Glucosa	6%
Líquido de maceración de grano (50% peso en seco)	1%
Nitrato amónico	0,2%
15 Sulfato de magnesio cristalino	0,15%

El pH se ajusta a 5,5, antes de esterilizar. La esterilización, inoculación y cultivo transcurren como en el Ejemplo 2. Al cabo de 144 horas, la concentración de antibiótico llega a 70.000 unidades de fungicidina por ml.

20 Ejemplo 5

Un fermentador de 1000 litros se llena con 700 litros del siguiente medio:

Sacarosa	2%
Almidón soluble	1%
25 Dextrina	1%
Residuos de alambique	0,5%
Fosfato amónico secundario	0,2%
Sulfato de magnesio cristalino	0,15%
Cloruro sódico	0,2%
30 Carbonato cálcico	0,2%



El pH se ajusta a 5,5 antes de esterilizar. La esterilización, inoculación y cultivo transcurren como en el Ejemplo 2. Al cabo de 168 horas, se llega a una concentración de antibiótico de 60.000 unidades de fungicidina por ml.

5

Ejemplo 6

La fermentación transcurre como en el Ejemplo 5, pero la sacarosa es sustituida por 2% de glicerina. Bajo estas condiciones, se llega a una concentración de antibiótico de 56.000 unidades de fungicidina por ml.

10

Ejemplo 7

Un fermentador de 1000 litros se llena con 700 litros del medio siguiente:

	Glucosa	3,0%
	Asparagina	0,25%
15	Alanina	0,01%
	Tartrato amónico	0,05%
	KH ₂ PO ₄	0,1%
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05%
	CaCl anhidro	0,025%
20	NaCl	0,001%
	Trazas de Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , H ₃ BO ₃ , KI, vitamina B ₁ , B ₂ , B ₆ , nicotinamida, pan totenato cálcico.	

El pH se ajusta a 5,8. La esterilización, inoculación y cultivo transcurren como en el Ejemplo 2. Al cabo de 144 horas, el líquido de fermentación contiene una actividad antibiótica igual a 15.000 unidades de fungicidina por ml.

25

Ejemplo 8

La fermentación se efectúa como en el Ejemplo 7, pero la asparagina es sustituida por ácido glutámico, y la

30



alanina por glicina. Bajo estas condiciones, la actividad antibiótica del líquido de fermentación, al cabo de 144 horas, es igual a 14.600 unidades de fungicidina por ml.

5 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Checoslovaquia, con fecha 17 de diciembre de 1965, bajo el nº P.V. 7592-65, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

10 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:

15 1º.- Método de preparación de cultivo para la producción de un nuevo antibiótico fungicida, caracterizado por un cultivo sumergido, a de 15 a 30°C, de un cultivo del basidiomiceto *Oudemansiella mucida* (Schrad. ex Fr.) Höhn, en un medio líquido de crecimiento que contiene, como fuentes de carbono y nitrógeno asimilables, carbohidra-
20 tos, lípidos, polioles, aminoácidos, sales amónicas o nitratos, o materias primas que contienen tales compuestos; y, como sales minerales nutritivas, cloruros, sulfatos, fosfatos, yoduros, boratos y/o carbonatos de calcio, sodio, potasio, magnesio, cinc, cobre, cobalto, manganeso,
25 hierro férrico o ferroso.



2º.- Método según la reivindicación 1, caracterizado por emplear fuentes de carbono y nitrógeno en concentraciones de hasta 15%, y sales nutritivas en concentraciones de hasta 5% (en peso/volumen).

5 3º.- Método de preparación de cultivo para la producción de un nuevo antibiótico fungicida.

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

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

Madrid,

15 ABR. 1967

P.A.

Alberio de E...
por F...

17-3-1967

IAG/