

405792



Int. Cl. C12P 35/06// (C12P 35/06, C12R 4:745)

405792

F.P. 23-11-74

Int. Cl. C12D

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ALFA FARMACEUTICI, S.p.A.

RESIDENCIA: Via Ragazzi del '99 N. 5, 40133, BOLOGNA,
Italia.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE
CEFALOSPORINA G.

Prioridad: Patente británica n.º 38149 del 13-8-71



11
405792

1 Esta invención se refiere a mejoras en y rela--
cionadas con la producción de Cefalosporina C y más concre-
tamente, se refiere a la producción de Cefalosporina C me-
diante utilización de un nuevo microorganismo, denominado
5 Cephalosporium Sp, variedad F. 12.

La Cefalosporina C es un valioso material anti-
biótico, dado que es activa tanto contra bacterias Gram po-
sitivas como Gram negativas y es simultáneamente estable a
los ácidos y resistente a la penicilinas. La Cefalospori-
na C está ampliamente descrita en la bibliografía, por -
ejemplo en el trabajo titulado "The Cephalosporins" (E.P.
Abraham, Pharmacological Reviews, Vol. 14, 1962, páginas -
477-500). En la práctica, la Cefalosporina C no es utiliza-
da per se como antibiótico en el tratamiento de enfermeda-
des infecciosas causadas por bacterias Gram positivas y Gram
15 negativas, puesto que su actividad es relativamente baja;-
así, su actividad in vitro frente a una serie de bacterias
Gram positivas es solo de un 0,1% de la correspondiente a
la bencilpenicilina. Sin embargo, la Cefalosporina C se -
20 utiliza como material de partida en la preparación de un -
buen número de las llamadas "Cefalosporinas semisintéticas",
algunas de las cuales han encontrado una considerable apli-
cación como antimicrobianos de amplio espectro. En conse-
cuencia, la Cefalosporina C es por sí misma, un producto -
25 de interés.

La Cefalosporina C se prepara cultivando varias -
especies de Cephalosporium, bajo condiciones adecuadas y,-
además de Cefalosporina C, se producen otros materiales an-
tibióticos, denominados Cefalosporina N y Cefalosporina P.
30 Cefalosporina P es el término utilizado para designar a una



405792

11. AGO

1 familia de compuestos esteroidicos que tienen cierta actividad antibacteriana frente a gérmenes Gram positivos; Cefalosporina N (Penicilina N), es un compuesto penicilánico que contiene una cadena lateral de alfa-aminoadipilo.

5 Las propiedades físicas de Cefalosporina C y Cefalosporina N son muy similares, por lo que es muy difícil purificar la Cefalosporina C separándola de la Cefalosporina N. Es sin embargo, muy deseable reducir la cantidad de Cefalosporina N formada durante el proceso de cultivo del
10 microorganismo, por ejemplo, seleccionando los nutrientes con el medio de cultivo, de forma que la Cefalosporina C se pueda producir en una cantidad relativamente alta y lo más alta posible con respecto a otros materiales antibióticos.

15 Sin embargo, los microorganismos conocidos que se usan en la producción de Cefalosporina C, por ejemplo, la variedad Brotzu original, producen Cefalosporina N en cantidades relativamente grandes, en general, la velocidad de producción del producto final deseado, la Cefalosporina
20 C, es frecuentemente baja. Así, por ejemplo, se describe en la Patente estadounidense No. 3.082.155 un proceso de producción de Cefalosporina C en el que se utiliza un mutante de Cephalosporium Sp ATCC 14553, pero, bajo las mejores condiciones de fermentación descritas, el rendimiento de Cefalosporina C es de sólo 500 microgramos por mililitro.

25 Se ha encontrado ahora, de acuerdo con la presente invención, que la Cefalosporina C puede producirse mediante cultivo de un nuevo microorganismo, denominado
30 Cephalosporium Sp, variedad F. 12, y que este microorganism-

405792



1 mo es capaz de producir Cefalosporina C con rendimientos -
altos mientras que, al mismo tiempo, da bajos rendimientos
de Cefalosporina N.

5 Por lo tanto, dicho de manera general, la presen
te invención proporciona un proceso para la producción de -
Cefalosporina C, consistente en cultivar el microorganismo
Cephalosporium Sp, variedad F.12, bajo condiciones aerobias
en un medio nutriente que contiene fuentes asimilables de car
bono y nitrógeno, una o más sales inorgánicas y una fuente or
gánica de azufre.

10 El Cephalosporium Sp variedad F.12 es un mutante
de Cephalosporium Sp ATCC 11550 que ha sido depositado en -
la American Type Culture Collection bajo la denominación de
acceso ATCC 20339 y en el Centraalbureau voor Schimmelcultu
res, Baarn, Netherlands, bajo el núm. de acceso CBS 535.71.

15 El Cephalosporium Sp variedad F. 12, tiene las
siguientes características generales:

20 Cuando se hace crecer en un medio sólido, por
ejemplo Sabouraud, avena-agar, Bennet, patata-agar y medio
Waksman, el microorganismo muestra colonias de poco espesor,
brillantes y redondeadas que tienen borde continuo o lige-
ramente irregular, con micelio vegetativo incoloro o amari-
lento. El color, cuando lo hay, puede difundirse al medio.
25 No hay crecimiento aéreo y no se forman conidios ni conidio
foros. Cuando crece en algunos medios, como por ejemplo me
dio Bennet, el micelio muestra clamidosporas terminales o -
intercaladas. La superficie de la colonia muestra muchas -
arrugas radiales que pueden ser o no ramificadas. Las hifas
son tabicadas, generalmente ramificadas y a veces muestran
30 pequeñas gotas de grasa. La variedad no utiliza nitratos -

405792 11



1 como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.

El proceso, de acuerdo con la presente invención, puede llevarse a cabo convenientemente en cultivo aerobio sumergido, preferiblemente a temperatura entre 20 y 30^o C.

5 La fuente de carbono asimilable en el medio nutriente para el microorganismo es convenientemente un carbohidrato, que puede ser un monosacárido, disacárido o polisacárido. Ejemplo de carbohidratos adecuados son: glucosa, sacarosa, galactosa, lactosa, fructosa, manitol, sorbitol, dextrina, almidones soluble e insoluble y melazas de remolacha. Los carbohidratos están convenientemente en el medio nutriente en forma de mezcla de monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; la concentración adecuada de carbohidratos en el medio nutritivo está entre el 2% y el 10% en peso.

15 Es preferible que el medio nutritivo contenga también un glicérido o glicérido hidrolizado tal como por ejemplo, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de girasol, aceite de coco, aceite de palma, aceite de linaza, aceite de maiz, aceite de grasa de cerdo y ácidos grasos saturados e insaturados y sus ésteres correspondientes (o ésteres parciales) con alcoholes inferiores monohídricos y polihídricos. Particularmente, los glicéridos o hidrolizados de los mismos preferidos, utilizados de acuerdo con la presente invención son, aceite de grasa de cerdo, aceite de girasol, aceite de maiz, ácido oléico, ácido ricinoléico, ácido linólico, ácido linoléico, y ácido araquidónico. Los ésteres de ácidos grasos insaturados que se prefieren en particular y que pueden usarse de acuerdo con la invención, son, linoleato de metilo, mono-oleato de glicerilo, mono-



1 oleato de polietilenglicol y di-oleato de polietilenglicol.
El glicérido o su producto de hidrólisis está preferible--
mente presente en el medio nutritivo en cantidad que osci-
la entre el 1% y el 8% en peso. Parece ser que tales produc-
5 tos, especialmente los ésteres de ácidos grasos insatura- -
dos, sirven para inhibir la producción de productos secunda-
rios y estimular la formación de Cefalosporina C.

El medio nutritivo utilizado en el proceso de -
esta invención, contiene también una fuente orgánica de -
10 nitrógeno, que está preferentemente en cantidad adecuada -
para proporcionar del 0,01% al 0,1% de nitrógeno disponi-
ble, basado en el peso del medio. La fuente de nitrógeno -
orgánico conviene que sea una proteína vegetal o animal, o
un producto de degradación o hidrólisis de las mismas, tal
15 como un polipéptido, peptona, triptona o aminoácido. Las -
fuentes de nitrógeno orgánico preferidas incluyen el mate-
rial proteínico procedente de polvo de semillas de algodón,
polvo de carne de pescado, polvo de carne, polvo de maiz,
polvo de trigo, polvo de leguminosas, (por ejemplo, polvo
20 de soja, polvo de guisante o cacahuete), extractos de leva-
dura, extractos de carne y productos secundarios proceden-
tes de la industria de fermentación alcohólica y productos
de degradación del maiz.

El medio nutritivo utilizado en el proceso de -
25 esta invención contiene también como mínimo una sal inorgá-
nica destinada a mejorar la biosíntesis de Cefalosporina C,
tal como, por ejemplo, carbonato cálcico, borax, acetato -
amónico, sulfato amónico o un fosfato de metal alcalino. -
Estas sales inorgánicas están preferiblemente presentes en
30 el medio nutritivo en cantidad que oscila entre 0,5% y 1,5%

405792

11 MAR 1954



1 en peso.

Tal como se estableció anteriormente, el medio nutritivo contiene una fuente orgánica de azufre, especialmente metionina, que está preferiblemente presente en el medio a una concentración que oscila entre un 0,5 % y el 2,5% en peso.

Otros compuestos orgánicos que contienen azufre y que pueden ser utilizados como fuente de azufre son por ejemplo los que tienen la fórmula:



en donde R^1 , R^2 y R^3 son iguales o diferentes y cada uno de ellos es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo conteniendo de 1 a 5 átomos de carbono y uno de los X e Y es un átomo de azufre y el otro de los X e Y es un átomo de azufre o un átomo de oxígeno. Ejemplos de tales compuestos incluyen ácido tioglicólico, ácido tioacético, tioglicolato de metilo y tioacetato de metilo. Tales fuentes de azufre están adecuadamente presentes en el medio de cultivo en cantidades que van del 0,05% al 1% en peso. Vale la pena notar que el cultivo del Cephalosporium Sp, variedad F. 12, requiere la presencia de una fuente orgánica de azufre, mientras que otras especies de Cephalosporium pueden cultivarse en presencia de una fuente inorgánica de azufre. De hecho, algunas fuentes orgánicas de azufre, tal como por ejemplo el ácido tioglicólico, son tóxicas para otras especies de Cephalosporium pero no son tóxicas para el Cephalosporium Sp, variedad F. 12.

El proceso de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo adecuadamente de la manera que se describe.

30

405792 11



1 En primer lugar, el microorganismo se hace cre-
cer en tubos inclinados que contienen un medio de cultivo,
durante un periodo de 10 a 15 días, a una temperatura de 28^o
C a 30^oC. El micelio desarrollado se lava entonces con agua
5 y la solución así obtenida se utiliza como inóculo para el
medio de siembra.

 El medio de siembra se mantiene entonces bajo -
condiciones aerobias, con agitación, a temperatura compren-
dida entre los 25^oC y los 30^oC durante 48-96 horas. El me-
10 dio de siembra resultante se utiliza para inocular el medio
de crecimiento final y se introduce en el mismo en canti-
dad de aproximadamente el 5% en peso referido al medio de
crecimiento final.

 El cultivo del medio de crecimiento final inocu-
15 lado, de acuerdo con el proceso de esta invención, se lle-
va a cabo preferentemente durante un periodo de 96 a 130 -
horas, a una temperatura comprendida entre 20^o y 30^o C, pre-
feriblemente entre 22^o C y 28^o C. El rendimiento de Cefa--
losporina C obtenido puede determinarse bien espectrofoto-
20 métricamente (Claridge, Vaughan, Kressel and Gourevitch, -
"Antimicrobial Agents and Chemotherapy", 1969, pág. 131) o
bien microbiológicamente.

 El proceso de acuerdo con la presente invención
puede llevarse a cabo en sistema continuo, utilizando un -
25 aparato de cultivo continuo provisto de un sistema capaz -
de alimentar medio nutritivo estéril a uno o más tanques -
de crecimiento y un sistema para recolectar la suspensión
de células automáticamente. A intervalos, se extrae una por-
ción del caldo de fermentación y se añade al cultivo un --
30 volumen equivalente de medio fresco. Normalmente, puede ha-

405792



1 cerse ésto después de un tiempo de cultivo inicial de 75 a
 110 horas. El nutriente fresco puede introducirse dentro -
 del sistema por medio de una bomba con medidor, de operación
 5 continua y la velocidad de flujo del efluente se regula de
 manera que se consiga un volumen de trabajo constante y una
 densidad de población en el aparato de cultivo, también -
 constante. La velocidad de dilución del cultivo continuo -
 se mantiene adecuadamente en de 0,2 a 0,8 y preferiblemente
 de 0,4 a 0,5 cambios de volumen por día.

10 La Cefalosporina C producida de acuerdo con la -
 presente invención, puede aislarse del medio de cultivo se-
 gún técnicas convencionales y la mezcla de fermentación cru-
 da resultante se purifica, por ejemplo, por filtración, cla-
 rificación con carbón, absorción en una resina cambiadora -
 15 de ion, elución con una base acuosa tal como piridina y eva-
 poración del disolvente para dar un material cristalino.

Con el fin de que la invención pueda ser bien -
 comprendida, se dan los siguientes Ejemplos con finalidad
 meramente ilustrativa. En los ejemplos, todas las partes se
 20 expresan en peso, salvo indicación en contra.

Ejemplo 1

El medio nutritivo cuya composición se detalla a
 continuación, se introduce en una vasija para fermentación
 de acero inoxidable de 27 litros de capacidad con agitación
 25 y aireación.

Polvo de cacahuete	60 partes
Almidón	40 "
Oleato de metilo	8 "
Aceite de grasa de cerdo	60 "
30 Sacarosa	5 "

405792



1	D-glucosa	7 partes
	CO ₃ Ca	10 "
	Borax	0,5 "
	DL-Metionina	15 "
5	Agua	1.000 "

El pH del medio se ajusta hasta dar un valor - final de 7,2 a 7,8 y se esteriliza con vapor a 120°C durante 25-30 minutos.

10 La vasija de fermentación se inocula entonces - con 5-10% en volumen de una preparación de crecimiento de Cephalosporium Sp, variedad F. 12, preparado mediante inoculación de esporas del microorganismo en el siguiente medio:

	Aceite de grasa de cerdo	0,1 %
15	Infusión de trigo	2,0 %
	Acetato amónico	0,6 %
	Sacarosa	2,0 %

e incubación del medio inoculado en un matraz con aireación a 24-27°C, durante 72 horas.

20 La vasija de fermentación, conteniendo el medio nutritivo ya inoculado, se mantiene entonces a 22-28°C durante 130 horas y durante este período, el nivel de aireación se mantiene a un caudal de 1 litro/litro/minuto, con agitación a 300-450 r.p.m. El cultivo resultante contiene 25 de 4.500 a 5.000 micronegramos por ml. de Cefalosporina C (valor medio).

Ejemplo :

30 El material que ha crecido en un tubo inclinado de una pulgada de cultivo de Cephalosporium Sp, variedad F. 12, se suspende en 5 ml. de agua estéril y se utiliza pa-

405792



1 ra inocular 500 ml. de un medio de siembra que tiene la -
siguiente composición:

	Infusión de trigo	25 partes
	Sacarosa	20 "
5	Acetato amónico	4,5 "
	Aceite de grasa de cerdo	0,5 "
	Agua	hasta 1.000 "

El medio inoculado se incubaba a 24-28°C en un -
agitador rotativo a 220 r.p.m. durante 72 horas, en presen-
cia de diferentes compuestos azufrados en cantidades de un
equivalente de azufre (0,01 moles por 1.000 ml.). Sesenta
ml. de cada uno de los cuatro siguientes medios, se inocu-
lan con el medio vegetativo resultante y se mantienen a 22-
28°C durante 114 horas mientras se agita en un agitador ro-
tativo a 250 r.p.m., con rendimientos de Cefalosporina C -
(en microgramos por ml. de medio recolectado) que se expre-
san a continuación:

		<u>Medio 1</u>	<u>Medio 2</u>	<u>Medio 3</u>	<u>Medio 4</u>
		partes	partes	partes	partes
20	Polvo de cacahuete	60	60	60	60
	Almidón	40	40	40	40
	Oleato de metilo	6	6	6	6
	Aceite de grasa de cerdo	60	60	60	60
	Sacarosa	5	5	5	5
25	Cerelesa	7	7	7	7
	CO ₃ Ca	10	10	10	10
	Borax	0,5	0,5	0,5	0,5
	DL-metionina	1,49	-	-	-
	Tioglicolato de metilo	-	0,06	-	-
30	Acido tioacético	-	-	0,76	-



405792

	<u>Medio 1</u>	<u>Medio 2</u>	<u>Medio 3</u>	<u>Medio 4</u>
	partes	partes	partes	partes
1				
	Acido tioglicólico	-	-	0,92
	Agua	hasta 1.000	1.000	1.000

5	Rendimiento de Cefalosporina C.	100	100	160	100
		Microgras.	microgras.	microgras.	microgramos.

10 Ejemplo 3

60 ml. del siguiente medio, se inoculan con el medio de siembra preparado en el Ejemplo 2.

	Polvo de cacahuete	60 partes
	Almidón	40 "
15	Oleato de metilo	6 "
	Aceite de grasa de cerdo	60 "
	Sacarosa	5 "
	Cerelesa	7 "
	CO ₃ Ca	10 "
20	Borax	0,5 "
	DL-serina	2 "
	Acido tioacético	1 "
	Agua	1.000 "

25 El medio inoculado se incuba a 22-28º C en un agitador rotatorio a 250 r.p.m. durante 100 horas, para dar un caldo que contiene 330-360 microgramos/ml. de Cefalosporina C.

30 Ejemplo 4

Se repite el procedimiento del Ejemplo 1, excepto en que se utiliza el siguiente medio nutritivo:

405792



1	Polvo de cacahuete	50 partes
	Almidón	60 "
	Oleato de metilo	25 "
	Sacarosa	5 "
5	Glucosa	7 "
	Carbonato cálcico	10 "
	Borax	0,5 "
	DL-Metionina	15 "
	Agua	1.000 "

10 El cultivo resultante contiene 4.500-5000 microgramos por mililitro de Cefalosporina C.

Ejemplo 5

15 El medio de siembra obtenido en el Ejemplo 2 se utiliza para inocular 60 ml. de cada uno de los siguientes medios y cada medio se mantiene entonces a 22°C-28°C durante 110 horas mientras se agita en un agitador rotatorio a 250 r.p.m.

Medio	6	7	8	9
Polvo de cacahuete (partes)	60	60	60	60
20 Almidón (partes)	40	40	40	40
Linoleato de metilo (partes)	25	-	-	-
Monoleato de Glicerina (partes)	-	25	-	-
Monoleato de Poliglicol (partes)	-	-	25	-
Dioleato de Poliglicol (partes)	-	-	-	25
25 Sacarosa (partes)	5	5	5	5
Glucosa (partes)	7	7	7	7
CO ₃ Ca (partes)	10	10	10	10
Borax (partes)	0,5	0,5	0,5	0,5
DL-metionina (partes)	15	15	15	15
30 Agua	hasta 1.000	1.000	1.000	1.000

405792



1 En cada caso, el nivel de Cefalosporina C obtenido en el medio está entre 3.000 y 3.500 microgramos por mililitro.

Ejemplo 6

5 Se introduce el siguiente medio nutritivo en un tanque de fermentación de acero inoxidable de 27 litros de capacidad con agitación y aireación.

	<u>Partes</u>
Polvo de cacahuete	60
Almidón	40
10 Oleato de metilo	25
Sacarosa	5
D-Glucosa	7
CO ₃ Ca	10
Borax	0,5
15 DL-Metionina	15
Agua	1.000

20 El pH del medio se ajusta hasta dar un valor final de 7,2-7,8 y el medio se esteriliza con vapor a 120°C durante 20 minutos. El medio de fermentación se inocula entonces con 5%-10% en volumen de un material de crecimiento de Cephalosporium Sp F. 12, preparado mediante inoculación de esporas del microorganismo en el siguiente medio:

	<u>Partes por mil</u>
Aceite de grasa de cerdo	1
25 Infusión de trigo	20
Acetato amónico	6
Sacarosa	20

e incubación del medio inoculado en un matraz con aireación durante 72 horas a 26-30°C.

30 El tanque de fermentación ya inoculado, conte-

405792



1 niendo el medio nutritivo se mantiene entonces a 22-28°C -
durante 92 horas. Nuevo medio de cultivo adicional se va -
alimentando al tanque de cultivo a razón de 260 ml/hora -
de forma que la velocidad de dilución sea de 0,25 cambios -
5 de volumen por día. La temperatura se mantiene a 22-24°C,
la agitación a 350 r.p.m. y la aireación a 0,5 litros/litro/
minuto a todo lo largo del proceso de cultivo continuo. Du
rante los 15 días siguientes al comienzo de la operación -
continua, se recolectan 93,6 litros de medio con una con--
10 centración en Cefalosporina C tal como se muestra en la -
Tabla 1.

Tabla 1

	Tiempo de cultivo (horas)	Volumen recolectado (ml)	Concentración de Cefalosporina C (microgramos/ml)
15	92	0	2180
	116	6240	2090
	140	6240	2260
	164	6240	2010
	188	6240	2375
20	212	6240	2400
	236	6240	2130
	260	6240	2210
	284	6240	2175
	308	6240	2200
25	332	6240	2190
	356	6240	2000
	380	6240	2260
	404	6240	2190
	428	6240	2290
30	452	6240	2070
		<u>93,600</u>	

405792



1

Ejemplo 7

3

10

15

20

25

30

Se inoculan con Cephalosporium Sp F. 12 cuatro vasijas de fermentación, conteniendo cada una de ellas 6 -; litros del medio nutriente descrito en el Ejemplo 6. Se -- mantiene la temperatura de fermentación a 23^oC ± 0,5^oC y la aireación a 0,5 litros/litro/minuto. Una de las vasijas de fermentación, denominada J-1, se utiliza como control. Las otras tres vasijas de fermentación, J-2, J-3 y J-4, se alimentan después de 96 horas con medio nutritivo fresco estéril a una velocidad de renovación de 0,0104 volúmenes/hora, 0,0154 volúmenes/hora y 0,0208 volúmenes/hora, respectivamente. Las cantidades recolectadas y las concentraciones de Cefalosporina C se muestran en la Tabla 2. En la columna - para cada vasija de fermentación, el primer número es el volúmen recolectado (en litros) al tiempo indicado y el segundo número es la concentración de Cefalosporina C en el medio - nutritivo (en microgramos/mililitro) a ese tiempo.

Tabla 2

Tiempo de cultivo (horas)	Vasija de fermentación							
	J-1		J-2		J-3		J-4	
96	6	2,200	1.5	2,150	2.25	2,360	3	2,090
120	-	-	1.5	2,230	2.25	2,280	3	2,300
144	-	-	1.5	2,180	2.25	2,320	3	2,170
168	-	-	1.5	2,200	2.25	2,370	3	2,220
192	6	2,200	1.5	2,310	2.25	2,150	3	2,295
216	-	-	1.5	2,090	2.25	2,410	3	2,170
240	-	-	1.5	2,050	2.25	2,295	3	2,260
264	-	-	1.5	2,190	2.25	2,420	3	2,300
288	6	2,120	1.5	2,235	2.25	2,290	3	2,100

4057921



472

1 (Continuación Tabla 2)

	312	-	-	1.5	2,000	2.25	2,450	3	2,250
	336	-	-	1.5	1,900	2.25	2,500	3	2,300
	360	-	-	1.5	1,970	2.25	2,490	3	2,350
5	384	6	2,220	1.5	1,720	2.25	2,370	3	2,300
	408	-	-	1.5	1,810	2.25	2,415	3	2,280
	432	-	-	1.5	1,700	2.25	2,500	3	2,320
	456	-	-	1.5	1,700	2.25	2,480	3	2,310
	480	6	2,250	6.0	1,780	6.0	2,515	6	2,320

10

La Tabla 3 muestra el volumen total recolectado en 20 días de fermentación, el título medio de Cefalosporina C y la cantidad total de Cefalosporina C producida en 20 días de fermentación en cada vasija de fermentación.

15

Tabla 3

Vasija de fermentación

	J-1	J-2	J-3	J-4
Volumen total recolectado (litros)	30	30	42	54
20 Título medio (microgramos/ml.)	2214	2012	2390	2250
Cantidad total de Cefalosporina C producida en 20 días (g)	66.4	60.4	100.4	121.5

25

En resumen, la Patente de Invención que se solicita, deberá recaer sobre las siguientes:

30



4057921

1

REIVINDICACIONES

5

1. Un procedimiento para la producción de Cefalosporina C, que consiste en cultivar un microorganismo productor de Cefalosporina C en un medio nutritivo para el mismo que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y azufre y una o más sales inorgánicas, que se caracteriza porque el microorganismo utilizado es Cephalosporium Sp., variedad F. 12 (ATCC 20339) y la fuente de azufre es una fuente orgánica de azufre.

10

2. Un procedimiento, de acuerdo con la Reivindicación 1, caracterizado porque el cultivo se lleva a cabo en condiciones aerobias sumergidas.

15

3. Un procedimiento, de acuerdo con la Reivindicación 1, caracterizado porque la fuente de carbono en el medio nutritivo es un carbohidrato, preferiblemente una mezcla de uno o más monosacáridos, uno o más disacáridos y uno o más polisacáridos.

20

4. Un procedimiento, de acuerdo con la Reivindicación 3, caracterizado porque el medio nutritivo contiene de 2% a 10% en peso de un carbohidrato.

25

5. Un procedimiento, de acuerdo con cada una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el medio nutritivo contiene también un glicérido o producto de hidrólisis del mismo, preferiblemente un ester soluble en agua de un ácido graso insaturado y un alcohol inferior, tal como linoleato de metilo, mono-oleato de glicerol, monooleato de polietilenglicol o dioleato de polietilenglicol.

30

6. Un procedimiento, de acuerdo con cada una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la fuente de nitrógeno en el medio nutritivo es una fuente or-

ME



405792

1 gánica de nitrógeno, tal como una proteína animal o vege--
tal o un producto de degradación o hidrólisis de las mis--
mas, presente en cantidades suficientes para suministrar -
de un 0,01% a un 0,1% en peso de nitrógeno disponible, ba--
5 sado en el peso del medio.

7. Un procedimiento de acuerdo con cada una de
las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la -
sal inorgánica en el medio nutritivo es carbonato cálcico,
borax, acetato amónico, sulfato amónico o un fosfato de me--
10 tal alcalino.

8. Un procedimiento de acuerdo con cada una de las
reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el me--
dio nutritivo contiene de un 0,5% a un 1,5% en peso de -
sal o sales inorgánicas.

9. Un procedimiento, de acuerdo con cada una de
las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la
fuente orgánica de azufre es metionina.

10. Un procedimiento, de acuerdo con cada una -
de las reivindicaciones 1 a 8 precedentes, caracterizado -
20 porque la fuente orgánica de azufre es un compuesto de azu-
fre de fórmula:



en el que R^1 , R^2 y R^3 son los mismos o diferentes y cada uno
de ellos es hidrógeno o un grupo alquilo conteniendo de 1
25 a 5 átomos de carbono y uno de los X e Y es un átomo de -
azufre y el otro de los X e Y es un átomo de oxígeno o áto-
mo de azufre.

11. Un procedimiento, de acuerdo con cada una de
las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el -
30 medio nutritivo contiene de un 0,05% a un 1% en peso de una

MCE

405792



1
5
10
15
20
25
30

fuerza orgánica de azufre.

12. Un procedimiento, de acuerdo con cada una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el cultivo se lleva a cabo a temperatura comprendida entre 20º y 30º C, preferiblemente entre 22º y 28º C.

13. Un procedimiento, de acuerdo con cada una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el cultivo se lleva a cabo durante un período de 96 a 130 horas.

14. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE CEFALOSPORINA C.

Todo tal y como queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de veinte páginas mecanografiadas.

Madrid, 11 de agosto de 1972

BERNARDO UNGRIA
P.P.

MGE