



10 ES	11 NUMERO 451.318	19 A1
21	22 FECHA DE PRESENTACION 7-9-76	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO 634,106	32 FECHA 21-11-75	33 PAIS Estados Unidos.
---	----------------------	----------------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D//A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

64 TITULO DE LA INVENCION MEJORAS INTRODUCIDAS EN UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE CEFAL- MICINA G.

71 SOLICITANTE (ES) MERCK & CO, INC
--

DOMICILIO DEL SOLICITANTE 126 East Lincoln Avenue, P.O. Box 2000, Rahway, New Jersey 07065, Estados Unidos.

72 INVENTOR (ES) Edward Inamine y Jerome Birnbaum.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU
--

1

RESUMEN DE LA INVENCION

5

Se obtienen mayores rendimientos del conocido y útil antibiótico cefamicina C {ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico} mediante la adición de D- o DL-arginina, D- o DL-ornitina y/o una de varias poliaminas; o D- o DL-lisina en combinación con una entre varias poliaminas, a los medios de fermentación constituidos por nutrientes orgánicos complejos.

10

COMPENDIO DE LA INVENCION

15

Esta invención se refiere a un procedimiento mejorado de fermentación para la producción del conocido y útil antibiótico cefamicina C {ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-carbamoiloximetil-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico}. (Antimicrobial Agent and Chemotherapy, vol. 2, Septiembre 1972, págs. 121-131, 132-135, 281-286 y 287-290). En especial, esta invención se refiere a un método mejorado para la producción del antibiótico por fermentación de medios nutritivos con cepas adecuadas de microorganismos tales como, por ejemplo, Streptomyces.

20

25

30

El antibiótico es producido durante la fermentación aerobia de nuevos nutrientes acuosos adecuados en condiciones controladas. Son adecuados los medios acuosos como los empleados para la producción de otros antibióticos. Estos medios componen fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas que son asimilables por el microorganismo. Además, los medios de fermentación contienen trazas de metales necesarios para el crecimiento del microorganismo que son comúnmente suministrados como impurezas accidentales de los otros constituyentes del medio. En general, pueden utilizarse hidratos de carbono como azúcares, por ejemplo glucosa, maltosa, fructosa, lactosa y

1 similares y almidones como cereales, por ejemplo avena y cen-
teno, almidón de maíz, harina de maíz y similares, solos o
5 en combinación, como fuentes de carbono asimilables. La can-
tidad exacta de fuente o fuentes de hidratos de carbono uti-
lizada en el medio dependerá en parte de los otros ingredien-
tes. Sin embargo, se ha encontrado que es suficiente una can-
tidad de hidrato de carbono comprendida aproximadamente en-
tre 1 y 6 % del peso del medio. Puede utilizarse una sola
10 fuente de carbono o pueden combinarse varias fuentes de car-
bono.

Entre las fuentes de nitrógeno satisfactorias se
encuentran miles de materias proteicas tales como diversas
formas de hidrolizados de caseína, harina de soja, licor de
15 infusión de maíz, solubles de destilería, productos de leva-
dura, pasta de tomate y similares. Las diversas fuentes de
nitrógeno pueden ser utilizadas solas o en combinación y se
emplean en cantidades que oscilan entre 0,2 y 6 % del peso
del medio acuoso.

20 La fermentación se lleva a cabo a temperaturas
comprendidas entre 20°C y 37°C; sin embargo, para obtener
resultados óptimos, es preferible efectuar la fermentación
a temperaturas de 24 a 32°C aproximadamente. El pH de los
medios nutritivos adecuados para cultivar los cultivos de
25 *Streptomyces* y producir el antibiótico debe estar compendi-
do entre 6,0 y 8,0 aproximadamente.

La cefamicina C es producida durante la fermenta-
ción aerobia antes descrita por una cepa de *Streptomyces*
lactamdurans capaz de producir dicho compuesto como, por ejem-
plo, la cepa depositada en la colección de cultivos del
30 Northern Utilization Research and Development Branch del De-

1 partamento de Agricultura de Estados Unidos en Peoria, Illi-
nois, bajo el número de accesoión NRRL 3802. También pueden
5 utilizarse otras cepas de esta especie, tales como los mutan-
tes obtenidos por agentes de mutación o aislados de la natu-
raleza.

La cefamicina C y sus sales presenta resistencia
no solamente a la penicilinas sino también a las cefalospori-
nasas. Este compuesto es activo en la inhibición del creci-
miento de los microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos.
10 A diferencia de la cefalosporina C que tiene una actividad
antibacteriana relativamente baja, la cefamicina C presenta
un notable efecto Gram-negativo in vivo con una potencia
que, en general, es superior a la de la cefalotina. Esta acti-
vidad incluye la eficacia contra las siguientes bacterias
15 Gram-negativas: Escherichia coli, Proteus vulgaris, Proteus
mirabilis, Salmonella schottmuelleri, Klebsiella pneumoniae
AD, Klebsiella pneumoniae B y Paracolonbacterium arizonae.

Los ensayos biológicos para el antibiótico cefami-
cina C se realizan mediante un procedimiento en disco-placa
20 utilizando discos de papel de filtro de 3/8 pulgadas (9,5 mm)
de acuerdo con el procedimiento descrito en las patentes es-
tadounidenses 3.769.169, 3.770.590 y 3.886.044 cuyo conte-
nido se incorpora aquí por referencia. Las placas de ensayo
se preparan utilizando agar nutriente Difco más 2,0 g/l de
25 extracto de levadura Difco a 10 ml por placa. Un crecimiento
de una noche del organismo de ensayo, Vibrio percolans ATCC
8461 se diluye en solución salina estéril hasta formar una
suspensión con un 40 % de transmitancia a una longitud de
30 onda de 660 m μ . Esta suspensión se agrega a razón de 20 ml/li-
tro de medio antes de verter las placas.

1

Las placas de ensayo se mantienen a 4°C hasta que se utilizan (5 días como máximo). Después de la aplicación de los discos de ensayo saturados de antibiótico, las placas se incuban a 28°C durante un periodo de 8 a 24 horas. Se leen las zonas de inhibición como mm de diámetro. Se utilizan para determinar las potencias relativas o, cuando se comparan con un patrón de referencia purificado de cefamicina C, la potencia en µg/ml.

5

10

Debido a la dificultad inherente de la separación de cefamicina C pura de las grandes cantidades de impurezas que contiene el caldo de fermentación, es de importancia considerable encontrar la forma de aumentar la concentración del antibiótico con respecto a los sólidos totales del caldo.

15

20

Por lo tanto, un objeto de esta invención es proporcionar un método de aumentar el rendimiento de antibiótico en un proceso de fermentación. Otro objeto de la invención es proporcionar un método de aumentar el rendimiento de un antibiótico utilizando aditivos químicos relativamente baratos y fácilmente asequibles en el proceso de fermentación. Otros objetos de la invención resultarán evidentes en lo que sigue.

25

30

Se ha descubierto que la adición de D- o DL-arginina, D- o DL-ornitina o una de diversas poliaminas tales como 1,3-diamopropano, 1,3-diamino-2-hidroxiopropano, N-metil-1,3-diaminopropano, agmatina, espermidina, espermina, cadaverina y putrescina a los medios orgánicos complejos de fermentación aumenta la producción de cefamicina C. Además, también pueden agregarse los aminoácidos D- o DL-arginina, D- o DL-ornitina o D- o DL-lisina en combinación con una poliami-

1 na tal como 1,3-diaminopropano, 1,3-diamino-2-hidroxipropa-
no, N-metil-1,3-diaminopropano, agmatina, espermidina, esper-
mina, cadaverina y putrescina para aumentar todavía más el
rendimiento de la fermentación.

5 Por medios "orgánicos complejos" se entienden los
medios donde alguno de los ingredientes no están químicamente
definidos. Un ejemplo de estos medios es el constituido por
solubles de destilería, levadura seca primaria, glicerol,
10 dimetilformamida, glicina, L-fenilalanina, tiosulfato sódico
y un antiespumante, donde los solubles de destilería y la le-
vadura seca primaria no están químicamente definidos.

La cantidad del aminoácido y/o de la poliamina
necesaria para estimular la producción del antibiótico cefa-
micina C depende hasta cierto punto del cultivo y del medio
15 empleados. En el caso del cultivo de Streptomyces lactamurans
se ha observado un aumento de la producción del antibiótico
cefamicina C en un medio orgánico complejo que contiene alre-
dedor de 0,025 a 0,40 % (en peso/volumen) de aminoácido D- o
DL-arginina o D- o DL_ornitina, calculado en forma de hidro-
20 cloruro; o alrededor de 0,01 a 0,2 % (peso/volumen) de 1,3-
diaminopropano, calculado en forma de dihidrocloruro; o alre-
dedor de 0,0025 a 0,05 % (peso/volumen) de espermidina o de
espermina, calculadas en forma de trihidrocloruro y tetrahidro-
25 cloruro respectivamente; o alrededor de 0,025 a 0,2 % (peso/
volumen) de cadaverina o putrescina, calculadas en forma de
dihidrocloruro; o alrededor de 0,025 a 0,2 % (peso/volumen)
de agmatina, calculada en forma de sulfato; o alrededor de
0,05 a 0,2 % (peso/volumen) de 1,3-diamino-2-hidroxipropano
o N-metil-1,3-diaminopropano como base libre.

30 Además de utilizarse individualmente, los aminoáci-

1 dos y las poliaminas pueden combinarse entre sí para formar
un aditivo que estimula el rendimiento de cefamicina C en
los medios nutrientes orgánicos complejos que emplean
5 Streptomyces lactamdurans. Las adiciones combinadas de los
aminoácidos (arginina, lisina y ornitina) y las poliaminas
aumentan la productividad de cefamicina C en mayor grado que
cuando los compuestos se agregan independientemente.

También se ha observado un aumento de la produc-
ción del antibiótico agregando los aminoácidos D- o DL-argi-
10 nina, D- o DL-ornitina o D- o DL-lisina donde el aminoácido
está presente en una proporción de alrededor de 0,1 a 0,2 %
(peso/volumen), calculado en forma de hidrocloreuro, en com-
binación con alrededor de 0,1 % (peso/volumen) de 1,3-diami-
15 nopropano, cadaverina o putrescina, calculados en forma de
dihidrocloreuro; o alrededor de 0,02 % (peso/volumen) de es-
permidina o espermina, calculadas en forma de trihidrocloreuro
y tetrahidrocloreuro respectivamente; o alrededor de 0,1 %
(peso/volumen) de agmatina, calculada en forma de sulfato; o
20 alrededor de 0,05 a 0,2 % (peso/volumen) de 1,3-diamino-2-
hidroxipropano o N-metil-1,3-diaminopropano en forma de base
libre. Se obtienen rendimientos óptimos del antibiótico cuan-
do el medio contiene aminoácidos en una proporción de 0,1 a
0,2 % aproximadamente y compuestos poliamínicos en una pro-
25 porción de 0,1 % aproximadamente, a excepción de la espermi-
dina y de la espermina que son más eficaces a una proporción
de 0,02 % aproximadamente. La combinación preferida de amino-
ácido y poliamina es DL-lisina y 1,3-diaminopropano agregados
en la proporción de 0,1 % (peso/volumen) aproximadamente,
30 calculados como hidrocloreuro y dihidrocloreuro, respectivamente.

El experto en la técnica observará que, además de

1 emplear dichos aminoácidos y poliaminas, en la práctica de
la invención pueden utilizarse las sales de estos materiales.
Por ejemplo, pueden emplearse las sales HCl, SO₄ y PO₄ en el
5 medio de producción basal para aumentar el rendimiento del
antibiótico.

El tiempo de adición de los aditivos que aumentan
el rendimiento al caldo de fermentación no es crítico. Así,
la adición puede tener lugar en el momento de la inoculación
con el cultivo de Streptomyces y hasta 72 horas después. En
10 general, se prefiere agregar los aminoácidos y las poliami-
nas inmediatamente antes de la inoculación.

La discusión anterior y los ejemplos que siguen
están dirigidos fundamentalmente a fermentaciones que utili-
zan una cepa particular de cultivo de Streptomyces lactam-
15 durans. Sin embargo, también pueden utilizarse otras cepas
de este organismo tales como los mutantes para producir el
antibiótico y resultará evidente al experto en la técnica que
siguiendo las enseñanzas de esta invención, el rendimiento
de antibiótico puede ser aumentado por adición de D- o DL-
20 arginina, D- o DL-ornitina y/o una poliamina; o D- o DL-li-
sina en combinación con una poliamina, al caldo de fermenta-
ción que contiene dichas cepas. Siguiendo las enseñanzas de
esta invención, las modificaciones o cambios evidentes en
25 los niveles óptimos de aditivo o en el tiempo de adición al
medio de fermentación están al alcance del experto en la téc-
nica, cualquiera que sea la cepa de Streptomyces lactamdurans
utilizada para producir el antibiótico cefamicina C.

Aunque el antibiótico cefamicina C es producido
30 en cultivos superficiales y sumergidos, actualmente se pre-
fiere efectuar la fermentación en estado sumergido. Las fer-

1 mentaciones a pequeña escala se realizan convenientemente
 colocando cantidades adecuadas de medio nutritivo en matra-
 ces, esterilizando los matraces y su contenido mediante ca-
5 lefacción a 120°C, inoculando los matraces con esporas o con
 un cultivo celular vegetativo de una cepa de Streptomyces
 productora de cefamicina C, tapando sin apretar la boca de
 los matraces con algodón y permitiendo que la fermentación
 transcurra a una temperatura constante de unos 28°C en un
 sacudidor, durante 1 a 4 días.

10 Para el trabajo a escala mayor, es preferible
 efectuar la fermentación en tanques adecuados provistos de
 un agitador y un medio para airear el medio de fermentación.
 En este método, el medio nutritivo se prepara en el tanque y
 se esteriliza calentando a 120°C. Después de enfriar el medio
15 esterilizado, es inoculado con una fuente adecuada de cultivo
 celular vegetativo del cultivo de Streptomyces y se permite
 que transcurra la fermentación durante 3-5 días mientras se
 agita y/o airea el medio nutritivo y se mantiene la tempera-
 tura a 28°C aproximadamente. Este método de producción de
20 cefamicina C es especialmente adecuado para la preparación
 de grandes cantidades del antibiótico.

 En la puesta en práctica de la invención, se prepara
 una suspensión celular por adición de medio estéril a un
 cultivo inclinado de agar del microorganismo productor de
25 cefamicina C. El crecimiento del cultivo inclinado se suspen-
 de en el medio y después se utiliza la suspensión para inocu-
 lar un matraz de siembra y este último se sacude a unos 28°C du-
 rante 1-3 días con objeto de obtener un buen crecimiento. El
 matraz de siembra se utiliza después para inocular los matra-
30 ces de producción. Alternativamente, el matraz de siembra pue

1 de ser inoculado con un cultivo liofilizado o un inoculum congelado y también puede utilizarse más de una fase de siembra.

5 El medio de producción basal se prepara en agua desionizada, se ajusta a pH aproximadamente 7, se dispensa en matraces de producción y se esteriliza calentando en autoclave durante unos 20 minutos. Se agrega la concentración deseada de aditivo estéril a los matraces de producción y la inoculación se realiza generalmente empleando alrededor de 1 ml por cada 40 ml de medio de producción. Se permite que la fermentación transcurra durante 2-4 días mientras se agita y/o airea el medio nutritivo y se mantiene la temperatura a unos 28°C. Todos los matraces de producción, es decir, los que contienen los aditivos antes citados y los matraces utilizados como controles, se analizan después, generalmente al cabo de 96 horas, para determinar la cantidad de antibiótico producido en cada matraz.

15 Se analizan unas partes alícuotas de los matraces de producción diluyendo la muestra en solución reguladora de fosfato 0,02M a pH 7 hasta una concentración apropiada. El organismo de ensayo es Vibrio percolans ATCC 8461 y el medio de ensayo es agar nutriente Difco más 0,2 % de extracto de levadura Difco. Se sumergen unos discos de 3/8" (9,5 mm) de diámetro en una solución que contiene 5 µg por mililitro del antibiótico patrón y se colocan sobre la placa en una posición alterna con respecto a las muestras que han de ser ensayadas. Después las placas se incuban a 28°C durante 18 horas y se determinan los diámetros de las zonas en milímetros. Se emplean cinco discos patrón conteniendo cuatro niveles del antibiótico patrón, que oscilan entre 2,5 µg/ml y 20 µg/ml.

1 La cantidad de antibiótico en la muestra de ensayo se calcula
mediante la curva patrón preparada a partir de las concentra-
ciones conocidas de las soluciones patrones de antibiótico.
5 Los resultados se registran en μg por mililitro del antibió-
tico en forma de ácido libre.

El antibiótico puede ser recuperado del medio de
fermentación mediante diversos procedimientos. El caldo fil-
trado podrá pasarse a través de una o más columnas cambiador-
as de ion. El carácter anfótero del antibiótico permite la
10 selección de resinas cambiadoras de ion catiónicas y anió-
nicas para optimizar la recuperación. El antibiótico adsorbido
puede ser separado después por elución, preferiblemente en un
disolvente volátil como piridina que puede ser fácilmente
eliminado.

15 Los siguientes ejemplos se dan con fines ilustrati-
vos y no limitativos de la invención.

EJEMPLO 1

Preparación del inoculum

20 Un tubo liofilizado de Streptomyces lactamdurans
NRRL 3802 se abre asépticamente y su contenido se transfiere
a 40 ml de medio estéril contenidos en un matraz Erlenmeyer
de 250 ml provisto de tabiques, donde el medio contiene 10 g/l
de levadura seca primaria, N.F. a pH 7 (suministrada
25 por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada.
El matraz se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (2 pul-
gadas, 5 cm, de desplazamiento) colocado a 220 rpm, durante
48 horas, en cuyo momento se observa un crecimiento luju-
rioso del organismo. Se dispensan partes alícuotas del conte-
nido del matraz en tubos estériles y se mantienen a -78°C
30 hasta que se utilizan.

1

Primera fase de siembra

El inoculum congelado se descongela a 36°C y se utiliza 1 ml para inocular 40 ml de medio estéril que contiene 10 g/l de levadura seca primaria, N.F. a pH 7 (suministrada por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques. El organismo se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm, durante unas 45 horas.

5

10

Segunda fase de siembra

Se utiliza 1 ml de la siembra de la primera fase para inocular 40 ml de medio estéril conteniendo 1 % de autolizado de levadura Ardamine YEP (suministrado por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada a pH 7, en un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques. El organismo se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) a 220 rpm durante 24 horas y sirve como inoculum para el medio de producción.

15

20

Medio de producción basal

El medio de producción basal tiene la siguiente composición:

25

30

	<u>%</u>
Solubles de destilería	3,0 peso/volumen
Levadura seca primaria N.F.	0,75 peso/volumen
Glicerol	1,25 peso/volumen
Dimetilformamida	1,0 volumen/volumen
Glicina	0,05 peso/volumen
L-fenilalanina	0,3 peso/volumen
Mobil Par S-Defoamer	0,25 peso/volumen
Tiosulfato sódico*	0,1 peso/volumen

1 * Agregado asépticamente a las 0-24 horas después de la inoculación de una solución de reserva concentrada esterilizada por filtración para dar la concentración final indicada.

5 El medio se prepara en agua desionizada, se ajusta a pH 7 con hidróxido sódico, se dispensan porciones de 40 ml en Erlenmeyers de 250 ml y se esteriliza en autoclave durante 20 minutos y se enfría.

10 A una serie de matraces, preparados como se ha descrito antes, se añade D- o DL-arginina.HCl o D- o DL-ornitina.HCl. Los matraces son idénticos en todos los aspectos salvo en la presencia del aminoácido.

15 Se preparan soluciones de reserva concentradas de los aminoácidos aditivos en agua y se neutralizan con ácido clorhídrico o hidróxido sódico hasta pH 7. Las soluciones de reserva esterilizadas por filtración se agregan a los matraces que contienen el medio de producción basal a las concentraciones finales deseadas inmediatamente antes de la inoculación con el organismo.

20 Después de la adición de los aminoácidos aditivos, el medio se inocula con 2,5 % en volumen de la siembra de la segunda fase y se incuba durante 96 horas a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm. Una vez completada la fermentación, se separan las células por centrifugación y el caldo clarificado se analiza para determinar la cefamicina C en la forma antes descrita
25 empleando Vibrio percolans ATCC 8461 como organismo de ensayo.

30

TABLA I

Aditivos al medio de producción basal	Concentración de los aditivos (%) al medio de producción basal					
	0	0,025	0,05	0,10	0,20	0,30
Producción de cefamizina C (µg/ml)						
1	Ninguno (Control)	199				
5	D-arginina.HCl	202	232	282	234	264
	D-ornitina.HCl	230	229	221	264	246
	DL-ornitina.HCl	212	218	199	246	301
10	Ninguno (Control)	162				
	D-arginina.HCl	-	238	206	196	-
	DL-arginina.HCl	-	200	193	215	-
	D-ornitina.HCl	-	224	232	222	-
	DL-ornitina.HCl	-	185	202	187	-
15	Ninguno (Control)	172				
	D-arginina.HCl	-	268	235	219	-
	DL-arginina.HCl	-	209	219	223	-
	D-ornitina.HCl	-	218	216	230	-
	DL-ornitina.HCl	-	191	222	270	-
20	Ninguno (Control)	160				
	D-arginina.HCl	215	232	239	247	-
	DL-arginina.HCl	226	218	237	259	-
	D-ornitina.HCl	-	202	221	301	304
	DL-ornitina.HCl	-	201	201	232	250
25						
30						

	Aditivos al medio de producción basal	Concentración de los aditivo.		
		0	0,025	0,0:
		Producción		
1				
5	Ninguno (Control)	199		
	D-arginina.HCl		202	232
	D-ornitina.HCl		230	229
	DL-ornitina.HCl		212	218
10	Ninguno (Control)	162		
	D-arginina.HCl		-	238
	DL-arginina.HCl		-	200
	D-ornitina.HCl		-	224
	DL-ornitina.HCl		-	185
15	Ninguno (Control)	172		
	D-arginina.HCl		-	268
	DL-arginina.HCl		-	209
	D-ornitina.HCl		-	218
	DL-ornitina.HCl		-	191
20	Ninguno (Control)	160		
	D-arginina.HCl		215	232
	DL-arginina.HCl		226	218
	D-ornitina.HCl		-	202
25	DL-ornitina.HCl			201
30				

TABLA I

Concentración de los aditivos (%) al medio de producción basal

	<u>0,025</u>	<u>0,05</u>	<u>0,10</u>	<u>0,20</u>	<u>0,30</u>	<u>0,40</u>
<u>Producción de cefamizina C (µg/ml)</u>						
9	202	232	282	234	264	-
	230	229	221	264	246	-
	212	218	199	246	301	-
2	-	238	206	196	-	193
	-	200	193	215	-	246
	-	224	232	222	-	254
	-	185	202	187	-	168
2	-	268	235	219	-	210
	-	209	219	223	-	200
	-	218	216	230	-	251
	-	191	222	270	-	288
0	215	232	239	247	-	-
	226	218	237	259	-	-
	-	202	221	301	-	304
		201	201	232	-	250

1

EJEMPLO 2

Preparación del inoculum

5

10

Un tubo liofilizado de Streptomyces lactamdurans NRRL 3802 se abre asépticamente y su contenido se transfiere a 40 ml de un medio estéril contenido en un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques, donde el medio contiene 10 g/l de levadura seca primaria, N.F. a pH 7 (suministrada por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada. El matraz se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm, durante 48 horas, al cabo de las cuales se observa un crecimiento lujurioso del organismo. Se dispensan partes alícuotas del contenido del matraz en tubos estériles y se mantienen a -78°C hasta que se utilizan.

15

Primera fase de siembra

20

El inoculum congelado se descongela a 36°C y se utiliza 1 ml para inocular 40 ml de medio estéril conteniendo 10 g/l de levadura seca primaria, N.F. a pH 7 (suministrada por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada, en un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques. El organismo se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm, durante 45 horas.

Segunda fase de siembra

25

30

Se utiliza 1 ml de la siembra de la primera fase para inocular 40 ml de medio estéril conteniendo 1 % de autolizado de levadura Ardamine YEP (suministrado por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada a pH 7, en un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques. El organismo se incubaba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) a 220 rpm durante 24 horas y sirve como inoculum

1 para el medio de producción.

Medio de producción basal

El medio de producción basal tiene la siguiente composición:

5

	<u>g</u>
Solubles de destilería	3,0 peso/volumen
Levadura seca primaria N.F.	0,75 peso/volumen
Glicerol	1,25 peso/volumen
Dimetilformamida	1,0 volumen/volumen
10 Glicina	0,05 peso/volumen
L-fenilalanina	0,3 peso/volumen
Mobil Par S-Defoamer	0,25 peso/volumen
Tiosulfato sódico*	0,1 peso/volumen

15 * Agregado asépticamente a las 0-24 horas después de la inoculación desde una solución de reserva concentrada esterilizada por filtración, para dar la concentración final indicada.

El medio se prepara en agua desionizada, se ajusta a pH 7 con hidróxido sódico, se dispensan porciones de 40 ml en Erlenmeyers de 250 ml y se esterilizan en autoclave durante 20 minutos y se enfrían.

25 A una serie de matraces, preparados como se ha descrito antes, se añade 1,3-diaminopropano.2HCl, sulfato de agmatina, espermidina.3HCl, espermina.4HCl, cadaverina.2HCl, putrescina.2HCl, 1,3-diamino-2-hidroxiopropano y N-metil-1,3-diaminopropano. Los matraces son idénticos en todos los aspectos a excepción de la presencia del aminoácido.

30 Se preparan soluciones de reserva concentradas de los aditivos poliamínicos en agua y se neutralizan con ácido clorhídrico o hidróxido sódico hasta pH 7. Las soluciones de reserva esterilizadas por filtración se agregan a los matra-

1 ces que contienen el medio de producción basal hasta las con-
centraciones finales deseadas, inmediatamente antes de la ino-
culación con el organismo.

5 Después de la adición de los aditivos poliamínicos,
el medio se inocula con 2,5 % en volumen de la siembra de la
segunda fase y se incuban durante 96 horas a 28°C en un sacu-
didor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a
220 rpm. Una vez completada la fermentación, se separan las
10 células por centrifugación y el caldo clarificado se analiza
para determinar la cefamicina C en la forma descrita anterior-
mente con Vibrio percolans ATCC 8461 como organismo de ensayo.

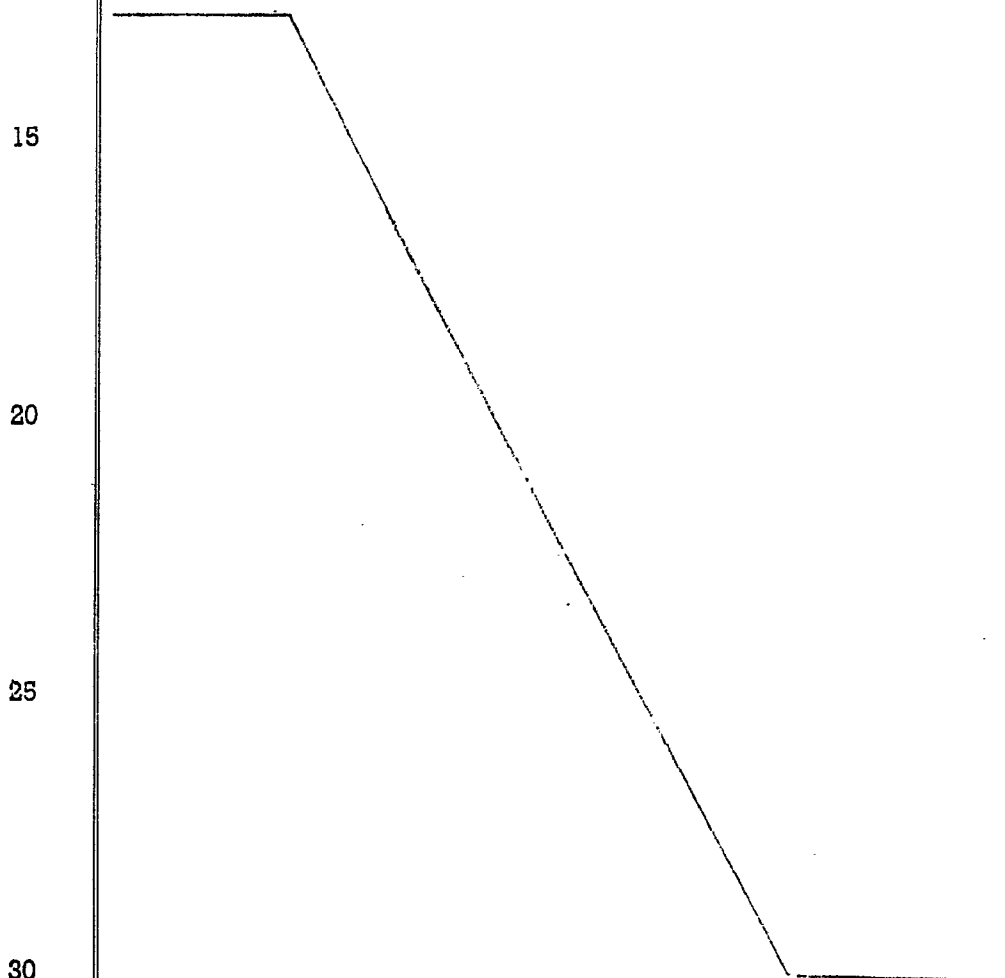


TABLA II

Aditivos al medio de producción basal	Concentración de aditivos (%) al medio de producción basal									
	0	0,0025	0,005	0,010	0,020	0,025	0,05	0,10	0,20	
	Producción de cefamicina C (µg/ml)									
1	Ninguno (Control)	200								
5	1,3-Diaminopropano.2HCl			237		263	282	290		
	Sulfato de agmatina					202	247	257	235	
	Espermidina.3HCl		262	304	315		320			
	Espermina.4HCl	197	278	275						
10	Ninguno (Control)	165								
	1,3-Diaminopropano.2HCl			198		232	330	309		
	Espermidina.3HCl	219	230	255	282					
	Espermina.4HCl		234	341	296		318			
	Cadaverina.2HCl					224	244	255	272	
15	Ninguno (Control)	199								
	1,3-Diaminopropano.2HCl			263		299	332	368	344	
	Sulfato de agmatina					288	215	219	215	
	Espermidina.3HCl	285	331	387	361		248			
	Espermina.4HCl	276	282	369	494		377			
	Cadaverina.2HCl					226	258	271	254	
	Putrescina.2HCl					272	265	276	284	
20	Ninguno (Control)	170								
25	1,3-Diamino-2-hidroxi-propano						184	203	199	
	N-metil-1,3-diaminopropano						226	192	202	

1

Aditivos al medio de
producción basal

Concentración de aditiv

0

0,0025

0

Producc

5

Ninguno (Control)

200

1,3-Diaminopropano.2HCl

-

Sulfato de agmatina

-

Espermidina.3HCl

-

Espermina.4HCl

197

10

Ninguno (Control)

165

1,3-Diaminopropano.2HCl

-

Espermidina.3HCl

219

Espermina.4HCl

-

Cadaverina.2HCl

-

15

Ninguno (Control)

199

1,3-Diaminopropano.2HCl

-

Sulfato de agmatina

-

Espermidina.3HCl

285

20

Espermina.4HCl

276

Cadaverina.2HCl

-

Putrescina.2HCl

-

Ninguno (Control)

170

25

1,3-Diamino-2-hidroxi-
propano

-

N-metil-1,3-diaminopropano

-

30

TABLA II

Concentración de aditivos (%) al medio de producción basal

<u>0</u>	<u>0,0025</u>	<u>0,005</u>	<u>0,010</u>	<u>0,020</u>	<u>0,025</u>	<u>0,05</u>	<u>0,10</u>	<u>0,20</u>
Producción de cefamicina C ($\mu\text{g/ml}$)								
200	-	-	237	-	263	282	290	-
	-	-	-	-	202	247	257	235
	-	262	304	315	-	320	-	-
	197	278	275	-	-	-	-	-
165	-	-	198	-	232	330	309	-
	219	230	255	282	-	-	-	-
	-	234	341	296	-	318	-	-
	-	-	-	-	224	244	255	272
199	-	-	263	-	299	332	368	344
	-	-	-	-	288	215	219	215
	285	331	387	361	-	248	-	-
	276	282	369	494	-	377	-	-
	-	-	-	-	226	258	271	254
	-	-	-	-	272	265	276	284
170	-	-	-	-	-	184	203	199
	-	-	-	-	-	226	192	202

1

EJEMPLO 3

Preparación del inoculum

5

Un tubo liofilizado de Streptomyces lactamurans NRRL 3802 se abre asépticamente y su contenido se transfiere a 40 ml de medio estéril contenido en un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques, donde el medio contiene 10 g/l de levadura seca primaria, N.F. a pH 7 (suministrado por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada. El matraz se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado 220 rpm, durante 48 horas, al cabo de los cuales se observa un crecimiento lujurioso del organismo. Se dispensan partes alícuotas del contenido del matraz en tubos estériles y se mantienen a -78°C hasta que se utilizan.

10

15

Primera fase de siembra

El inoculum congelado se descongela a 36°C y se utiliza 1 ml para inocular 40 ml de medio estéril conteniendo 10 g/l de levadura seca primaria, N.F. a pH 7 (suministrada por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada, en un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques. El organismo se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm, durante unas 45 horas.

20

Segunda fase de siembra

Se utiliza 1 ml de la siembra de la primera fase para inocular 40 ml de medio estéril conteniendo 1 % de autolizado de levadura Ardamine YEP (suministrado por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada a pH 7, en un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques. El organismo se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) a 220 rpm durante 24 horas y sirve como inoculum para

25

30

1 el medio de producción.

Medio de producción basal

El medio de producción basal tiene la siguiente composición:

5

	<u>g</u>
Solubles de destilería	3,0 peso/volumen
Levadura seca primaria N.F.	0,75 peso/volumen
Glicerol	1,25 peso/volumen
Dimetilformamida	1,0 volumen/volumen
10 Glicina	0,05 peso/volumen
L-fenilalanina	0,3 peso/volumen
Mobil Par S-Defoamer	0,25 peso/volumen
Tiosulfato sódico*	0,1 peso/volumen

15 * Agregado asépticamente a las 0-24 horas después de la inoculación desde una solución de reserva concentrada esterilizada por filtración, hasta dar la concentración final indicada.

El medio se prepara en agua desionizada, se ajusta a pH 7 con hidróxido sódico, se dispensan porciones de 40 ml en Erlenmeyers de 250 ml y se esterilizan en autoclave durante 20 minutos y se enfrían.

20 A una serie de matraces, preparados como se ha descrito antes, se agrega D- o DL-lisina.HCl, D-arginina.HCl, D-ornitina.HCl y/o 1,3-diaminopropano.2HCl. Los matraces son idénticos en todos los aspectos a excepción de la presencia del aminoácido.

25 Se preparan soluciones de reserva concentradas de los aditivos en agua y se neutralizan con ácido clorhídrico o hidróxido sódico hasta pH 7. Las soluciones de reserva esterilizadas por filtración se agregan a los matraces que contienen el medio de producción basal hasta las concentraciones

30

1 finales descadas inmediatamente antes de la inoculación con el organismo.

5 Después de la adición de los aditivos, el medio se inocula con 2,5 % en volumen de la siembra de la segunda fase y se incuba durante 96 horas a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm. Una vez completada la fermentación, se separan las células por centrifugación y el caldo clarificado se analiza para determinar la cefamicina C en la forma descrita antes con Vibrio percolans ATCC 8461 como organismo de ensayo.

TABLA III

Aditivos al medio de producción basal	Concentración de 1,3-diaminopropano.2HCl agregado al medio de producción basal (%)	
	0	0,10 %
	Producción de cefamicina C (µg/ml.)	
Ninguno	129	235
D-lisina.HCl, 0,1 %	182	286
DL-lisina.HCl, 0,1 %	152	264
D-arginina.HCl, 0,1 %	173	243
20 D-ornitina.HCl, 0,1 %	188	282

EJEMPLO 4

Preparación del inoculum

25 Un tubo liofilizado de Streptomyces lactamdurans NRRL 3802 se abre asépticamente y su contenido se transfiere a 40 ml de medio estéril contenido en un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques, donde el medio contiene 10 g/l de levadura seca primaria, N.F. a pH 7 (suministrada por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada. El matraz se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm, durante 48 horas, al

1 cabo de las cuales se observa un crecimiento lujurioso del organismo. Se dispensan partes alícuotas del contenido del matraz en tubos estériles y se mantienen a -78°C hasta que se utilizan.

5 Primera fase de siembra

El inoculum congelado se descongela a 36°C y se utiliza 1 ml para inocular 40 ml de medio estéril conteniendo 10 g/l de levadura seca primaria, N.F. a pH 7 (suministrada por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada, en un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques. El organismo se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm, durante 45 horas.

10 Segunda fase de siembra

15 Se utiliza 1 ml de la siembra de la primera fase para inocular 40 ml de medio estéril conteniendo 1 % de autolizado de levadura Ardamine YEP (suministrado por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada a pH 7, en un Erlenmeyer de 250 ml provisto de tabiques. El organismo se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) a 220 rpm durante 24 horas y sirve como inoculum para el medio de producción.

20 Medio de producción basal

El medio de producción basal tiene la siguiente composición:

	<u>%</u>
Solubles de destilería	3,0 peso/volumen
Levadura seca primaria N.F.	0,75 peso/volumen
Glicerol	1,25 peso/volumen
Dimetilformamida	1,0 volumen/volumen
30 Glicina	0,05 peso/volumen

1

g

L-fenilalanina	0,3 peso/volumen
Mobil Par S-Defoamer	0,25 peso/volumen
Tiosulfato sódico*	0,1 peso/volumen

5

* Agregado asépticamente a las 0-24 horas después de la inoculación desde una solución de reserva concentrada esterilizada por filtración, para dar la concentración final indicada.

10

El medio se prepara en agua desionizada, se ajusta a pH 7 con hidróxido sódico, se dispensan porciones de 40 ml en Erlenmeyers de 250 ml y se esterilizan en autoclave durante 20 minutos y se enfrían.

15

A una serie de matraces, preparados como se ha descrito antes, se añade D- o DL-lisina.HCl, 1,3-diamino-2-hidroxiopropano y N-metil-1,3-diaminopropano. Los matraces son idénticos en todos los aspectos a excepción de la presencia del aminoácido.

20

Se preparan soluciones de reserva concentradas de los aditivos en agua y se neutralizan con ácido clorhídrico o hidróxido sódico hasta pH 7. Se añaden las soluciones de reserva esterilizadas por filtración a los matraces que contienen el medio de producción basal a las concentraciones finales deseadas inmediatamente antes de la inoculación con el organismo.

25

Después de la adición de los aditivos, el medio se inocula con 2,5 g en volumen de la siembra de la segunda fase y se incuba durante 96 horas a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm. Una vez completada la fermentación, se separan las células por centrifugación y el caldo clarificado se analiza para de-

30

1 terminar la cefamicina C en la forma descrita antes, con
Vibrio percolans ATCC 8461 como organismo de ensayo.

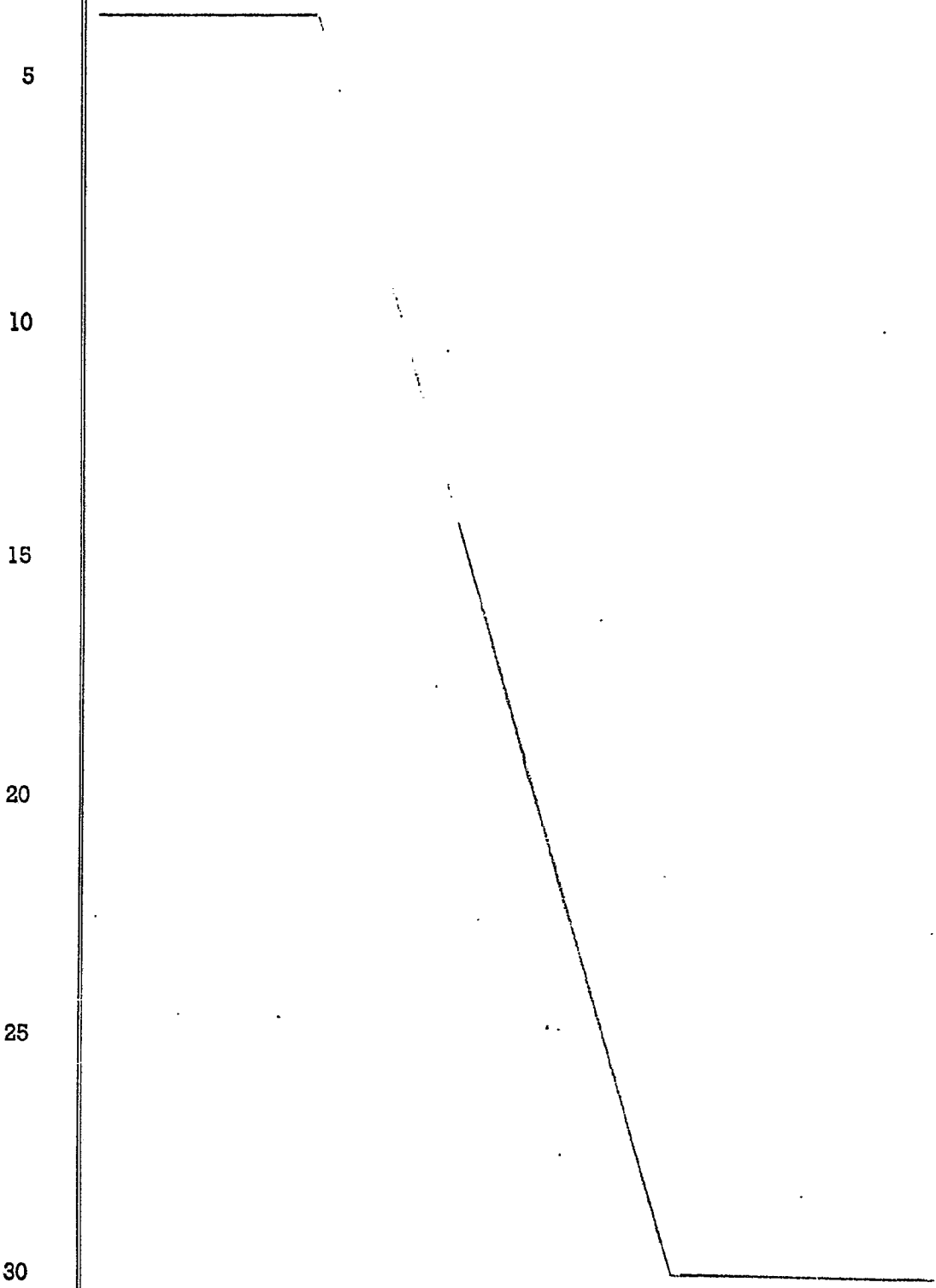


TABLA IV

Aditivos al medio de producción basal

Aditivos al medio de producción basal	D-Lisina.HCl		DL-Lisina.HCl		Producción de cefamicina C (µg/ml)
	Ninguno	0,1 %	0,1 %	0,2 %	
Ninguno	154	234	169	150	150
1,3-Diamino-2-hidroxiopropano, 0,05 %	222	264	311	240	240
1,3-Diamino-2-hidroxiopropano, 0,10 %	229	276	333	255	255
1,3-Diamino-2-hidroxiopropano, 0,20 %	246	355	-	-	-
N-Metil-1,3-diaminopropano, 0,05 %	248	285	311	255	255
N-Metil-1,3-diaminopropano, 0,10 %	189	307	304	271	271
N-Metil-1,3-diaminopropano, 0,20 %	151	247	-	-	-

1

5

10

15

20

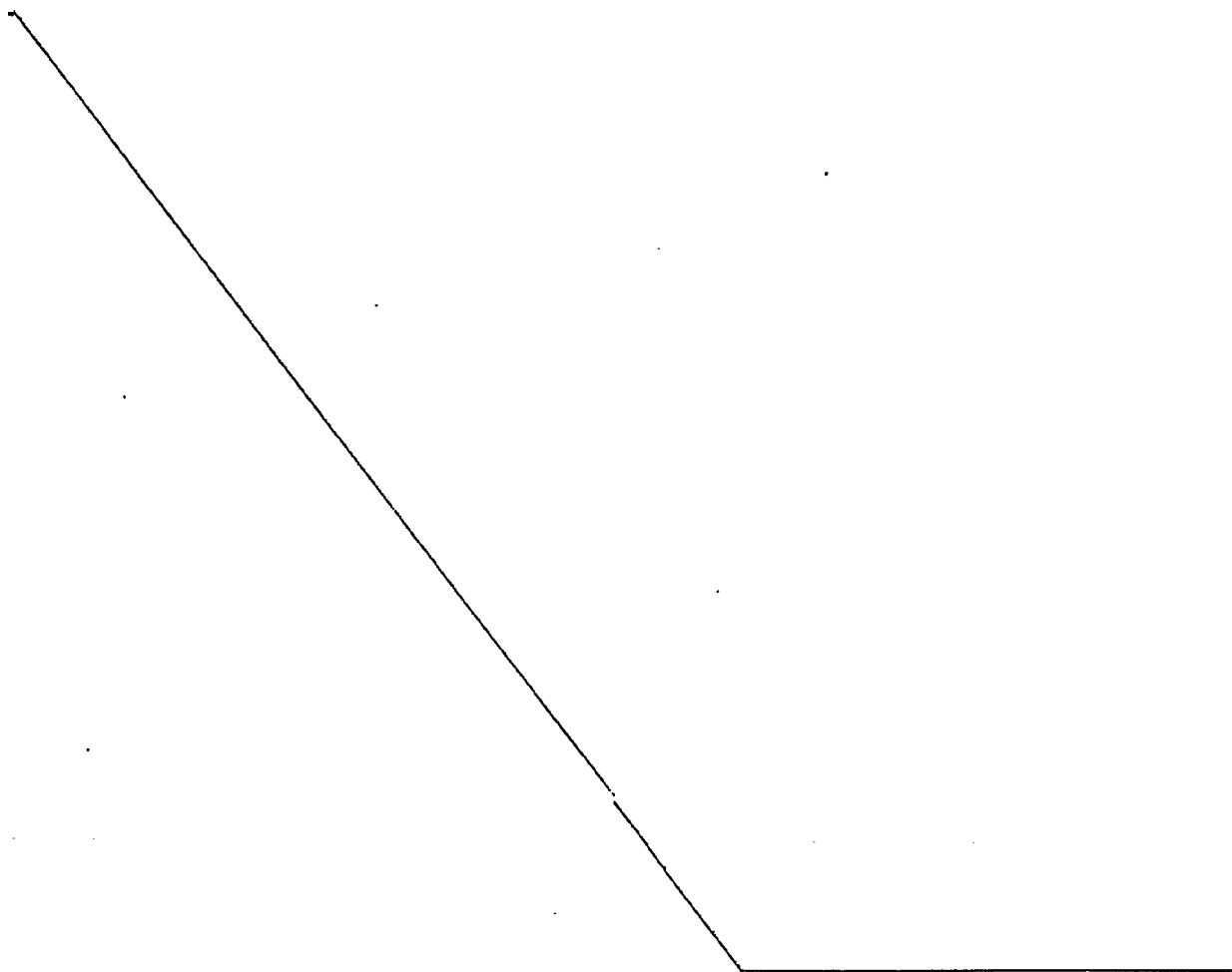
25

30

TABLA IV

Aditivos al medio de producción basal

	<u>D-lisina.HCl</u>		<u>DL-lisina.HCl</u>	
	<u>Ninguno</u>	<u>0,1 %</u>	<u>0,1 %</u>	<u>0,2 %</u>
	<u>Producción de cefamicina C (µg/ml)</u>			
	154	234	169	150
no, 0,05 %	222	264	311	240
no, 0,10 %	229	276	333	255
no, 0,20 %	246	355	-	-
, 0,05 %	248	285	311	255
, 0,10 %	189	307	304	271
, 0,20 %	151	247	-	-



EJEMPLO 5

Preparación del inoculum

Un tubo liofilizado de Streptomyces lactamdurans NRRL 3802 se abre asépticamente y su contenido se transfiere a 40 ml de medio estéril contenido en un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques, donde el medio contiene 10 g /l de extracto de levadura primario, N.F. a pH 7 (suministrado por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada. El matraz se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm, durante 48 horas, al cabo de las cuales se observa un desarrollo lujurioso del organismo. Se dispensan partes alícuotas del contenido del matraz en tubos estériles y se mantienen a -78°C hasta que se utilizan.

Primera fase de siembra

El inoculum congelado se descongela a 36°C y se utiliza 1 ml para inocular 40 ml de medio estéril conteniendo 10 g/l de levadura seca primaria, N.F. a pH 7 (suministrada por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada, en un Erlenmeyer de 250 ml provisto de tabiques. El organismo se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm, durante 45 horas.

Segunda fase de siembra

Se utiliza 1 ml de la siembra de la primera fase para inocular 40 ml de medio estéril conteniendo 1 % de autolizado de levadura Ardamine YEP (suministrado por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada a pH 7, en un Erlenmeyer de 250 ml provisto de tabiques. El organismo se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) a 220 rpm durante 24 horas y sirve como inoculum para el medio

1 de producción.

Medio de producción basal

El medio de producción basal tiene la siguiente composición:

5		<u>%</u>
	Solubles de destilería	3,0 peso/volumen
	Levadura seca primaria N.F.	0,75 peso/volumen
	Glicerol	1,25 peso/volumen
	Dimetilformamida	1,0 volumen/volumen
10	Glicina	0,05 peso/volumen
	L-fenilalanina	0,3 peso/volumen
	Mobil Par S-Defoamer	0,25 peso/volumen
	Tiosulfato sódico*	0,1 peso/volumen

15 * Agregado asépticamente a las 0-24 horas después de la inoculación desde una solución de reserva concentrada esterilizada por filtración, para dar la concentración final indicada.

El medio se prepara en agua desionizada, se ajusta a pH 7 con hidróxido sódico, se dispensan porciones de 40 ml en Erlenmeyers de 250 ml y se esterilizan en autoclave durante 20 minutos y se enfrían.

20 A una serie de matraces, preparados como se ha descrito antes, se añade D- o DL-lisina.HCl, sulfato de agmatina, cadaverina.HCl, 1,3-diaminopropano.2HCl, putrescina.2HCl, espermidina.3HCl y espermina.4HCl. Los matraces son idénticos en todos los aspectos a excepción de la presencia del aminoácido.

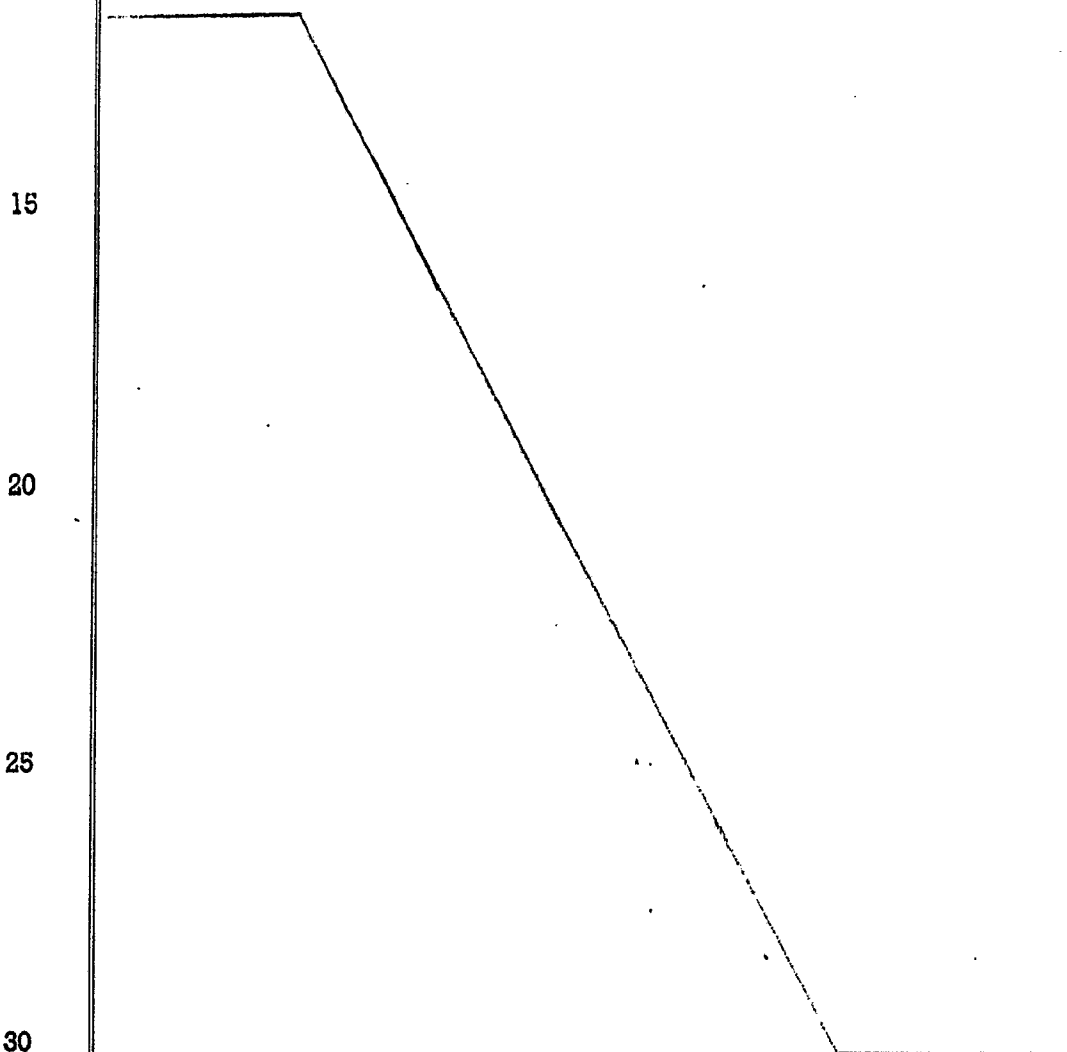
25 Se preparan soluciones de reserva concentradas de los aditivos en agua y se neutralizan con ácido clorhídrico o hidróxido sódico hasta pH 7. Las soluciones de reserva esterilizadas por filtración se agregan a los matraces que contienen el

30

1 medio de producción basal a las concentraciones finales deseadas inmediatamente antes de la inoculación con el organismo.

5 Después de la adición de los aditivos, el medio se inocula con 2,5 % en volumen de la siembra de la segunda fase y se incuba durante 96 horas a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5 cm) colocado a 220 rpm. Una vez completada la fermentación, las células se separan por centrifugación y el caldo clarificado se analiza para determinar la cefamicina C en la forma antes descrita con Vibrio parcolans ATCC 8461 como organismo de ensayo.

10



15

20

25

30

1	Aditivos al medio de producción basal	Ninguno	Aditivo	
			D-lisina.HCl 0,1 %	0, Prc
5	Ninguno	171	242	
	Agmatina.SO ₄ , 0,1 %	204	262	
	Cadaverina.2HCl, 0,1 %	185	267	
	1,3-Diaminopropano.2HCl, 0,1 %	307	397	
10	Putrescina.2HCl, 0,1 %	220	370	
	Espermidina.3HCl, 0,02 %	280	392	
	Espermina.4HCl, 0,02 %	415	478	
15				
20				
25				
30				

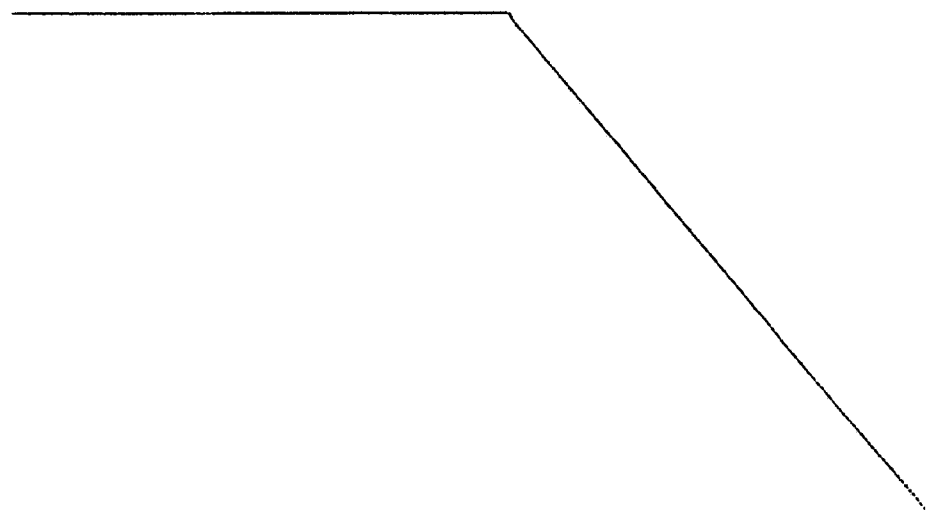
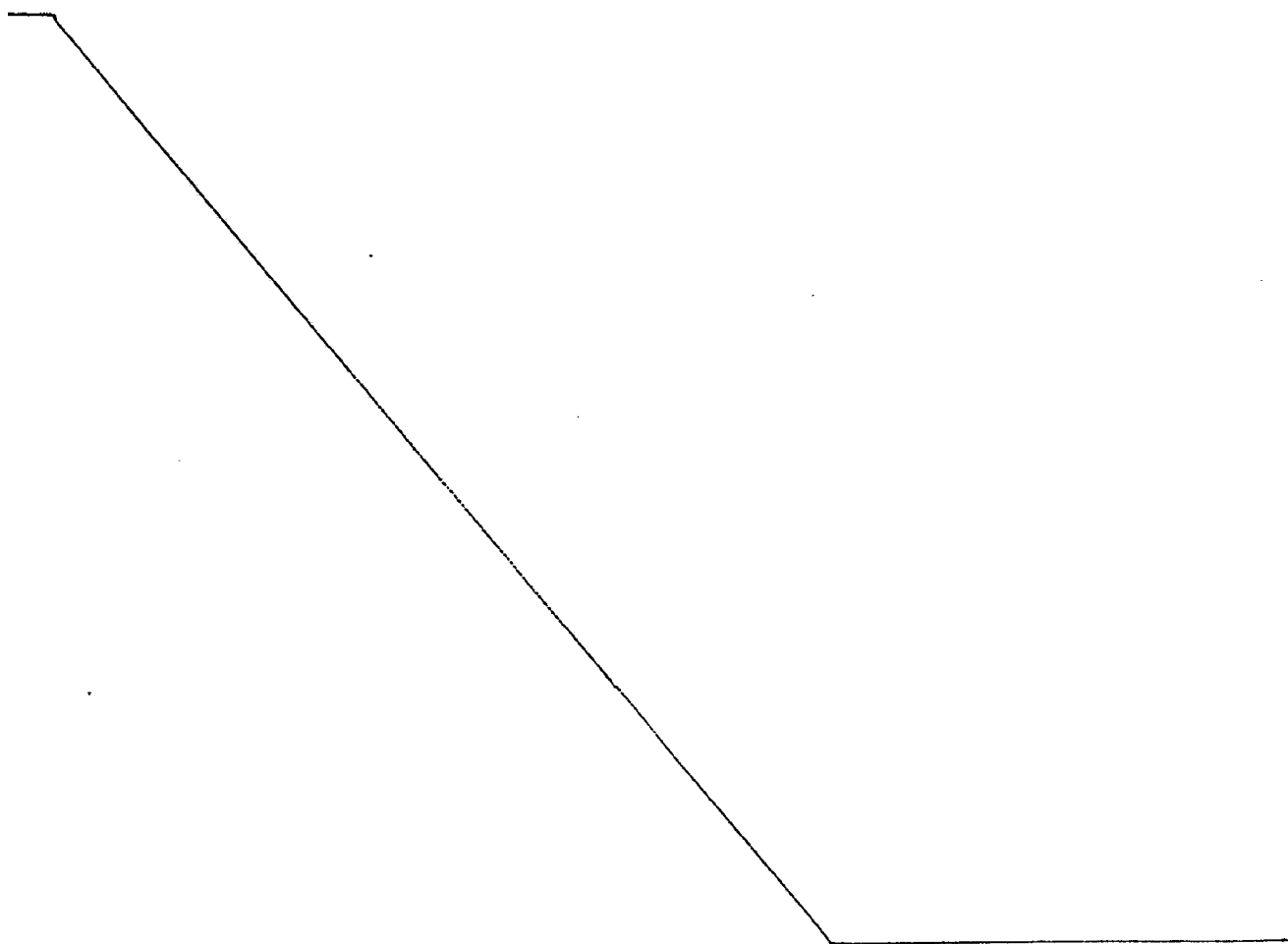


TABLA V

<u>Ninguno</u>	<u>Aditivos al medio de producción basal</u>			
	<u>D-lisina.HCl</u>		<u>DL-lisina.HCl</u>	
	<u>0,1 %</u>	<u>0,2 %</u>	<u>0,1 %</u>	<u>0,2 %</u>
	<u>Producción de cefamicina C (µg/ml)</u>			
171	242	301	157	184
204	262	294	226	237
185	267	306	225	235
307	397	392	347	317
220	370	399	245	236
280	392	478	306	333
415	478	478	487	471



1 Considerando la Tabla I, se observa fácilmente que
la adición de D- o DL-arginina y D- o DL-ornitina al me-
dio de fermentación estimula la producción de cefamicina C.
La Tabla II contiene ejemplos de la estimulación de la pro-
5 ducción de cefamicina C mediante los compuestos poliámini-
cos. Las Tablas III, IV y V muestran los resultados que po-
nen de manifiesto que la adición combinada de un aminoáci-
do con una poliamina dá lugar a una mayor productividad de
cefamicina C en comparación con la estimulación causada por
10 la adición separada de los compuestos. Los ejemplos demues-
tran claramente que la D- o DL-arginina o la D- o DL-orni-
tina, solas o en combinación con las poliaminas 1,3-diamino-
propano, 1,3-diamino-2-hidroxiopropano , N-metil-1,3-diamino-
propano, agmatina, espermidina, espermina, cadaverina y pu-
15 trescina o la D- o DL-lisina en combinación con dichas po-
liaminas ponen de manifiesto todas ellas el inesperado fe-
nomeno de estimular la producción del antibiótico cefamici-
na C.

20 Cualquier desviación de la descripción anterior que
se adapte a esta invención está pretendidamente incluida
dentro del alcance de las reivindicaciones.

En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

25 1.- Mejoras introducidas en un procedimiento para
la preparación de cefamicina C consistente en la fermenta-
ción aerobia de una cepa de Streptomyces en un medio de cul-
tivo acuoso que contiene fuentes de carbono y nitrógeno, sa-
les inorgánicas y trazas de metales, a una temperatura com-
prendida entre 20°C y 37°C aproximadamente y a un pH com-


30

1 prendido entre 6,0 y 8,0 aproximadamente, cuyas mejoras
comprenden la adición de un aminoácido seleccionado entre
el grupo formado por D- o DL-arginina, D- o DL-ornitina y
5 D- o DL-lisina y/o una poliamina seleccionada del grupo
formado por 1,3-diaminopropano, 1,3-diamino-2-hidroxi-
propano, N-metil-1,3-diaminopropano, agmatina, espermidina,
espermina, cadaverina y putrescina al medio nutritivo.

2.. Mejoras según la reivindicación 1, donde la
especie Streptomyces es Streptomyces lactamdurans

10 3.- Mejoras según la reivindicación 2, donde el
medio nutritivo es un medio nutritivo orgánico complejo.

15 4.- Mejoras según la reivindicación 3, donde el
medio nutritivo contiene alrededor de 0,025 a 0,40% (peso/
volumen) de los aminoácidos D- o DL-arginina o D- o DL- or-
nitina, calculados en forma de hidrocioruro; o alrededor de
0,01 a 0,2% (peso/volumen) de 1,3-diaminopropano, calculado
en forma de dihidrocioruro; o alrededor de 0,0025 a 0,05%
(peso/volumen) de espermidina o espermina, calculada en for-
20 ma de trihidrocioruro y tetrahidrocioruro respectivamente,
o alrededor de 0,025 a 0,2% (peso/volumen) de cadaverina o
putrescina, calculados en forma de dihidrocioruro; o alre-
dedor de 0,025 a 0,2% (peso/volumen) de agmatina, calcula-
da en forma de sulfato, o alrededor de 0,05 a 0,2% (peso/
volumen) de 1,3-diamino-2-hidroxiopropano o N-metil-1,3-dia-
25 minopropano, en forma de base libre.

30 5.- Mejoras según la reivindicación 1, donde el me-
dio nutritivo contiene los aminoácidos D- o DL-arginina ,
D- o DL-ornitina o D- o DL-lisina en una proporción de al-
rededor de 0,1 a 0,2% (peso/volumen), calculados en forma de
hidrocioruro en combinación con alrededor de 0,1% (peso/vo-

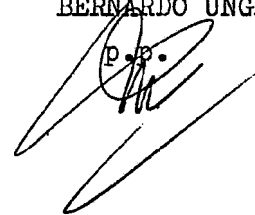
1 lumen) de 1,3-diaminopropano o cadaverina o putrescina, cal-
culados en forma de dihidrocloruro; o alrededor de 0,02%
(peso/volumen) de espermidina o espermina calculadas como
trihidrocloruro y tetrahidrocloruro, respectivamente, o al-
5 rededor de 0,1 % (peso/volumen) de agmatina, calculada en
forma de sulfato; o alrededor de 0,05 a 0,2 % (peso/volumen)
de 1,3-diamino-2-hidroxipropano o N-metil-1,3-diaminopro-
pano en forma de base libre.

10 6.- Mejoras según la reivindicación 5, donde se aña-
de DL-lisina y 1,3-diaminopropano en una proporción de alre-
dedor de 0,1% (peso/volumen), calculados en forma de hi-
drocloruro y dihidrocloruro respectivamente.

15 7:- Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
MEJORAS INTRODUCIDAS EN UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE
CEFAMICINA C.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de treinta y dos
páginas mecanografiadas.

Madrid, 7 septiembre 1.976
BERNARDO UNGRIA



25



30