

226 033

P. 14.111

A. 15.850
Case 1

Rehecha I

22 MAR. 1956

226033



MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

ter. C E R T I F I C A D O D E A D I C I O N

en

E S P A Ñ A

a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY., entidad nortea-
mericana, establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva
York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE
PRINCIPAL" número 217.171, expedida el 21 de Fe-
brero de 1955, por: "Un método para la obtención
de sustancias antibióticas".

=====

Este invento se refiere al tratamiento
previo de medios acuosos de fermentación que contienen
sustancias nutricias, para mejorar el rendimiento en
tetracilina desde ellos y es un perfeccionamiento o una

226033

modificación del invento según la Patente principal Nº.
217.171.

5 Es sabido que la tetracilina se produ-
ce haciendo fermentar medios acuosos que contienen sus-
tancias nutricias por microorganismos productores de te-
tracilina del género Streptomyces como se describe y
reivindica en la Patente principal 217.171. Asimismo
es sabido, que la clorotetraciclina se produce también,
junto con la tetraciclina, cuando hay iones cloruro. pre-
sentes en el medio.

10 Uno de los fines del presente invento
es proporcionar un medio de fermentación desde el cual
puede obtenerse ^{la} tetraciclina prácticamente exenta de
clorotetraciclina, cuestión en extremo deseable desde
el punto de vista terapéutico.

15 De acuerdo con el presente invento, se
crea un método para el tratamiento previo de un medio
acuoso de fermentación que contiene sustancias nutri-
cias, para mejorar el rendimiento en tetraciclina des-
de el mismo por fermentación de dicho medio con un mi-
croorganismo productor de tetraciclina del género Strep-
tomyces, que comprende el poner en contacto dicho medio
acuoso con una sustancia cambiadora de iones para disminuir
el contenido de iones cloruro del medio. El tratamiento es
25 continuado, de preferencia, hasta que el contenido en
iones cloruro del medio acuoso, sea menor de 50 partes
por millón y, preferiblemente, menor de 10 partes por



226033

millón.

Los microorganismos empleados comprenden cepas, variantes o mutaciones del S.aureofaciens y, especial las que producen, relativamente, grandes rendimientos de tetraciclina en el caldo de fermentación, especialmente las que producen más de 500 mcg/ml.

Un ejemplo es un organismo, el UV-8 que es una mutación del microorganismo de Tejas. Esta mutación es una nueva cepa que produce tales rendimientos en el medio de fermentación y es una cepa no descrita hasta ahora. La cepa UV-8, cuando se desarrolla en agar de Waksman (Journal Bacteriology:7:339-341,1922) origina un denso crecimiento micelial que es blanco sucio al principio, se vuelve amarillo y se recubre gradualmente de un micelio aéreo blanco y pulverulento que, más tarde, esporula. Los cultivos inclinados viejos presentan una coloración negra azabache con pequeñas manchas de micelio blanco. Este crecimiento negro está formado por una masa de cuerpos dispuestos en cadenas cortas que se fragmentan con facilidad. Estos cuerpos son variables en tamaño y forma oscilando aproximadamente desde 0,5 hasta 4,5 μ y variando en su forma desde ovals hasta esféricos-globulosos ligeramente angulares. El tamaño medio es algo mayor que el de los del S.aureofaciens (NRRL-2209) y hay en ellos mayores variaciones en tamaño y forma.

Se conocen muchas cepas de streptomyces

226033

capaces de producir clorotetraciclina y tetraciclina y aunque se cree que todas ellas pueden ser clasificadas con propiedad como Streptomyces aureofaciens, no obstante algunas marcadas diferencias en sus hábitos de desarrollo y necesidades nutricias (ver Duggar y otros - 5 Annals of the New York Academy of Sciences, Volumen 60 pp 71-101, publicado en 29 de Octubre de 1954) hay sin embargo quienes podrian inclinarse, por unas u otras razones, a afirmar que su microorganismo productor de tetraciclina pertenece a una especie diferente. En vista 10 de este posible conflicto de terminología y en vista de la naturaleza genérica del presente invento, los solicitantes, quieren incluir en él, el empleo de todos los microorganismos que tengan las propiedades de producir tetraciclina, tal como quedan antes expresadas. 15

La preparación de medios de fermentación que contengan menos de 10 partes por millon de ion cloruro, es comparativamente fácil si el medio es de los llamados "medios sintéticos", es decir, un medio en el 20 cual las exigencias en carbono para la fermentación, son suministradas por sustancias relativamente puras, tales como sacarosa y el nitrógeno lo es por sulfato amónico u otra sustancia química de gran pureza. Por desgracia, estos medios sintéticos son muy caros y carecen de algunos de los metabolitos esenciales para el desarrollo 25 de una fermentación de la que quiera obtenerse un gran rendimiento en tetraciclina. Por esta y otras razones



226033

no bien comprendidas, es deseable hacer uso, para la preparación de medios de fermentación, de sustancias que se presenten naturalmente, tales como por ejemplo, líquidos de fermentación de maiz, residuos líquidos animales, digeridos de caseina y similares. Estos materiales, no solo son más baratos que los de los medios sintéticos sino que dan por resultado rendimientos más elevados del antibiótico deseado. Desgraciadamente, estos materiales contienen cantidades importantes de iones cloruro y al producir tetraciclina por fermentación, dan lugar, concomitantemente, a grandes cantidades de clorotetraciclina.

Las sustancias naturales, tales como el líquido de fermentación de maiz, pueden ser diluidas con agua hasta una concentración conveniente para hacerlas pasar a través de una capa de cambio de iones, con lo que es eliminado el ion cloruro hasta el punto que se considere necesario. Las exigencias adicionales del medio de fermentación en nitrógeno, carbono y elementos minerales, pueden ser añadidas después a la solución de líquido de maiz desionizada y entonces queda dispuesto el medio de fermentación para su empleo en el procedimiento. El líquido de fermentación de maiz contiene cantidades importantes de iones cloruro del orden de 0,15% a 0,5% en peso y ha de tenerse mucho cuidado al tratar una sustancia de este tipo, más que en el caso de otras sustancias naturales empleadas en la preparación de medios

226033

de fermentación.

5 La caseína, que es una sustancia muy útil para preparar líquidos de fermentación, es frecuente contenga grandes cantidades de ion cloruro que dependen del procedimiento según el cual fué preparada, encontrándose cantidades de ion cloruro hasta del 0,30%. Los productos de la digestión enzimática de la caseína, que son también útiles para la preparación de medios de fermentación, pueden contener concentraciones de ion cloruro aún más elevadas y entonces, estos productos deben ser tratados de acuerdo con las enseñanzas del presente invento, si han de ser empleados en la preparación de líquidos de fermentación para la producción de tetraciclina.

15 Los residuos líquidos animales, los digeridos de harina de carne y de harina de pescado y otras varias sustancias, especialmente de origen animal, contienen grandes cantidades de ion cloruro y las soluciones preparadas a base de estas sustancias deben ser tratadas, de acuerdo con las enseñanzas del presente invento, para disminuir su contenido en ion cloruro.

20 Se comprende, naturalmente, que los componentes del medio de fermentación que estén en forma insoluble, no pueden ser pasados a través de las capas de cambio de iones sin que pronto los atasquen con depósitos insolubles. El procedimiento del presente invento considera el tratamiento de los componentes solu-



226033

bles del medio tales como se mencionan en esta Memoria. También las sustancias de elevada viscosidad pasan con dificultad a través de las capas de intercambio iónico y, por lo tanto, tienen que ser diluidas con agua hasta alcanzar una consistencia que permita un fácil flujo a través de las capas. En algunos casos, en los que deben ser añadidos materiales insolubles al medio de fermentación, estos pueden ser lavados con agua desionizada para quitar los iones cloruro antes de ser añadidos al medio de fermentación. Como es natural, la naturaleza de los materiales será la que dicte el tratamiento a seguir. El almidón bruto, por ejemplo, que con frecuencia contiene considerables cantidades de ion cloruro, puede ser lavado con agua desionizada, añadido al medio de fermentación y ser después cocido o tratado de otro modo para hacerlo adecuado para ser asimilado por el microorganismo fermentante. Las formas solubles de almidón, diluidas convenientemente, pueden ser pasadas a través de la capa de cambio de iones para eliminar los iones cloruro.

Los preparados a base de harina de soja, suelen contener cantidades excesivas de iones cloruro para la producción de tetraciclina y cuando se hace uso de materiales de esta clase en cantidades importantes deben ser tratados por las técnicas de cambio de iones tal como se describen anteriormente. Las mismas observaciones son de aplicación a los demás materiales natu-

226033

rales que se emplean para la preparación de líquidos de fermentación, si su contenido en ion cloruro es demasiada elevado.

5 Son preferidas las cepas productoras de tetraciclina de Strptomyces aureofaciens que produzcan más de 500 microgramos por mililitro del antibiótico. En tales casos, el medio de fermentación puede contener 10 partes por millón de ion cloruro, si bien son preferibles cantidades menores. Además, mejoras conseguidas en la selección de cepas de streptomyces productoras de tetraciclina, han dado por resultado un notable aumento en el rendimiento de tetraciclina que puede formarse, de modo que, en la actualidad, es fácilmente posible producir 5.000 microgramos por mililitro y aún más, de tetraciclina. Este resultado se consigue no sólo por la selección de cepas de producción de tetraciclina especialmente elevada, sino también por una selección cuidadosa de las sustancias que componen el medio de fermentación y por la restricción del contenido en ion cloruro. Nuestro invento, por lo tanto, considera el uso de cepas de S.aureofaciens capaces de producir cantidades de tetraciclina que sobrepasan los 500 microgramos por mililitro, en medios de fermentación que contengan materiales naturales del tipo que se emplea actualmente en otros procesos de fermentación y que, sin embargo, han sido tratados de manera que se elimine de ellos la mayor cantidad posible del ion cloruro. De esta manera, es posible obte-

10

15

20

25



226033

ner caldos brutos de fermentación que solo contengan, del total del antibiótico presente, una pequeña proporción en forma de clorotetraciclina.

5 Como se ha hecho notar anteriormente, es permisible aunque no deseable, que el caldo bruto de fermentación contenga, bajo forma de clorotetraciclina, tanto como del 8 al 10% del total de antibiótico. Como se verá, por lo tanto, un caldo de fermentación que contenga 5.000 microgramos por mililitro de tetraciclina, podrá contener hasta 500 microgramos por mililitro de clorotetraciclina, como resultado de la presencia de 10 40 a 50 partes por millon de ion cloruro en los medios de fermentación si el microorganismo es un usuario eficaz. Si la cepa en particular empleada en el proceso, no utiliza por completo los iones cloruro, el líquido de fermentación pueden contener aun mayores cantidades de ion cloruro. En tales casos, son muchos los materiales naturales que no necesitan ser tratados de acuerdo con el procedimiento del invento porque su contenido en 15 ion cloruro es ya suficientemente bajo. Sin embargo, los substratos más eficaces para la formación de elevados rendimientos del antibiótico, incluyen el líquido de fermentación de maiz que, como hemos visto antes, tiene un contenido en ion cloruro muy elevado y los líquidos de fermentación que contienen cantidades importantes de este material, pueden ser mejorados si son sometidos al 20 tratamiento.

226033

En común con otros procesos de fermentación para la producción de antibióticos, los líquidos de fermentación contendrán fuentes de carbono, nitrógeno y sales minerales asimilares. Muchas de estas fuentes están relativamente exentas de iones cloruro y son empleadas para suplementar los materiales antes aludidos, que son tratados con sustancias de cambio de iones de acuerdo con el presente invento. Incluyen sustancias tales como sacarosa, glucosa, dextrina, alcohol de azúcares, ácido cítrico, almidón, harina de semilla de algodón, harina de maiz, harina de soja, harina de cacahuet y otras varias sustancias carbonosas y nitrogenadas, que se emplean en cantidades variables y aproximadamente, del 1/2 al 5% en peso o más, del peso total del medio de fermentación. Con el propósito de obtener rendimiento y economía más elevados, se emplean con frecuencia mezclas de estas sustancias con los productos naturales mencionados anteriormente, y que han sido tratados con materiales de cambio de iones para quitar las cantidades excesivas de iones cloruro.

Comercialmente, también se añaden sales minerales a los medios de fermentación, en cantidades variables, para ayudar al desarrollo del microorganismo y fomentar elevados rendimientos de tetraciclina. Entre estas sales pueden ser mencionadas el fosfato amónico, fosfato potásico, sulfato magnésico, carbonato cálcico y varios elementos traza incluyendo el cobalto, sobre,



226033

cinc, manganeso, hierro, cromo y aún otros. El empleo de estos elementos traza para fomentar la fermentación, es bien conocido de los que se dedican a esta industria y, por lo tanto, no parece sea necesario detallarlo más.

5 Como resulta aparente, el tratamiento de soluciones acuosas que contengan materiales nutricios para el proceso de la fermentación, con el fin de eliminar los iones cloruro, puede, por efecto de la compacidad no selectiva de absorción de aniones de algunas sustancias para el cambio de aniones, tender a eliminar algunos de los aniones convenientes contenidos en el líquido de fermentación. Por ejemplo, en ciertas condiciones, el ion fosfato puede ser eliminado de la solución, análogamente, el ion sulfato puede también ser eliminado. Para evitar esta posibilidad y disminuir la carga de la columna de cambio de iones, se prefiere añadir, después de eliminar los cloruros por el tratamiento de cambio de iones, la mayoría de los elementos minerales, tales como fosfatos y sulfatos, así como los elementos

10

15

20

traza.

El objeto principal del tratamiento por cambio de iones es, naturalmente, quitar el exceso de iones cloruro de los materiales naturales que los contengan en cantidad excesiva. En ciertas condiciones, puede ser también deseable eliminar ciertos grupos de cationes antes de la fermentación. Por ello, puede hacerse uso, si conviene, de capas mixtas que eliminen tanto

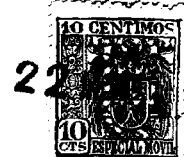
25

226033

cationes como aniones. El empleo y control de tales capas mixtas de cambio de iones, es asunto que queda dentro de la habilidad técnica y no hay que insistir más sobre ello.

5 Los materiales de permutación iónica considerados por el presente invento, incluyen aquellas sustancias insolubles en agua que tienen la propiedad de absorber o quitar de otro modo los iones cloruro de las soluciones acuosas. Son por lo general, resinas sintéticas que tienen grupos amino libres: por ejemplo, condensados de fenol-formaldehído-poliamina, resinas de melamina-guanidina-formaldehído, y resinas de polialkileno-poliamina. No se comprende bien del todo la naturaleza química exacta de estas sustancias ni la manera como ad-
10 sorben los iones cloruro. Sin embargo, pueden ser adquiridas de varios fabricantes, especificando que están destinadas a la eliminación de iones cloruro de soluciones acuosas. En el mercado libre se encuentran varios tipos.

15 Aunque en el presente invento podrían usarse sustancias que absorbieran simplemente los iones cloruro, esto no sería comercialmente factible porque no podrían ser vueltas a emplear. La palabra "cambio" se emplea en conexión con los materiales de cambio de iones del presente invento, para significar un material
20 que, después de absorber de la solución los iones cloruro, puede ser reactivado quitando los iones cloruro absorbidos y volviendo a emplear la resina de nuevo para
25



226033

preparación de nuevas cargas de líquido de fermentación.

Algunas capas de cambio de iones pueden funcionar de manera que solo quiten aniones de la solución; en otras, puede haber una sustitución. Por ejemplo, en una resina de cambio de iones que actúe en el ciclo de los sulfatos, son eliminados iones cloruro y cedidos iones sulfato para sustituir a aquéllos en la solución. Si bien no es necesario, por lo general, estos iones sulfato pueden ser absorbidos por una segunda capa de cambio de iones operada en tandem con la primera. Lo mismo puede decirse respecto a otros aniones que entren en operación. Por estas razones, es importante que las exigencias aniónicas de los medios nutricios, en fosfatos especialmente, sean ajustadas después del tratamiento de cambio de iones.

Después del tratamiento de algunos de los constituyentes de los medios de fermentación con resinas de cambio de iones, pueden ser adicionados al líquido tratado los restantes materiales necesarios que son empleados en el proceso de la fermentación, esterilizado el conjunto y sembrando con los microorganismos productores de tetraciclina. La fermentación se lleva a cabo, después, de la manera acostumbrada.

Durante la fermentación, es conveniente dejar que se desarrolle el organismo en condiciones de sumersión, con aireación y agitación adecuadas, como por ejemplo, en un matraz o aparato agitador o en fermentador

226033

5 con agitador, equipado con una alcachofa para inyectar continuamente una corriente de aire. La temperatura no parece ser crítica entre los 25°-35°C, si niem es preferible la gama de 30°-33°C. El pH inicial del medio, debe estar próximo a la neutralidad, si bien algo del antibiótico se produce en medios con valores iniciales del pH tan bajos como 5,0 o tan altos como 8,5.

10 Para mantener el pH dentro del intervalo adecuado, son útiles agentes tampon tales como el carbonato cálcico y sales de ácidos orgánicos como citratos, acetatos y lactatos. Además, los ácidos orgánicos pueden servir como fuente de carbono para el metabolismo o el microorganismo. Es de recomendar el uso de agentes anti-espumantes en los fermentadores de gran tamaño incluso aunque en esta fermentación, la formación de espuma no es un problema especialmente difícil y se reprime fácilmente con el empleo de los agentes anti-espumantes usuales, tales como el octadecanol en aceite de manteca de cerdo u otro anti-espumante comercial adecuado.

15

20

El inóculo para la fermentación puede ser preparado del crecimiento obtenido con cultivos inclinados inoculados con el S.aureofaciens. Un medio adecuado para los cultivos es el agar de Waksman, que

25 tiene la siguiente composición:



226033

Glucosa.....	10 g/l
Peptona.....	5 "
KH_2PO_4	1 "
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5"
Agar.....	20 "

5

El cultivo inclinado puede ser transferido a matraces de agitación que pueden ser utilizados como fermentadores de laboratorio en pequeña escala o para la producción de inóculo para inocular fermentaciones mayores.

10

Para la fermentación en tanques en gran escala, se emplea el cultivo inclinado para sembrar un medio líquido adecuado en un matraz que es agitado en una máquina de vaivén a una temperatura que oscila entre 26° y 35° C. Generalmente se emplea una segunda etapa de matraz de agitación, en conjunción con las fermentaciones en tanque sumergidas, con el fin de aumentar el volumen del inóculo agitado hasta hacerlo del 1,5% al 2,5% del volumen de líquido en el tanque. La reacción del medio del matraz de agitación, esta dentro del intervalo de pH 6,5 a 7,5 al comenzar y a medida que se va desarrollando el organismo, tiene lugar una caída continua del pH, habiéndose observado valores tan bajos como 3,8. Sin embargo, una edad fisiológica indicada por un valor del pH de unos 5,0 es, al parecer, el período más favorable para transferir el inóculo.

15

20

25

El inóculo del matraz de agitación, equivalente del 1,5% al 2,5% del volumen de líquido en el

226033

tanque, es transferido asépticamente a la cuba de fermentación donde se deja desarrollar durante 2 o 3 días, con agitación y aireación continuas. Pueden ser empleadas cantidades de aire desde 0,5 a 1,5 volúmenes de aire por cada volumen del medio líquido, según sea el tamaño de la cuba de fermentación. La formación de espuma en el caldo puede ser controlada por la adición estéril de una agente antiespumante, tal como el aceite de manteca de cerdo que contenga 2% de octadecanol.

10 Para la recuperación de la tetraciclina desde el caldo de fermentación, pueden emplearse las prácticas acostumbradas desarrolladas en conexión con otros antibióticos, tales como las conocidas extracciones con disolventes, con o sin portadores, o absorciones.

15 De los disolventes conocidos, tales como el butanol, acetato de etilo y cloroformo cuyo empleo implica fases de purificación subsiguientes, el butanol es el mejor para la extracción de la tetraciclina. Estos procedimientos conocidos, son aplicables con buen éxito en el

20 caso de caldos de fermentación en los que se hayan formado pequeñas cantidades de otros antibióticos que no sean la tetraciclina y donde el objetivo perseguido sea, sencillamente, efectuar la separación entre el contenido

25 total en antibiótico y los materiales inactivos clasificados de ordinario como impurezas. En el caso de que haya formación importante de sustancia antibiótica distinta de la tetraciclina, como sucede cuando el nivel



226033

en ion cloruro no es mantenido al mínimo y haya forma-
ción importante de clorotetraciclina, estos métodos co-
nocidos son de menor eficacia si se desea recuperar en
el producto final la tetraciclina a alta concentración,
5 prescindiendo de otras sustancias antibióticas. (Nos re-
ferimos aquí a antibióticos como sustancias antagonistas
con respecto al E. coli)

La recuperación se efectúa de preferen-
cia empleando un grupo especial de sales de amonio cua-
10 ternarias que precipitan, selectivamente, la tetracicli-
na del caldo a un pH alcalino (pH 8 a 11) como sal de a-
monio cuaternario de tetraciclina. Esta sal, después
de filtrada, es empastada con una pequeña cantidad de
agua y una relativamente grande de cloroformo, con lo
15 que la sal de amonio cuaternaria de tetraciclina se di-
suelve en la fase clorofórmica de la pasta. Después,
es preferible separar las fases acuosas y clorofórmicas
para eliminar cualesquiera impurezas disueltas en el a-
gua. Después se extrae la tetraciclina con una solución
20 acuosa ácida de un pH aproximado de 1 a 2,5 con lo cual
se forma la sal ácida de la tetraciclina que pasa a so-
lución en la fase acuosa, de la que es precipitada, co-
mo producto cristalizado, al aumentar el pH hasta un va-
lor de 3 a 7, dando comienzo la precipitación con el va-
25 lor más bajo.

Las sales de amonio cuaternarias espe-
cialmente útiles en este método de recuperación, son los

226033

cloruros de alquil-trimetilamonio y los cloruros de dialkil-dimetilamonio, en los que los grupos alifáticos contienen de 8 a 18 (inclusive) átomos de carbono.

EJEMPLO I.

5 Un medio de líquido de maceración de maiz
fué preparado de la siguiente manera. Líquido de mace-
ración de maiz conteniendo aproximadamente 50 % de só-
lidos p/p fué diluido con agua destilada hasta tener una
concentración final del 2%. El material diluido resu-
10 tante, fué pasado por una columna rellena con 30 litros
de una mezcla formada por 2 volúmenes de Amberlite IR
45, como resina de cambio aniónico y volumen de Amber-
lite IRC 50 como resina de cambio catiónico. La recogida
del líquido efluente no se empezó hasta que la resisti-
15 vidad se había elevado a 5.000 ohmios-centímetro y fué
continuada hasta que la resistividad descendió por ba-
jo de los 3.000 ohmios-centímetro. A 1.000 ml. del lí-
quido desionizado de maceración de maiz, se añadieron
los siguientes componentes para la preparación de un me-
20 dio adecuado para el desarrollo del inóculo y para la
producción de tetraciclina, para conseguir un medio que
contuviese 17 17 ppm. de cloruro, si bien es preferible
un contenido en cloruro más bajo.

25 Sacarosa 30,0 gramos
 K_2HPO_4 15,0 "



226033

	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	5,0	gramos
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,0	"
	CaCO_3	1,0	"
	KBr	0,05	"
5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	3,0	miligramos
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	2,5	"

Para la preparación de un inóculo, fueron repartidos volúmenes de 50 mililitros del medio antes descrito, en matraces Erlenmeyer de 250 mililitros y volúmenes de 400 mililitros en matraces de 2 litros. Para sembrar los volúmenes de 50 mililitros, que fueron agitados a 30° C. durante 72 horas en un aparato agitador de gvaivén (82 carreras por minuto con un desplazamiento de unos 75 mm), se hizo uso de un asa llena de esporas secas del desarrollo superficial del organismo de tetraciclina cultivado en tubo inclinado, en medio semi-sólido. Al cabo de este tiempo, 1,0 ml. de la suspensión micelial resultante, se empleó para sembrar 400 ml. del medio, que fué agitado otras 28 horas. Cuatro volúmenes de 400 ml. fueron reunidos asepticamente y empleados para sembrar la cuba de fermentación.

El medio de fermentación fué preparado en fermentadores de 100 litros de la siguiente manera: los componentes, a las concentraciones descritas anteriormente, fueron disueltos en 43,53 litros de la solución de líquido de maceración de maíz desionizado para

226033

un volumen final total de 59,80 litros. El medio fué esterilizado a 121°C. mediante inyección de vapor a 1,05 Kg/cm² directamente en la carga durante 30 minutos. El volumen ganado por la condensación del vapor compensó la diferencia, entre los 44 litros iniciales del líquido de maiz-azúcar-sales y los 60 litros finales requeridos. Después de enfriar a 30°C., la mezcla fué sembrada con los cuatro volúmenes reunidos de 400 ml. del inóculo antes descrito, agitados y aireados a razón de 1,6 volúmenes de aire por volumen del medio, durante, 38 horas. Al cabo de este tiempo, la reacción del caldo que tenía al comienzo un pH 5,9 había bajado a 4,1. La riqueza en antibiótico del caldo, fué de 20 mcg/ml. empleando la oxitetraciclina como patrón y contenía una importante cantidad de tetraciclina.

Soluciones de líquido de maceración de maiz a concentraciones de 1,5 y 2,0% fueron desionizadas con mezclas de resinas que contenían tres volúmenes de resina aniónica Amberlite IR 45 y 1 volumen de resina cationica Amberlito IRC 50 (unos 10 ensayos). Un ensayo fué hecho con resina mixta Rohm y Haas MB-1 (2 volúmenes de resina aniónica IRA 400 más 1 volumen de resina cationica IR 120). Se vió que era satisfactoria la proporción 1:3 de volumen de resina a volumen del efluente. Una proporción de paso de 0,01 ml. solución/ml. resina/minuto dió mejor desionización que 0,016 ml. solución/ml. resina/minuto. Con el empleo de dos columnas de resina



226033

en serie, se obtuvo buena desionización. El ensayo de ion cloruro en la solución desionizada de esta manera, demostró la presencia de 3,5 a 29 partes por millon.

EJEMPLO II.

5 Líquido de maceración de maíz con un contenido aproximado del 50 % de sólidos p/p, fué diluído con agua destilada hasta tener una concentración final del 1,5%. Este material diluído fué pasado a través de una columna rellena con una mezcla de tres volúmenes de
10 Amberlite IR 45, que es una resina de cambio aniónico, y un volumen de Amberlite IRC 50, que es una resina de cambio catiónico. La recogida del efluente no dió comienzo hasta que la resistividad hubo subido a 5.000 ohmios-centímetro y se continuó hasta que la resistividad bajó a menos de 3.000 ohmios-centímetro. Para la
15 preparación de un medio adecuado para el desarrollo del inóculo y la producción de tetraciclina, se añadieron a la solución desionizada de líquido de maíz las siguientes sustancias:

20	Sacarosa	2,0 %
	KH_2PO_4	1,5 %
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,5 %
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 %
	CaCO_3	0,1 %
25	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	50,0 ppm.

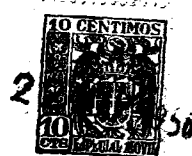
226033

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 3,0 ppm.
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 2,5 ppm.
KBr 0,05 %

5 Para su empleo en la preparación, tanto del inóculo como de los matraces de fermentación, este medio fué distribuído en partes alicuotas de 100 ml. en matraces Erlenmeyer de 500 ml. y esterilizado al autoclave durante 20 minutos a 121°C. y 1,05 Kg/cm². El contenido en cloruros del medio, después de la esterilización, fué
10 de 17,7 partes por millon.

El inóculo fué preparado sembrando matraces con una mezcla liofilizada de esporas y micelio del Streptomyces aureofaciens (cepa 201-15) e incubando los matraces a 26° C. durante 48 horas en un aparato agitador de vaivén. Se emplearon volúmenes al cinco por ciento del inóculo de 48 horas para sembrar los matraces de fermentación, que fueron incubados después en las mismas condiciones, durante 48 horas. Se demostró la actividad antibiótica, saturando con el caldo filtrado un disco de papel de 13 mm. colocando el disco sobre una placa de agar sembrada con Escherichia coli, e incubando a
15 20 30°C. durante 18 horas.

Cuatrocientos mililitros de esta papilla fueron tratados con 2,4 gramos de ácido oxálico y 1,6
25 gramos de oxalato amónico. Después de revolver la papilla durante 10 minutos, se filtró la mezcla. El filtrado fué agitado después con 80 ml. de acetato de etilo



226033

5 y el pH, ajustado a 8,5. La fase disolvente, que contenía la mayor parte de la actividad, fué agitada con 5 ml. de agua y el pH, ajustado a 2. Cuando se diluyó a 1/500 con la fase inferior del sistema butanol-agua conteniendo 2,5% ácido acético, se obtuvieron máximos de absorción en el ultravioleta de 270 m μ y 360 m μ .

10 Los análisis de distribución a contracorriente (48 transferencias butanol-ácido acético al 2,5%) de este concentrado, demostraron que contenía tetraciclina. Esto se consiguió al final de la distribución por dilución de cada una de las fases inferiores con metanol y midiendo la densidad óptica a 370 m μ . La mayor parte de la actividad se encontró en el tubo 19. Los números de los tubos de los máximos, para la clorotetraciclina y la oxitetraciclina, fueron 26 y 16 respectivamente.

EJEMPLO III.

20 Se llevó a cabo una fermentación en matraz agitado, idéntica en todos aspectos a la descrita antes, excepto en que las resinas aniónicas y catiónica empleadas fueron Amberlite IRA 400 (2 volúmenes) y Amberlite IR 120 (1 volumen), respectivamente. Después de la esterilización el medio contenía 13,3 partes por millón de cloruros. La actividad antibiótica fué comprobada en la papilla por el método del disco de papel y placa de E.coli.

25

22 MAR 1956

226033

5 Cuando esta papilla fué tratada para con-
centrar la actividad antibiótica, tal como queda descri-
to en el anterior ejemplo II, los datos de absorción en
el ultravioleta y de distribución en contracorriente re-
sultaron ser sustancialmente los mismos que los del me-
dio preparado con las resinas Amberlite IRC 50 e IR 45.

EJEMPLO IV.

10 Para la preparación del inóculo que había
de hacerse en un fermentador de 100 litros, se distribu-
yeron volúmenes de 50 ml. del medio descrito en el ejem-
plo II, en matraces Erlenmeyer de 250 ml. y volúmenes de
400 ml. en matraces de 2 litros. Para sembrar los volú-
menes de 50 ml. se hizo uso de un asa llena de esporas
secas del desarrollo superficial de un cultivo de S.aureo-
15 faciens (cepa T-5) en tubo inclinado y medio semi-sólido
y dichos volúmenes fueron agitados a 30° C. durante
72 horas en un aparato agitador de vaivén. Al cabo de
este tiempo, se empleó 1,0 ml. de la suspensión micelial
resultante para sembrar 400 ml. del medio, que fué agi-
20 tado durante 28 horas. Se reunieron asepticamente cua-
tro volúmenes de 400 ml. que se usaron para sembrar el
fermentador.

25 Al preparar el medio de fermentación, la
solución líquida de maceración de maiz fué llevada a la
concentración del 2 % y desionizada con la mezcla 1:3



22

226033

de resinas Amberlite IRC 50 e IR 45. Los restantes componentes del medio descrito en el ejemplo II, fueron disueltos en esta solución desionizada en cantidades tales que, después de 30 minutos de esterilización a 121° C. por inyección de vapor a 1,05 Kg/cm² directamente en la carga, el volumen ganado debido al vapor condensado dió lugar a un volumen total de 63 litros de medio por cada fermentador de 100 litros.

Después de enfriar a 30° C. los fermentadores fueron sembrados con volúmenes de 1,600 ml. del inóculo, agitados mecánicamente a 155-165 rev/minuto y aireados a razón de 1,6 volúmenes de aire por volumen de medio, durante 38 horas. Los caldos de dos de estas fermentaciones, contuvieron 81 y 116 \checkmark /ml de antibiótico respectivamente y fueron ensajados con S. lutea empleando la oxitetraciclina como patrón.

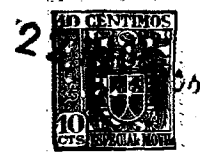
Noventa y seis litros de la papilla obtenidos por reunión de las cargas antes descritas, fueron tratados por 920 gr. de ácido oxálico y ajustado el pH a 3,5. Se añadió Hyflo, se filtró la mezola y la torta del filtrado fué lavada con 4 litros de agua. Reunidos el filtrado y las lavaduras, fueron extraídos, a un pH 8,5, con 20 litros de acetato de etilo que contenía 1 litro de Emulsept (N-[lauroil-colamino-formil-metil]-piridina). El extracto en disolvente fué después agitado, a un pH 2, con cuatro porciones sucesivas de agua de 140 ml. Estos concentrados acuosos fueron reunidos y

22 MAR 1950

226033

ajustados a un pH 7,8. Los sólidos que se separaron, fueron filtrados, lavados con agua y secados después en un desecador al vacío. Se obtuvieron 4,19 gramos que correspondieron en el ensayo a 904 γ /mg, lo que representa un rendimiento de actividad 41%. Se determinó la absorción en el ultravioleta de este material, en ácido sulfúrico 0,1 N, encontrándose máximos a 265 $m\mu$ y 360 $m\mu$, con mínimos de 232 $m\mu$ y 301 $m\mu$. Se distribuyeron cinco miligramos entre el cloroformo y el fosfato tampon de pH 7. Prácticamente, toda la actividad se encontró en la fase inferior. En estas condiciones, la oxitetraciclina se encuentra en la fase alta.

Cincuenta miligramos del producto fueron disueltos en la menor cantidad posible de ácido clorhídrico N y la solución sembrada con unos pocos cristales de clorotetraciclina, dejando después en reposo la mezcla a temperatura ambiente. La cristalización comenzó a los 15 minutos. La mezcla fué dejada en la nevera durante la noche. Al día siguiente fueron separados los sólidos cristalinos y secados sobre una placa de porcelana porosa. El espectro de absorción de los cristales en el ultravioleta, en solución sulfúrica 0,1 N, presentó máximos a 267 $m\mu$ y 360 $m\mu$ y mínimos a 234 $m\mu$ y 301 $m\mu$. Una solución de los cristales en ácido sulfúrico concentrado conteniendo ácido bórico, dió una coloración violeta rojiza. La oxitetraciclina y la clorotetraciclina dieron en análogas condiciones, coloraciones rojo cereza



226033

y púrpura respectivamente.

EJEMPLO V .

17,8 Kg. de Amberlite IR-4B, que es una resina débil de cambio aniónico del tipo fenol-formaldehídoepoliamina, vendida por Rohm y Haas, fueron neutralizados con ácido sulfúrico 1 N, metidos en una columna de 150 mm. hasta una altura de 190 cm. y lavados con agua hasta que el líquido efluente tuviese un pH de 2,0. 15,0 kg. de líquido de maceración de maiz fueron diluidos con 45 litros de agua y filtrados a 50°C. La torta fué lavada con 15 litros de agua. El líquido de maiz fué pasado por la columna a razón de 40 litros por hora. Después de haber sido tratado el equivalente de 13,5 litros del líquido, este daba reacción positiva de cloruros. El líquido tratado, libre de cloruros, fué ajustado a un pH 4,0 con hidróxido de amonio concentrado y quedó listo para su empleo.

Se preparó un medio de fermentación con los siguientes componentes:

- 20 Líquido de maceración de maiz tratado por resina 20 gm./L. (sólidos)
- Fórmula de maiz, "fluidéz" de-gradada por ácido sulfúrico 55 gm./L.
- Carbonato cálcico 8,0 gm./L.
- Harina de semilla de algodón 3,5 gm./L.
- 25 Sulfato amónico, especialmente bajo en cloruros 6,0 gm./L.

226033

Acido fosfórico (85%) 0,24 gm./L.
Aceite de manteca de cerdo 1,0% en volumen
Elementos traza: $\text{FeSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 41 mg./L.
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 100 mg./L.
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 50 mg./L.
5 Agua del grifo 1000 ml.

El medio fué esterilizado durante 15 minutos a 125°C.
y diluído después con 3 volúmenes de agua del grifo.
Este medio contenía aproximadamente, 24 partes por mi-
10 llon de ion cloruro. Fué inoculado después con 2% de
su volumen de S. aureofaciens, cepa S-77, que contenía
1% en peso, sobre la base de sólidos del inóculo, del
líquido de maceración de maiz, 3% de dextrina, 0,625 %
de carbonato cálcico y 0,2 % de sulfato amónico. La
15 fermentación fué llevada a cabo a 26-27° C. durante 112
horas con agitación mecánica y aireación, a razón de u-
nos 0,5 volúmenes de aire por volumen de medio, por mi-
nuto.

Al hacer la recogida, se encontró que el
20 caldo fermentado contenía más de 5.000 microgramos por
mililitro de tetraciclina con menos de 5% de dicha can-
tidad de clorotetraciclina.

Para regenerar la columna, se pasó a su
través ácido sulfúrico 1 N a razón de 100 litros por
25 hora, hasta que el efluente no contuvo ya iones cloruro
(se necesitaron 200 litros de ácido). Después se pasó



226033

agua a razón de 100 litros por hora hasta que el pH excedió de 2.0. Se necesitaron 450 litros de agua. La columna quedó en disposición de ser usada de nuevo. Esta columna ha sido usada quince veces sin que disminuyera su capacidad para eliminar cloruros o experimentara disminución el carácter nutritivo del líquido de maceración de maíz resultante.

EJEMPLO VI.

Se preparó una columna análoga a la del ejemplo V, empleando IRA-400, que es una resina fuerte de cambio de iones por absorción aniónica del tipo fenol-fórmaldehído-poliamina, fabricada por Rohm y Haas. El líquido de maceración de maíz fue pasada por la columna como en el ejemplo V y se preparó un medio de fermentación que fue esterilizado e inoculado con la misma cepa productora de tetraciclina del S.aureofaciens que antes y se efectuó la fermentación de manera análoga. Este medio de fermentación contenía, aproximadamente, 18 partes por millón de ion cloruro.

Al hacer la recogida en el caldo se encontró que contenía 3.510 gammas por mililitro de tetraciclina y 225 gammas por mililitro de clorotetraciclina.

EJEMPLO VII.

Se preparó una capa de resina mixta de

226033

5 cambio catión-anion con partes iguales de IRA-400 e IR-120. Esta última es una resina de fuerte cambio catiónico, del tipo ácido sulfónico, vendida por Rohm y Haas. Se trató después con solución 1 N. de sulfato amónico, de modo análogo al descrito en la preparación del de la columna del ejemplo V.

10 Fué tratado líquido de maceración de maiz tal como se describe anteriormente para quitar los iones cloruro con esta columna y se preparó un medio de fermentación de la misma manera que se describe en el ejemplo V. El medio, diluido y esterilizado, fué sembrado después con la cepa S-77 del S. aureofaciens y se efectuó la fermentación en las condiciones descritas en el ejemplo V. Al comenzar la fermentación, el medio
15 contenía, aproximadamente, 28 partes por millon de ion cloruro. En el caldo fermentado se encontraron 4.670 gammas por mililitro de tetraciclina y 390 gammas por mililitro de clorotetraciclina.

20

EJEMPLO VIII.

Se diluyó líquido de maceración de maiz con agua y se trató con nitrato de plata para eliminar el ion cloruro al estado de cloruro de plata. El líquido de maceración de maiz exento de cloruros, fué destinado a una fermentación análoga a la del ejemplo VII y
25 sembrando con S.aureofaciens y la fermentación se llevó



a cabo como anteriormente. El análisis del caldo fermentado dió un contenido de 3.000 gammas por mililitro de tetraciclina y 270 gammas por mililitro de clorotetraciclina.

5

EJEMPLO IX .

10

En experimentos efectuados en matraces de agitación, empleando los medios de fermentación del ejemplo V, y en los cuales, el medio fué enriquecido con 200 miligramos por litro de ácido fosfórico, se obtuvieron 2.830 gammas por mililitro de tetraciclina y 210 gammas por mililitro de clorotetraciclina.

15

Cuando la fermentación se llevó a cabo como en el párrafo precedente, empleando líquido de maceración de maiz no tratado, con 1% total de sólidos, se comprueba que el caldo fermentado contiene, aproximadamente, 1.600 gammas por mililitro de tetraciclina y 1.600 gammas por mililitro de clorotetraciclina, lo que demuestra la utilización del ion cloruro disponible en el líquido de maceración de maiz para producir mayores cantidades de clorotetraciclina.

20

EJEMPLO X.

25

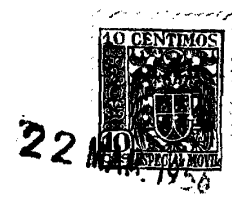
Con la resina de cambio aniónico se puede operar en varias formas tales como el sulfato, nitrato, hidróxilo y parecidas. Cuando el proceso descrito en el ejemplo V fué repetido con la resina de cambio de

226033

iones en el ciclo del nitrato, preparada por tratamiento con ácido nítrico en lugar de ácido sulfúrico, dos ensayos diferentes dieron 3.590 gammas de tetraciclina por mililitro y 210 gammas de clorotetraciclina por mililitro en un ensayo y 4.460 gammas de tetraciclina por mililitro y 230 gammas de clorotetraciclina por mililitro en el segundo ensayo.

En los anteriores ensayos, el líquido de fermentación contenía de 15 a unas 30 partes por millon de ion cloruro que fué totalmente utilizado por el microorganismo S.aureofaciens para producir toda la clorotetraciclina que era posible dado el contenido en cloruro del medio. Dados los elevados rendimientos en antibiótico que fueron obtenidos, hay que hacer notar, sin embargo, que la proporción de clorotetraciclina en estos ensayos, en los que se hizo uso de resinas de cambio de iones para tratar el líquido de maceración de maiz, es, en todos los casos, inferior al 8%.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América con fecha 12 de Enero de 1955, bajo el número 481.494, se acoge a los beneficios establecidos por el artículo 51 del vigente Estatuto-Ley sobre Propiedad Industrial.



226033

- N O T A -

Los puntos de invención, propia y nueva que se presentan para que sean objeto de este Certificado de Adición en España, son los siguientes:

5 1º.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal, o sea en métodos para el tratamiento previo de un medio acuoso de fermentación que contiene sustancias nutricias para mejorar el rendimiento en tetraciclina desde el mismo, por fermentación del mismo un con/microorganismo productor de tetraciclina del género
10 Streptomyces, métodos que consisten en poner en contacto dicho medio acuoso con una sustancia de cambio de iones para disminuir el contenido en ion cloruro del mismo.

15 2º.- Mejoras, de acuerdo con la reivindicación 1, según las cuales, se continua el tratamiento hasta que el contenido en ion cloruro del medio acuoso es inferior a 50 partes por millon y, preferiblemente, inferior a 10 partes por millon.

3º.- Mejoras, de acuerdo con las reivindi-

226033

caciones 1 o 2, según las cuales se añaden iones fosfato al medio después del mencionado tratamiento de cambio de iones.

5 4^a.- Mejoras, de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 3, según las cuales se emplea un medio natural tal como líquido de maceración de maíz, digeridos de caseína y líquidos residuales animales.

10 5^a.- Mejoras, de acuerdo con las reivindicación 4, según las cuales, el medio natural es diluido con agua hasta una consistencia inferior a un 5%, aproximadamente, en peso, sobre base seca.

15 6^a.- Mejoras, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, según las cuales el material de cambio de iones es un cambiador de aniones o una capa mixta de cambiadores de aniones y cationes.

7^a.- Mejoras, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, según las cuales, el organismo empleado es el S.aureofaciens.

20 8^a.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal N^o. 217.171.

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

La presente Memoria consta de treinta y cuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 22 de Mayo de 1951

P. A.

Alberto de Elzabur

Por A. A.