



P.- 19.817

259 057

259 057

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

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

formulada el 18 de Junio de 1.960, con el num. 259.057

en

E S P A Ñ A

por V E I N T E años

a nombre de INSTYTUT ANTYBIOTYKÓW, entidad polaca, establecida en Staroscińska-street nº 5, Varsovia, Polonia, por:

"UN METODO DE OBTENER TETRACICLINA"

El invento se refiere a un método para obtener tetraciclina por medio de la cepa 88 hasta ahora desconocida, de la especie Streptomyces, que se ha aislado del suelo en Polonia.

5 El antibiótico tetraciclina se produce por las cepas de la especie Streptomyces. Actualmente, la tetraciclina se obtiene por una fermentación que dura 48 horas, a una temperatura de 25-30° C., siendo heterogéneo el antibiótico producido a causa de que contiene cantidades considerables de

10 clorotetraciclina (que pueden disminuirse añadiendo sustancias de bloqueo). Además, los líquidos resultantes de la fermenta-



259057

ción, si se utilizan las cepas arriba mencionadas, contienen productos de metabolismo no muy bien definidos, que implican dificultades durante el tratamiento posterior, debido a la formación de una emulsión y de sedimentos en las fases in-
5 termedias. Este hecho implica la necesidad de emplear un aparato de separación complicado y aumenta el número de operaciones que son necesarias para obtener el producto listo para el uso.

El objeto del invento es acortar en una gran pro-
10 porción el tiempo de fermentación, obtener un líquido de fermentación que contiene exclusivamente tetraciclina, sin necesidad de añadir inhibidores para evitar la formación de cloro-tetraciclina, y eliminar los subproductos no bien definidos del metabolismo que se originan en los procedimientos com-
15 plicados hasta ahora empleados y que causan las dificultades explicadas en el tratamiento del líquido de fermentación.

De acuerdo con el invento, se alcanza este objeto usando la cepa 88 de la especie *Streptomyces* aislada del sue-
lo en Polonia y estableciendo las condiciones bajo las cuales
20 esta cepa produce la cantidad máxima del antibiótico. Esta cepa se diferencia de los productores de tetraciclina hasta ahora descritos, según resulta de las tablas que se dan más adelante.

Características de la cepa sobre un nutriente de
25 agar: glicerina, 1%; asparraguina, 0,05%; extracto de carne, 0,2%; K_2HPO_4 , 0,05%; agar, 1,5%; pH = 7,2.

259057

Cepa Streptomyces
aureofaciensCepa 88 de la espe-
cie Streptomyces

	Crecimiento	bueno	bueno
	Esporulación	bueno	bueno
	Pigmento soluble	falta	Verde parduzco
5	Micelio aéreo	hifas rectas, micelio gris	hifas rectas, micelio rosa deslustrado.
Sobre agar Czapek-Dox: dextrina, 1%; NaNO ₃ , 0,2%; K ₂ HPO ₄ , 0,1%; MgSO ₄ , 0,05%; KCl, 0,05 %, FeSO ₄ , indicios; agar, 1,5%; pH = 7,2.			
	Crecimiento	moderado	moderado
	Esporulación	pobre	pobre
	Pigmento soluble	falta	naranja-dorado
15	Micelio aéreo	pardo-cuero, hifas delgadas en una cantidad muy pequeña	naranja-intenso
	Licucción de gelatina	Sin licucción	Sin licucción
	Coagulación de leche al tornasol	Sin coagulación	Coagulación
20	Hidrólisis de almidón	pobre	pobre
	Crecimiento y color sobre nutriente de patata	bueno, gris oscuro	bueno, gris oscuro
	Reducción de nitratos	Sin reducción	Sin reducción
25	Producción nutriente con cloruro sódico	Indicios de tetraciclina	Indicios de cloro-tetraciclina, indicios de antibióticos no identificados x e y.
	Cromatografía en el sistema acetato de etilo saturado de agua	Clorotetraciclina Indicios de tetraciclina	Indicios de cloro-tetraciclina, tetraciclina, antibiótico x, antibiótico y
30	R _F en relación con clorotetraciclina	R _F , 1 clorotetraciclina R _F , 0,4 tetraciclina	R _F , 1 clorotetraciclina R _F , 0,4 tetraciclina R _F , 0,26 antibiótico x R _F , 0,15 antibiótico y

259057



La cepa aislada ha servido para obtener mutantes de producción por selección y utilizando agentes mutagenos preliminares tales como rayos ultravioleta, rayos x, dimetilimina y otros agentes conocidos.

5 La cepa puede preservarse en estado liofilizado durante 2 años sin perder su actividad.

Según se ha encontrado, la presencia de productos de avena en el sustrato de producción ejerce una influencia estimulante sobre el crecimiento del micelio y sobre el rendimiento del
10 antibiótico.

Para fermentación sumergida, como nutrientes que contienen una fuente de carbono asimilable, se utilizan productos de avena, p. ejemplo, copos de avena, almidón, dextrina, glucosa, sacarosa, melazas, etc.

15 Se ha encontrado que los productos de avena, entre otros, por ejemplo, los copos de avena, ejercen una acción estimulante y poseen propiedades antiespumantes.

Como fuente de nitrógeno asimilable se utiliza líquido de maceración del maiz, harina de cacahuete, harina de soja, levaduras, etc., y, como sales minerales, NaBr, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
20 NH_4NO_3 , NH_4Cl , etc.

El pH adecuado se ajusta por adición de CaCO_3 .

Se usan aceites vegetales como agentes antiespumantes.

De acuerdo con el invento, la fermentación de la cepa
25 88 de la especie *Streptomyces* se realiza p. ej. en tanques de hierro, preferiblemente a una temperatura de 30-32°C., en menos de 48 horas, preferiblemente en 30-42 horas, a un pH de 5,0-7,2. El procedimiento de fermentación se realiza en condiciones aeróbicas con una velocidad de aireación de 0,5-0,75 de volumen de
30 aire/volumen del sustrato/minuto, y se usa 1-10,0% de inóculo vegetativo.



259057

La determinación de la actividad de los líquidos de fermentación se hace por métodos biológicos y fisicoquímicos conocidos de modo general. Es muy importante la aplicación de diferentes nutrientes para las fases de siembra y para la fase de producción.

5 El tiempo de fermentación breve evita que el micelio experimente la autólisis y contribuye al acortamiento del tiempo y a evitar dificultades de filtración. A pesar del tiempo de fermentación corto, el método de acuerdo con el invento proporciona un contenido de antibiótico en el líquido que alcanza a 3000-4000 unidades/ml., lo cual no podía conseguirse en este período de tiempo por los métodos hasta ahora conocidos.

10 El antibiótico obtenido se aísla del líquido de una manera conocida, por precipitación en forma de una sal compleja o por extracción del líquido en disolventes orgánicos en un medio alcalino con el uso de vehículos, por reextracción en agua y salificación. Durante el aislamiento del antibiótico no se producen emulsiones ni sedimentos en las fases intermedias, cuando el antibiótico pasa a los disolventes orgánicos ni al reextraerlo a la fase acuosa.

15 El método del invento se explica más detalladamente por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. La cepa 88 de la especie *Streptomyces* se cultiva sobre un sustrato que está compuesto del modo siguiente:

25 5,0 % de salvado de trigo
2,0 % de agar agar.

Las esporas se inoculan sobre el sustrato de siembra que tiene la siguiente composición:

30 3 % de glucosa
0,5 % de levaduras

259057



1,25 % de líquido de maceración del maíz

0,5 % de NH_4NO_3

0,2 % de NaCl

0,4 % de CaCO_3

5 pH antes de la esterilización: 7,0.

El sustrato se esteriliza a una temperatura de 110-115° C. durante 30 minutos y después se incuba a una temperatura de 30-32° C. en 12-24 horas.

10 El material de siembra así preparado se inocula en el sustrato de producción que tiene la siguiente composición:

2,0 % de harina de pulpas de cacahuete

2,0 % de harina de patata

2,0 % de harina de avena

1,25 % de líquido de maceración de maíz

15 0,5 % de NH_4NO_3

0,2 % de NaCl

0,4 % de CaCO_3

0,75 % de aceite de cacahuete

valor del pH antes de la esterilización: 6,5.

20 La fermentación se realiza durante 42 horas a una temperatura de 30-32° C.

25 Se acidulan 2,5 litros de líquido tomado de los matraces, por medio de ácido oxálico, a un pH de 2,0 y después se filtran con diatomita. Se añade 0,1 % de cloruro de dimetil-lauril-bencil-amonio y 20 % de una mezcla de acetato de butilo y butanol en una relación de 4:1, al filtrado, y se ajusta el valor del pH a 8,0 por medio de NaOH . Después de agitar durante 30 minutos, se separa una fase orgánica clara. La extracción se realiza dos veces. Las fases orgánicas claras reunidas se condensan a presión reducida hasta la mitad de volumen, después

30



259057

259057

de lo cual se añade 10 % de agua y se ajusta el pH de la mezcla a 2,8 empleando H_2SO_4 (1:3). Después de una extracción en dos veces, la fase acuosa clara se junta y se añade a la misma 15 % de NaCl, después de lo cual se deja apartado el conjunto para cristalizar. Después de la filtración, se obtienen 4,0 gr. de hidroc-

5

Ejemplo II. Se acidulan 2 litros de líquido tomados de los matraces, con ácido oxálico, a un valor de pH de 2,5, después de lo cual se añade cloruro de dimetil-lauril-bencil-amonio en una cantidad de 0,1 % y se ajusta el valor del pH a 8,0. Después de una adición de 0,3 % de diatomita y de agitar durante media hora, se filtra. Una mezcla seca que tiene una actividad de 300 mcg/mg., aproximadamente, se extrae por medio de metanol que contiene 10 % de $CaCl_2$. La extracción se realiza tres veces, durante 1 hora cada una. Se reúnen los extractos, se condensan para obtener aproximadamente 100.000 mcg/ml. y luego se acidulan con HCl concentrado para precipitar clorhidrato de tetraciclina cristalizado. Se obtienen así 0,52 gr. de sedimento cristalino con una potencia de 945 mcg/mg.

10

15

20

Esta Solicitud, que corresponde a la presentada en Polonia el 20 de Junio de 1.959, bajo el número P 91.523, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25

N O T A

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

30

1ª.- Un método de obtener tetraciclina por fermentación



259057 259057

5 sumergida, en condiciones aeróbicas, caracterizado porque
el procedimiento de biosíntesis se realiza a una temperatu-
ra de 30-32° C., en 34-40 horas, empleando la cepa 88 de
la especie Streptomyces, que sobre un sustrato que tiene un
pH de 5,0-7,2, que contiene fuentes de carbono, nitrógeno
y sales minerales asimilables y, entre otros componentes,
10 productos de avena, produce, sin inhibidores de cloración,
exclusivamente, y con gran rendimiento, tetraciclina, que se
aisla del sustrato fermentado, pero, si los productos de ave-
na faltan en el sustrato, dicha cepa produce tetraciclina,
clorotetraciclina y otros dos antibióticos no identificados.

2º.- Un método de obtener tetraciclina.

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

15 Esta Memoria consta de ocho hojas escritas a máquina
por una sola de sus caras.

Madrid,

P.A.
