

13 ENE.



308241

PRIMER CERTIFICADO DE ADICION

en España, a favor de HOVIONE SOCIEDAD INDUSTRIAL Y CO  
MERCIAL DE PRODUCTOS QUIMICOS LIMITADA, entidad portu-  
guesa, residente en Lisboa, Travessa Do Ferreiro, A La-  
pa nº 1, por:

Mejoras en el objeto que constituye la Patente -  
principal nº 262.850, que se refiere a:

"PROCESO DE FERMENTACION Y AISLAMIENTO DE LOS PRODUC--  
TOS ACTIVOS DE LA MISMA".

.....  
MEMORIA DESCRIPTIVA

La patente de invención nº 262.850 describe al -  
Streptomyces lusitanus, que produce clortetraciclina -  
en presencia de iones de cloro y tetraciclina en un me  
dio libre de iones de cloro.

3 0 8 2 4 1 <sup>13</sup> E



- 2 -

- La presente solicitud adicional describe el uso de un aislado natural de *Streptomyces* y sus mutantes respectivos<sup>x)</sup>, para la producción de tetraciclina, -- con las características capaces de producir tetraciclina en presencia de iones de cloro sin coproducción simultánea de clortetraciclina. Siendo ésta cepa parecida en sus características taxonómicas al *Streptomyces lusitanus* descrito en la solicitud de patente portuguesa N° 37.424, se ha denominado intencionalmente *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini*. Después de una selección cuidadosa, bajo luz ultravioleta, se obtuvo una cepa altamente útil industrialmente de *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T y se depositó en la Colección Nacional de Bacterias Industriales, Aberdeen, Escocia, N° NCIB 9500.

- Se conocen diversos microorganismos productores de tetraciclina tales como: *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces sayamaensis*, *Streptomyces viridifaciens*, *Streptomyces psammoticus*, *Streptomyces persimilis*, etc. sin embargo, el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* se distingue en la producción de tetraciclina con un rendimiento tan alto que sobrepasa mucho la producción de cualquier otra especie conocida.

- El hecho de que el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* x) más particularmente su cepa industrial al respectiva, 106-T produzca tetraciclina en presencia de cloro es de gran interés industrial, ya que la

308241



- 3 -

5.- tetraciclina es realmente la más importante de todas las tetraciclinas desde el punto de vista de producción y venta, y la preparación del medio de cultivo conteniendo ión de cloro es más barata que la del medio decolorado.

10.- El *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* se aisló en Brive-la-Gaillarde, Francia, en un lugar denominado "Migoul". De acuerdo con los criterios de los sistemas de clasificación de Ettlenger et al. y Pridham et al. se determinó como una especie independiente de las citadas antes.

15.- El *Streptomyces lusitanus* var. *Tetracyclini* 106-T produce, según las condiciones de la fermentación, de 9 a 12 grs. de tetraciclina por litro de caldo fermentado. Debe advertirse que, en la presente descripción, la designación "gr/l" se refiere siempre a hidrocloreuro de tetraciclina, de acuerdo con la costumbre internacional.

20.- El *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T tiene esporoforas ramificadas simpodialmente, de fuertes a flexibles, sin formar espirales ni verticilos sino solamente ganchos abiertos, siendo la superficie de las esporas lisa cuando se observan a través del microscopio electrónico. La forma de las esporas es ovoide, midiendo de 0,6 a 0,8 $\mu$  por 1,3 a 1,7 $\mu$ ; el color "en masa" de las esporas da desde gris claro a ante verdoso; generalmente esporula muy bien, como -

25.-

308241

16 ENE



- 4 -

el *Streptomyces lusitanus* (CBS 101-A), en ciertos medios "ricos".

5.- Según la clasificación de Ettliger, el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* pertenece al grupo: rígido a flexible, ramificado simpodialmente, "griseus" a "cinnamoneus", de esporas lisas, con pigmento melanina.

10.- Según el sistema de clasificación de Pridham et al., el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T pertenece al grupo: "Retinaculum Apertum", serie "gris" a "ante verdoso".

Con la finalidad de comparar y diferenciar el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T, describimos a continuación las características de cultivo del:

15.- *Streptomyces lusitanus*, (CBS 101-A),  
*Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T,  
NCIB 9500,  
*Streptomyces aureofaciens*, NRRL 2209,  
*Streptomyces viridifaciens*, ATCC 11989,  
20.- en 14 medios diversos después de 16 días de incubación a 26° C.

1) Medio de Corn steep liquor al 0,6%, con composición:

25.-  
Agar agar 10 gr.  
Corn steep liquor 50% 3 gr.  
Glucosa 15 gr.

308241'



- 5 -

1) Medio de Corn steep liquor al 0,6%, con composición

	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2,5 gr.
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7,5 gr.
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 gr.
5.-	$\text{MnCl}_2$	0,002 gr.
	$\text{CuSO}_4$	0,002 gr.
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025 gr.
	Agua	500 cc.

pH 7, después de la esterilización.

- 10.- El micelio aéreo del *Streptomyces lusitanus* es gris claro, el del *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T marrón obscuro, el del *Streptomyces aureofaciens* gris obscuro y el del *Streptomyces viridifaciens* de gris a casi negro. El *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T produce un pigmento marrón obscuro difusible en comparación con el del *Streptomyces viridifaciens* que es más claro. Todas las cepas crecen bien.

- 20.- 2) Medio de corn steep liquor al 0,4%, con la misma composición que el medio 1), pero siendo la cantidad de corn steep liquor de 2 gr. en lugar de 3 gr. Las cuatro cepas crecen similarmente al medio nº 1, aunque el crecimiento es más lento.

- 25.- 3) Medio de gelatina, con la composición:
- |  |                   |         |
|--|-------------------|---------|
|  | Extracto de carne | 1,5 gr. |
|  | Peptona           | 2,5 gr. |

308241



- 6 -

3) Medio de gelatina, con la composición:

Gelatina 80 gr.  
 Agua destilada 500.gr.  
 pH 6,2 antes de la esterilización.

5.-

Los cuatro cultivos crecen similarmente, sin presentarse licuaciones. El *Streptomyces aureofaciens* y el *Streptomyces viridifaciens* no producen pigmento difusible, mientras que el *Streptomyces lusitanus* produce un pigmento amarillo y el *Streptomyces var. tetracyclini* 106-T un pigmento marrón amarillento.

10.-

4) Medio Czapek-Dox-Dextrina, de composición:

Dextrina 5 gr.  
 $\text{HNO}_3$  1 gr.  
 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 gr.  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,25 gr.  
 KCL 0,25 gr.  
 $\text{FeSO}_4$  un cristal pequeño  
 Agar agar 7,5 gr.  
 Agua destilada 500 cc.  
 pH 6,8 después de la esterilización.

15.-

20.-

El *Streptomyces lusitanus* y el *Streptomyces lusitanus var. tetracyclini* 106-T no crecen en éste medio, pero el *Streptomyces aureofaciens* y el *Streptomyces viridifaciens* dan un crecimiento vegetativo coloreado de amarillo típico de éstas especies productoras de tetraciclina.

25.-

5) Torta de patata.

Se lava una torta de patata ( $\phi$  1,5 cm. 3 a 6 cm. de alta) con una solución al 10 % de carbono de sodio y se esteriliza en un tubo de ensayo junto con 1,5 cc. de agua destilada.

3 08241



- 7 -

5.- El *Streptomyces aureofaciens* y el *Streptomyces viridifaciens* crecen bien con el color típico amarillo dorado, característico de éstas especies, en comparación con el color bronceado del *Streptomyces lusitanus* y el bronce oscuro del *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T.

6) Agar de Bennet, con la composición:

	Estracto de jiste	0,5 gr.
	Extracto de carne	0,5 gr.
10.-	Caseina hidrolizada	1 gr.
	Glucosa	5 gr.
	Agar agar	10 gr.
	Agua destilada	500 cc.

15.- El pH, ajustado a 7, da después de la esterilización 6,7.

20.- El crecimiento de los cuatro cultivos es similar al obtenido con los medios 1) y 2), pero el *Streptomyces aureofaciens* y el *Streptomyces viridifaciens* no forman micelio aéreo y las esporas "en masa" del *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T son de color marrón, siendo las del *Streptomyces lusitanus* gris-blancas. El *Streptomyces aureofaciens* y el *Streptomyces viridifaciens* no forman pigmento difusible, aunque el *Streptomyces lusitanus* y el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T producen un pigmento marrón oscuro.



7) Medio de glicerina - asparagina, con la composición:

Glicerina	5 gr.	: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 gr.
Asparagina	0,25 gr.	: Agar agar	7,5 gr.
Extracto de carne	1 gr.	: Agua destilada	500 cc

5.- pH 6,9, después de la esterilización.

El *Streptomyces lusitanus* y el *Streptomyces aureo*  
*faciens* no producen micelio aéreo; el primero presen-  
 ta un crecimiento y pigmento marrones, y el último,  
 un crecimiento ligeramente blanco amarillento sin for-  
 mación de pigmento. El *Streptomyces lusitanus* var. -  
 tetracyclini 106-T crece bien formando un micelio aé-  
 reo marrón claro muy escaso del mismo color que el -  
 del *Streptomyces lusitanus*. El *Streptomyces viridifa-*  
*ciens* crece bien con un micelio aéreo gris claro muy  
 abundante, sin formación de pigmento difusible.

8) Medio Czapek-Dox, con la composición:

	NaNO <sub>3</sub>	1 gr.
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 gr.
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25 gr.
20.-	KOL	0,25 gr.
	FeSO <sub>4</sub>	un cristal pequeño
	Agar agar	7,5 gr.
	Agua destilada	500 cc.

pH 7,1 después de la esterilización.

25.- El *Streptomyces lusitanus* y el *Streptomyces lu-*  
*sitanus* var. tetracyclini 106-T no crecen en éste me-  
 dio, como tampoco en todos los medios que contienen -  
 nitratos inorganicos como único origen de nitrógeno.

3 0 8 2 4 1



- 9 -

El *Streptomyces aureofaciens* y el *Streptomyces viridifaciens* crecen bien, sin ningún micelio aéreo, presentando el típico color amarillo claro.

9) Agar de Emerson, con la composición:

5.-	Extracto de jiste	2 gr.
	Almidón soluble	7,5 gr.
	$K_2HPO_4$	0,5 gr.
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 gr.
	Agar agar	10 gr.
10.-	Agua destilada	500 cc.

pH 7, después de la esterilización.

El *Streptomyces lusitanus* crece bien en éste medio con color marrón liláceo, sin micelio aéreo, y pigmento difusible marrón; el *Streptomyces lusitanus* var *tetracyclini* 106-T crece similarmente a la cepa original de *Streptomyces lusitanus* pero forma un micelio aéreo color ante verdoso claro. El *Streptomyces aureofaciens* se caracteriza por un crecimiento desvanecido, sin formación de pigmento; el *Streptomyces viridifaciens* crece mejor, formando escaso micelio aéreo y pigmento difusible amarillo claro.

10) Medio Czapek-Do-Almidón, con la composición:

	Almidón soluble	5 gr.
	$NaNO_3$	1 gr.
25.-	$K_2HPO_4$	0,5 gr.
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 gr.
	KCL	0,25 gr.



10) Medio Czapek-Do-Almedón, con la composición:

FeSO<sub>4</sub> un cristal pequeño  
 Agar agar 7,5gr.  
 Agua destilada 500 cc.  
 pH 7, después de la esterilización.

5.-

Los resultados son similares a los de los otros medios conteniendo nitratos. El *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T no crecen, mientras que el *Streptomyces aureofaciens* y el *Streptomyces viridifaciens* crecen con un color amarillo naranja, sin pigmento o micelio aéreo.

10.-

11) Leche de tornasol.

pH 6,45 antes de la esterilización.

Los cuatro cultivos crecen muy lentamente en un anillo alrededor del tubo de ensayo sin asimilar o coagular la leche. Hay una diferencia ligera, pero aparente, en el pH del *Streptomyces lusitanus* y el del *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T por una parte y por otra entre el del *Streptomyces aureofaciens* y el del *Streptomyces viridifaciens*.

15.-

20.-

12) Medio nutriente, con la composición:

Extracto de carne 1,5 gr.  
 Peptona 2,5 gr.  
 Agar agar 7,5 gr.  
 Agua destilada 500 cc.

25.-

El pH después de la esterilización es 6,8.

Los cuatro cultivos son similares, pero el *Streptomyces lusitanus* y el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T forma un pigmento difusible

308241



- 11 -

más obscuro que el del *Streptomyces aureofaciens* y el del *Streptomyces viridificiens*.

13) Medio de glucosa - asparagina, con la com  
posición:

5.-	Glucosa	1 gr.
	Asparagina	0,25 gr.
	Extracto de carne	1 gr.
	$K_2HPO_4$	0,25 gr.
	Agar agar	7,5 gr.
10.-	Agua destilada	500 cc.

El pH después de la esterilización es 6,9

El *Streptomyces lusitanus*, el *Streptomyces aureofaciens*, y el *Streptomyces viridificiens* crecen -  
similarmente con micelio aéreo pero el *Streptomyces*  
15.- *lusitanus* y el *Streptomyces viridificiens* forman un  
pigmento difusible amarillo obscuro sucio. El *Streptomyces*  
*lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T no forma mi-  
celio aéreo, siendo el pigmento difusible similar al  
del *Streptomyces lusitanus*.

20.- 14) Medio de Sucrosa-Dextrina-Nitrato, con la  
composición:

	Dextrina	5 gr.
	$NaNO_3$	1 gr.
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25gr.
25.-	KCl	0,25 gr.
	Dextrosa	15 gr.

308241



- 12 -

16 ENL

$\text{FeSO}_4$  un cristal pequeño  
Agua destilada 500 cc.  
pH 7 después de la esterilización.

El *Streptomyces lusitanus* y el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T no crecen en éste medio, mientras que el *Streptomyces aureofaciens* presenta un crecimiento vegetativo amarillo claro siendo el crecimiento vegetativo del *Streptomyces viridifaciens* naranja obscuro.

10.- La utilización de un origen de carbono por el *Streptomyces lusitanus* no fué posible de determinar al principio aplicando el método de Okhi (OKHI, N.: Kitasoto Arch. Exp. Med. 25, 209, 1.953), en vista de que ésta cepa no crece en presencia de nitrógeno inorgánico

15.- como único de nitrógeno. Se aplicó entonces el método de Pridham y Gottlieb según lo describen Zahner y Ettlenger en Arch. f. Mikrobiol., Vol. 25, 307, 1957. Las observaciones se hicieron al décimo día. La tabla aneja de comparación hace referencia únicamente a los seis orígenes de carbono considerados por Zahner y Ettlenger como característicos e importantes para la determinación de las especies.

En consecuencia, desde el punto de vista de la utilización del origen de carbono y según la clasificación de Zhner y Ettlenger, el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T y el *Streptomyces lusitanus* var. 101-A pertenecen al grupo III y el *Streptomyces aureofaciens*

25.-

308241



- 13 -

al grupo IIIa.

UTILIZACION DEL ORIGEN DE CARBONO POR

5.-	Origin de carbono no.	Streptomices lusitanus var. tetracyclini	Streptomices lusitanus var. tetracyclini	Streptomices lusitanus var. tetracyclini	Streptomices lusitanus var. tetracyclini	Streptomices lusitanus var. tetracyclini	Streptomices lusitanus var. tetracyclini
		106-T; 101-A	106-T; 101-A	106-T; 101-A	106-T; 101-A	106-T; 101-A	106-T; 101-A
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
10.-		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-

- Sin utilización      + Utilización positiva  
 + Utilización positiva      o negativa según las cepas.  
 15.- .. Sin datos disponibles  
 (-) Utilización improbable; (+ Utilización probable.

1 Zahner y Ettlinger, Arch. F. Mikrobiol., 26, 307, 1957.  
 2 Benedict et al., Appl. Microbiol. 3, 1, 1955.  
 20. # 3 Patente de Estados Unidos nº 2.886.595.

En cuanto a los orígenes de carbono, no específico desde el punto de vista de la clasificación, las cuatro cepas muestran una utilización positiva de glucosa y dextrosa. El Streptomyces lusitanus var. tetracyclini 106-T y el Streptomyces lusitanus 101-A no crecen en presencia de la lactosa, mientras que el Strep-

25.-



tomyces aureofaciens y el Streptomyces viridifaciens. si crecen. La única diferencia entre el Streptomyces lusitanus var. tetracyclini 106-T y el Streptomyces lusitanus 101-A es que el primero crece mucho en presencia de la trehalosa como fuente de carbono, mientras -  
5.- que el último no crece.

Ambas estreptomycinas, la lusitanus y la lusitanus var. tetraciclina, se desarrollan en la celulosa, mientras que las estreptomycinas aureofaciens y viridifaciens no pueden utilizar la celulosa como origen de carbón.  
10.-

Queda entendido que el presente invento describe un procedimiento industrialmente útil, y en consecuencia el Streptomyces lusitanus var. Tetracyclini 106-T es una cepa industrial seleccionada y el estudio taxonómico de la misma no puede ser, en sí mismo, suficiente de acuerdo con la actual concepción generalmente -- aceptada de clasificación. Por la misma razón, los cultivos de los aislados originales de suelo de Streptomyces lusitanus y Streptomyces lusitanus var. tetracyclini han sido preservados y son objeto de depósito en diversas colecciones de cultivos.  
15.-  
20.-

De acuerdo con esto, se ha hecho la diferencia-- ción taxonómica de otras especies conocidas como productoras de tetraciclina, comparando los aislados originales así como las cepas industriales, objeto de la presente patente de invención.  
25.-

308241



- 15 -

- En consecuencia, como las diversas selecciones de cepas industriales no crecen o crecen muy escasamente en medio de Ettlenger de formación de pigmento melanoide (extracto de jiste 0,5 gr., L-tirosina 0,5 gr., NaCl 4,25 gr., ágar 8 gr., agua decentada 500 cc.), no fué posible, por lo tanto la valoración de pigmento melanoide con el *Streptomyces lusitanus* var. *Tetracyclini* 106-T. Los aislados originales (cepas madres de las industriales) de *Streptomyces lusitanus* y *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* fueron especialmente estudiadas en éste medio. El *Streptomyces lusitanus* forma en dos días, en éste medio de tirosina un pigmento rojizo (consistente, con toda probabilidad, o de halocromo ó de 5,6 dihidroxiondol) que se oxida lentamente en un pigmento obscuro cuyo color no se altera con la variación de pH. La curva de absorción ultravioleta del pigmento extractado es idéntica a la descrita por Schmidli para el pigmento de melamina en *Helvetica Chimica Acta*, 38, 1078, 1955. El *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* forma inmediatamente después de 3 á 4 días (sin formar el pigmento rojo intermedio) un pigmento negro similar desde todos los puntos de vista a la "melanina sintética" obtenida por oxidación de dopa ( $\beta$ - (3-4-dihidroxifenil)- $\alpha$ - alanina).
- 5.-
- 10.-
- 15.-
- 20.-
- 25.-
- Así, tanto el *Streptomyces lusitanus* como el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* forman pigmento melanoide sobre pigmento de tirosina, aunque a través de dos



pasos diferentes, mientras que ni el *Streptomyces aureofaciens* ni el *Streptomyces viridifaciens* forman pigmento melanoide por ningunos de aquellos pasos.

5.- La cepa madre del *Streptomyces lusitanus* var *tetracyclini* tiene una tendencia a formar esclerocia en ciertos medios, como por ejemplo en el de tirosina - agar de Ettlenger.

10.- El *Streptomyces lusitanus* 101-A y el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T, así como sus cepas madre crecen a 50° C. No se observó formación de verticilos con el *Streptomyces lusitanus* ni con el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini*, mientras que en cultivos maduros de *Streptomyces aureofaciens* y de *Streptomyces viridifaciens* se encuentran a menudo verticilos.

15.-

La tabla siguiente resume las diferencias taxonómicas más importantes existentes entre *Streptomyces lusitanus* y el *Streptomyces aureofaciens*.

20.-

Características de diferenciación.	<i>Streptomyces lusitanus</i> var. <i>tetra</i> 106-T	101-A	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
------------------------------------	---	-------	----------------------------------

Morfología de Esporofora	Ramificación simpodial; sin verticilos.	Ramificación simpodial; sin verticilos.	Ramificación monopodial; verticilos presentes.
--------------------------	---	---	--

25.-

Color de las esporas en masa.	cinnamoneus to griseus	cinnamoneus to griseus	Ceniciento
-------------------------------	------------------------	------------------------	------------



Formación de pigmento melanoide en medio de tiro sina	Sin crecimiento pa madre positiva)	Sin crecimiento pa madre positiva)	Negativo
---	------------------------------------	------------------------------------	----------

5.- Utilización de la fuente de nitrógeno inorgánico.

	Negativa	Negativa	Positiva
--	----------	----------	----------

10.- Utilización de la fuente de carbono según Zahnar y Ettlinger.

	Pertenece al grupo IIIe	Pertenece al grupo IIIe	Pertenece al grupo IIIa
--	-------------------------	-------------------------	-------------------------

15.- La anterior comparación muestra que el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T difiere sólo ligeramente (dentro de los límites de variación de una especie científicamente admitidos) del *Streptomyces lusitanus* (CBS 101-A) productor de clortetraciclina y que las diferencias son muy acentuadas y significativas entre el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* y el *Streptomyces aureofaciens* o el *Streptomyces viridifaciens*.

20.- La única importante diferencia entre los aislados originales (estirpes madre) y las estirpes industriales (*Streptomyces lusitanus* 101-A y *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T), consiste en que ambas estirpes madres pertenecen al grupo "Spira",



mientras que las estreptomycinas lusitanus 101-A es "Rectus flexibilis" y las estreptomycinas lusitanus var. tetraciclina 106-T es "Retinaeculum apertum". los esporoforos de las cuatro estirpes están, sin embargo, ramificados simpodialmente.

5.- El simple hecho de que el Streptomyces lusitanus var, tetracyclini 106-T produzca de 2 a 5 g/litro de tetraciclina más que el valor más alto hallado en la literatura de un microorganismo productos de tetraciclina prueba indirectamente su independencia y representa una mejora industrial considerable para la producción de tetraciclina.

10.- Se halló que el uso de un hidrolizado de almidón permite incrementar la cantidad de fuente de carbono por litro de caldo, siendo acompañado dicho incremento por un aumento considerable de rendimiento en actividad antibiótica por litro de caldo fermentado, aunque tanto el Streptomyces lusitanus como el Streptomyces lusitanus var. tetracyclini hidrolizan el almidón.

15.- Los resultados se obtuvieron con un hidrolizado conteniendo no más del 20% de almidón de cereal no hidrolizado y no más del 20% del di- y monómero, consistente en oligómeros. El usar dicho semihidrolizado de almidón, se puede añadir hasta 65 gr/l de almidón de cereal o aún de considerablemente menores cantidades causando una casi solidificación del medio resultando así impracticable una fermentación sumergida. Los rendimientos en tetraciclina sobrepasan general -

20.-

25.-

308241



- 18 -

- m<sup>ente</sup> los 12 gr./l en tales condiciones. Por otra parte, éste incremento en fuente de carbono permite eliminar el uso de aceite de manteca de cerdo como origen de carbono, sin una pérdida considerable de rendimiento, lo que representa una gran ventaja en los países en que éste tiene que ser importada (como los países musulmanes). El control de la espuma puede hacerse entonces utilizando una pequeña cantidad de agentes antiespumantes de silicona.
- 5.-
- 10.- El medio nutritivo ~~gaseo~~ para fermentación industrial del *Streptomyces lusitannus* var. *tetracyclini* 106-T contiene fuentes asimilables de nitrógeno inorgánico, carbono y sales minerales, incluidos cloruros, favorables al crecimiento del microorganismo.
- 15.- Como fuente de nitrógeno se puede utilizar hidrolizado de caseína, extracto de malta, cebada o maíz, corn steep liquor, harina de cacahuet, harina de soja, etc. Los nitratos inorgánicos no son utilizables.
- 20.- Como fuente de carbono se pueden utilizar diversos carbohidratos tales como glucosa, dextrosa, maltosa, trehalosa, almidón, hidrolizado de almidón, dextrina, grasas animales o vegetales, o ácidos grasos.
- 25.- En los ejemplos se indican las cantidades y proporciones de los nutrientes.
- La adición de N,N'-dibenciletildiamino (DBED) como acetato o lactato en una concentración entre 0,01 y 1,5 gr. por litro provoca un rendimiento más alto.



5.- comparado con el de experimentos simultáneos paralelos realizados sin la adición de DBED. El DBED se añade al caldo dividido preferiblemente en diversas porciones, durante la fermentación. La fermentación se realiza a una temperatura comprendida entre 24° a 30° C bajo agitación comprendida entre 0,1 a 4,0 partes/minuto del volumen a fermentar de acuerdo con la fase de fermentación.

10.- El tiempo de fermentación necesario para obtener el rendimiento más alto varía de 96 a 150 horas, según las condiciones de formulación.

El caldo fermentado no contiene ninguna cantidad medible de clortetraciclina, hasta tal punto es selectiva la producción de tetraciclina.

15.- Una prueba indirecta de que el *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* es una especie independiente del *Streptomyces aureofaciens* es el hecho de que el color impartido a toda la masa recogida (sin contener clortetraciclina) es esencialmente

20.- diferente del descrito para el *Streptomyces aureofaciens* en la patente de los Estados Unidos N° 3.092.556. La reflexión espectrofotométrica del total de la masa recogida del *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T se mide en celdas de vi-

25.- drio de un centimetro en longitudes de onda entre 400 á 700 m $\mu$ , utilizando carbonato de magnesio como referencia. Los valores de reflexión (R) y las co-

308241



- 2A -

5.- rrespondientes longitudes de onda se representan linealmente sobre un gráfico, estableciendo una curva de reflexión característica. Se traza entonces una línea recta a través de la curva de reflexión a guiones interceptando a 400 mμ y 550 mμ y se mide la distancia vertical entre ésta línea y la curva de reflexión en 420 mμ y 430 mμ. Estos valores se representan por los símbolos  $\Delta R_{420}$  y  $\Delta R_{430}$  respectivamente. En el caso del Streptomyces aureofaciens, según la patente de los Estados Unidos n° 3.092.556,  $\Delta R_{420}$  es mayor que  $\Delta R_{430}$  y en el caso del Streptomyces lusitanus var. tetracyclini 106-T  $\Delta R_{420}$  es siempre más pequeño que  $\Delta R_{430}$ , aunque no hay presente cantidad demostrable de clortetraciclina (<50 mcg/ml) en la masa de Streptomyces lusitanus var. tetracyclini 106-T.

10.-

15.-

Una vez que la formación está completada, se extrae el principio activo y se purifica según el procedimiento descrito en la patente principal -- n° 37.424) o el descrito en la patente n° 40.718, aunque los ejemplos a continuación dan una descripción clara del procedimiento de purificación.

20.-

El producto final obtenido bajo la forma de hidrocioruro de tetraciclina tiene las siguientes características físicas y químicas: descomposición alrededor de los 214° C; rotación óptica  $[\alpha]_D^{24} -258$  (C, 0,5 en 0,1 N HCL); es muy soluble en agua, me

25.-



tanol y etanol. Los análisis de elementos de la base trihidrato corresponden a la fórmula -  
 $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot 3H_2O$ , con un punto de fusión de  $170^{\circ}$  a  $175^{\circ}$  C (dec.).

5.- El producto obtenido corresponde, bajo la forma de base o bajo la de hidrocioruro, en todas las características químicas, físicas y biológicas, a las descritas en la literatura para la tetraciclina.

10.- Las ventajas industriales del presente procedimiento utilizando la variedad natural del *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T consiste principalmente en los rendimientos muy altos - obtenidos y en el barato medio de cultivo necesario.

15.- Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar el actual procedimiento de invención sin restringir de ninguna manera su amplitud:

EJEMPLOS

20.- 1) Se prepararon todos los medios con agua decentada, teniendo 1 litro de medio esterilizado la siguiente composición:

	Corn steep liquor 50 %	10 gr.
	Azúcar	10 gr.
25.-	$CaCO_3$	1 gr.
	$(NH_4)_2HPO_4$	2 gr.

EJEMPLOS

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 gr.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 gr.
Agua	hasta 1000 cc.

5.- (pH 6,4 después de la esterilización)

Se inoculó con 1 ml. de una solución, en salina fisiológica, de esporas maduras de *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T y se incubó a 26° C en una redoma en un agitador rotativo durante 36 horas.

10.-

Después se inoculó un fermentador con un volumen de trabajo de 150 lts., conteniendo un medio de la siguiente composición:

Corn steep liquor 50 %	35 gr.
$\text{CaCO}_3$	13 gr.
Azúcar	5 gr.
Agua	1.000 cc.

15.-

(pH 6,7 después de la esterilización)

con el antes mencionado cultivo de 36 horas y se fermentó a 26° C bajo agitación y aireación estéril durante 24 horas.

20.-

Finalmente, se inoculó un fermentador con una capacidad útil de 6.000 litros, conteniendo un medio de la siguiente composición:

Corn steep liquor 50 %	28 gr.
Carbonato de calcio	14 gr.
Almidón	38 gr.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,7 gr.

25.-

308241



- 24 -

	$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5 gr.
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,05 gr.
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,002 gr.
	$\text{ZnSO}_4$	0,05 gr.
5.-	Harina de cacahuet	25 gr.
	Aceite de manteca de cerdo	35 gr. por litro
		de agua de cantada.

(pH 6,7 a 6,8 después de la esterilización)

- 10.- con el antes mencionado cultivo de 24 horas y se fermenta a  $30^\circ \text{C}$  durante 24 horas con una aireación de 1,5 l/l minuto. Se bajó entonces la temperatura a  $26^\circ \text{C}$  y se incrementó lentamente la aireación de tal forma que, pasadas 140 horas, alcanzó 4 l/l minuto.
- 15.-

Después de 140 horas de fermentación se obtiene 11,1 gr. de tetraciclina por litro, sin detectar clortetraciclina ( $<50 \text{ mcg/ml.}$ ).

- 20.- 2) Se procede como en el ejemplo 1), pero se añade al último medio de cultivo 0,5 gr/l de N,N'-dibenciletilenodiamina diacetato en cuatro porciones iguales a 0,36, 72 y 98 horas de la fermentación. Después de 140 horas, la cantidad de tetraciclina obtenida es de 12,3 gr/l.

- 25.- 3) Se acidifica la masa fermentada obtenida en el ejemplo 1) hasta pH 1,5, con un 25 % de ácido sulfúrico y se filtra mediante un filtro de tambor,

308241



- 25 -

- se extrae dos veces la torta con agua a pH 1,5. Se añade al filtrado unido 18 kgs. de "Versene" (tetracetato de etilenodiamina, agente secuestrador) y 16,5 kgs. de diacetato de DBED, y después se ajusta lentamente el pH a 9,7 con un 12 por ciento de amoniaco. Después de 3 horas de agitación se filtra el precipitado que consiste esencialmente en complejo de tetraciclina DBED impuro con la fórmula de DBED. .Ca. (tetraciclina)<sub>2</sub>. El precipitado húmedo se suspende entonces en agua se acidifica con una solución acuosa al 10 por ciento de ácido oxálico hasta pH 1,5 bajo agitación. Entonces se filtra la solución y se ajusta el pH a 5,8 con una solución acuosa al 10 % de hidróxido de sodio. Se filtra el precipitado, se seca y se lava bajo vacío a 65° C. El rendimiento calculado en actividad es del 83,5 por ciento.

- 4) Se procede como en el ejemplo 3), pero en lugar de DBED A se añaden 16 Kgs. de N,N'-dibenciletilenodiamina ( $C_6H_5 \cdot CH=N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot N=CH \cdot C_6H_5$ ) a pH 6. El rendimiento efectivo de actividad calculado es del 86 %, en forma de base.

- 5) Se procede como en el ejemplo 1), pero se substituye la composición del medio de cultivo del fermentador principal por lo siguiente:

- |                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Corn steep liquor 50 %         | 31 gr. |
| Carbonato de calcio            | 14 gr. |
| Semihidrolizado de almidón con |        |



teniendo no más del 20 % de almidón de cereal no hidrolizado y no más del 20 % de mono- y - dimeros, estando presente la cantidad resultante como oligomeros.

5.-		63 gr.
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,7 gr.
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5 gr.
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,05 gr.
10.-	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,002 gr.
	$\text{ZnSO}_4$	0,05 gr.
	$\text{FeSO}_4$	0,04 gr.
	Harina de cacahuet	25 gr.
	Aceite de manteca de cerdo	28 gr.
15.-	Aceite de cacahuet	4 gr.

(pH 6,7 a 6,8)

El rendimiento final es 12,2 gr/l. No hay clor tetraciclina detectable (<50 mcg/cc) en la masa. De la curva de reflexión de toda la masa recogida se obtiene para  $\Delta R$  los siguientes valores:  $\Delta R_{420} = 18$  y  $\Delta R_{430} = 92,4$ .

6) Se produce como en el ejemplo 5) pero se omite el aceite de manteca de cerdo y el aceite de cacahuet y se controla la formación de espuma añadiendo un agente antiespumoso de silicón. El rendimiento después de 136 horas de fermentación es 10,1 gr/l. No se detecta en la masa clortetraciclina.

3 08241



- 27 -

5.- 7) Se inoculan 40 cc. de medio de cultivo esterilizado de la fórmula descrita en el ejemplo 1) para fermentación final con esporas germinantes de *Streptomyces lusitanus* var. tetracyclini 106-T en una redoma de Erlenmayer de 300 cc. y se incuba durante 7 días a 28° C en un agitador rotatorio. La curva de reflexión de toda la masa recogida se determina entonces y se calculan los valores  $\Delta R$ , dando:  $\Delta R_{420} = 3,8$  y  $\Delta R_{430} = 34,2$ .

10.-

NOTA

Se declaran como de novedad y propiedad para todo el territorio español el contenido de las siguientes:

R E I V I N C I A C I O N E S

15.-

1ª.- "Proceso de fermentación y aislamiento de los productos activos de la misma", caracterizadas porque se fermenta un medio de cultivo acuoso conteniendo carbohidratos asimilables y nitrógeno orgánico; así como sales minerales, incluido cloruro, por medio de *Streptomyces lusitanus* var. tetracyclini, particularmente una cepa industrialmente útil del mismo, designada 106-T, o por sus mutantes o variaciones, bajo condiciones aerobias sumergidas a una temperatura de 24° a 30° C, hasta que se alcanza la actividad antibiótica substancial, y por el consiguiente aislamiento de la tetraciclina del caldo formado.

20.-

25.-

2ª.- "PROCESO DE FERMENTACION Y AISLAMIENTO DE

308241



- 28 -

LOS PRODUCTOS ACTIVOS DE LA MISMA".

A efectos de la Prioridad y de conformidad con lo dispuesto en los convenios internacionales de los que - España es signataria, se reivindica expresamente la obtenida con la adición a la Patente portuguesa nº 37.424 de 17 de Enero de 1.965.

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de VEINTISIETE hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 16 de Enero de 1.965

**E. GONZALEZ VACAS**  
P.<sup>a</sup>P.