

318910

25



318910

MEMORIA DESCRIPTIVA de Patente de  
Invención que, por veinte años en España y posesiones,  
solicita la firma ANKERFARM, S.p.A., establecida en  
Cinisello Balsamo (Milán), Viale Lombardia, 5, por :  
"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE TETRACICLINA"

Inventores: Dr. Enzo Zannini - Vía Costanza, 9 Milán  
Dr. Ermanno Piacenza - Vía Milazzo, 1 Crema  
Giuseppe Fabbri - Vía Luciano Manara, 18  
Binasco - (Milán)

--oo O oo--

Este invento hace referencia a un procedimiento  
para la producción de tetraciclina y, más particular -  
mente, a un nuevo procedimiento de fermentación para  
producir tetraciclina en alto rendimiento por medio  
del uso del microorganismo *Streptomyces* sp. 1616, de-  
positado en la Colección Americana de Tipos de Cultivo,

5

**POOR  
QUALITY**

318910

25



-2-

Washington, D.C., con el número 15299.

El Streptomyces sp. 1616 fué situado en el suelo de Somma Lombardo, Italia. El Streptomyces sp. 1616 difiere de cualquier microorganismo hasta la fecha registrado en la literatura como útil en la producción de tetraciclina. Produce tetraciclina en presencia de iones de cloro. Además, hemos descubierto que la presencia de carbonato de estroncio en el medio de fermentación mejora señaladamente el rendimiento de tetraciclina en el procedimiento de fermentación empleando Streptomyces sp. 1616, y que, substituyendo un cierto porcentaje de cloruro de amonio con fosfato de amonio, permaneciendo siempre sin cambio la cantidad de nitrógeno de amonio en la media, el metabolismo de los carbohidratos se activa con un incremento en el rendimiento de antibiótico del 10 al 20 por ciento.

Las principales características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y de cultivo del Streptomyces sp. 1616, conforme a las reglamentaciones del Subcomité de Taxonomía de los Actinomicetes, publicadas en el International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, Vl. 13, nº 3, pág. 169-170 (Julio de 1.963), son las siguientes:

a) Observaciones morfológicas:

1. Morfología de los hyphae: reticulatum apertum, según Pridham.

2. Forma y tamaño de las esporas: de redondas a ovales, ligeramente angulares, superficie lisa, tamaño: 0,5 a 1,1  $\mu$  x 1.3-2.2  $\mu$

318910



-3-

3. Presencia de esporangia globular: no.

4. Presencia de esporas flageladas: no.

5. Capacidad para formar micelio aéreo: el micelio aéreo se desarrolla solamente en algunos medios:

40

Si está presente es de blanco a gris a marrón.

6. Formación de conidioforas y conidia en el subtrato: no.

7. Tendencia fragmentarse del micelio: no.

8. Incidencia de esclerocia: no.

45

b) Colores: Véanse las tablas

c) Caracteres fisiológicos:

1. Utilización de los siguientes carbohidratos:

Rafinosa : -

Sorbitol : -

50

Manitol : -

Arabinosa : -

Glucosa : ++

Sucrosa : +

Maltosa : -

55

Lactosa : ±

Xilosa : ±

Rammosa : ±

Fructosa : ±

Almidón  
de maíz : +++

60

d) Temperatura: Sin crecimiento a los 50°C

En Virgilio, Hennegheller, El Farmaco, Ed.Sc. Vol. 3, 164-171, 1960, y en la patente británica nº 775.139, se describe el microorganismo Streptomyces psammotucus, como capaz de producir tetraciclina en presencia de

318910

25



-4-

65 iones de cloro. Hemos hecho una comparación entre  
 las cepas de Streptomyces sp. 1616 y las caracterís-  
 ticas morfológicas y de cultivo del Streptomyces  
psammoticus, según se describe en la literatura, y  
 hemos establecido de forma concluyente que las dos  
 70 cepas son diferentes. Así, una comparación mano a  
 mano de tales organismos, revela lo siguiente:

	Str. psammoticus	Str. sp. 1616
75	Esporoforas (+) rectus flexibilis	retinaculum apertum
	Color de espora (+) oliva-ante	rojo-gris
	Esporoforas (++) simpodialis-rameadas flexibles	monopodialis-rameada de espirales abiertas
	Color de espora (++) grisácea	canela cenicienta

80 (+) Pridham et al.: Applied Morphology, Vol. 6, p. 52-79, 1958  
 (++) Ettlenger et al. Archiv Mikrobiologie, Vol. 31, 326-358, 1958

85 Después de esta primera investigación, hemos comparado nuestra cepa Streptomyces sp. 1616 también con todas las cepas que producen clorotetraciclina ( y tetraciclina en medio declorado y en la presencia de inhibidores de la cloración).

90 Las cepas que pertenecen a este grupo y las referencias de la literatura de las mismas son las siguientes:

Streptomyces aureofaciens descrito en Duggar,

318910

25



v5-

Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 51, p.177, 1948 y Patente de los Estados Unidos 2.482.055.

95            Streptomyces viridifaciens descrita en la patente de los Estados Unidos nº 2.712.517.

Streptomyces persimilis descrita en la patente británica nº 799.051.

100           Streptomyces RO 1441 descrita en la patente británica nº 722.149.

Streptomyces P 4871 descrita en la patente británica nº 790.953.

Streptomyces ATCC 11652, 11653 y 11654 descrita en la patente británica nº 787.895.

105           Hemos comparado el Streptomyces aureofaciens ATCC 10762 con el Streptomyces sp. 1616 realizando los ensayos morfológicos, fisiológicos y de cultivo en el medio, que se han usado por los diversos investigadores para la clasificación del Streptomyces aureofaciens; las demás cepas han sido comparadas con los datos hallados en la literatura existente. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas:

110

T A B L A    1

	Peptona . . . . .	10 gm
115	Glucosa . . . . .	20 gm
	ClNa . . . . .	5 gm
	Agar . . . . .	18 gm
	H <sub>2</sub> O    hasta	1.000 cc

---

Cepa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio Aéreo	Esporas
------	-------------	--------------------	---------------	---------

---

# 318910

25



-6-

120	Str.1616	Moderado	naranja claro a rojo	blanco a rojizo - blanco	XXX
	Aureofaciens ATCC 10762	Considerable	topacio a naranja amarillo	blanco a grisáceo blanco	
125	ATCC 11652	XX	XX	XX	XX
	ATCC 11653	XX	XX	XX	XX
	ATCC 11654	XX	XX	XX	XX
	Feofaciens	XX	XX	XX	XX
	RO 1441	XX	XX	XX	XX
130	P 4871	XX	XX	XX	XX
	Persimilis	XX	XX	XX	XX
	Viridifaciens	XX	XX	XX	XX
	Fuscofaciens	XX	XX	XX	XX

135      XX = Sin describir  
 XXX ≠ Sin crecimiento

T A B L A      2

GELATINA-DIRCO

140	Cepa Str. 1616	licuefacción completa
	Aureofaciens ATCC 10762	sin licuefacción detectable
	ATCC 11652	XX
	ATCC 11653	XX
145	ATCC 11654	XX
	Feofaciens	XX
	RO 1441	sin licuefacción
	P 4871	sin licuefacción
	Persimilis	sin licuefacción detectable

# 318910



-7-

150 Viridifaciens XX  
Fuscofaciens sin licuefacción

XX = Sin describir

T A B L A 3

GLUCOSA-ASPARGINA-AGAR :

155 Glucosa ..... 10 gm  
Aspargina ..... 0,5  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 0,5  
Extracto de carne .. 2  
Agar ..... 18

160 H<sub>2</sub>O destilada hasta 1000 cc  
pH = 6,8

Cepa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
165 Str.sp.1616	Bueno	Naranja claro con guiones rojos	Rojizo gris	XXX
Aureofaciens			Blanco a gris	Gris ratón
ATCC 10762	Abundante	Incoloro	claro	
ATCC 11652	Considerable	Ante a canela ante	Escaso, balanco	Blanco a gris marrón a gris ratón
170 ATCC 11653	Moderado	Naranja	Blanco	Blanco a marrón claro
ATCC 11654	Moderado a bueno	Incoloro a marrón	XXX	XXX
Fcofaciens	Escaso	Amarillo claro a marrón claro	Blanco a amarillo claro	Muy escaso, marrón claro a marrón obscuro
175 Viridifaciens	Bueno	X	Gris claro	Gris claro
RO 1441	X	Amarillo a marrón	Blanco	Gris
P 4871	Bueno	Abundante	Blanco a gris	Gris

318910



130	Persimilis	X	Amarillo a marrón	Blanco a gris claro	Gris oscuro
	Fuscofaciens	Escaso a moderado	Púrpura-marrón	XXX	XXX

X = No facilitado por los autores

XXX = Sin crecimiento.

T A B L A 4

185	<u>AGAR NUTRIENTE</u>				
	Peptona	.....	5	gm	
	Extracto de carne		.5		
	ClNa	.....	5		
	Agar	.....	20		
190	H <sub>2</sub> O destilada hasta	1000	cc		
	pH = 7,2 a 7,4				

Copa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas	
195	Str.1616	Escaso	Naranja rojo a rojo marrón	XXX	XXX
	Aureofaciens	Moderado	Topacio	Blanco a grisáceo blanco	X
	ATCC 10762				
	ATCC 11652	Escaso a moderado	Blanco cremoso	XXX	XXX
200	ATCC 11653	Escaso a moderado	Ante	XXX	XXX
	ATCC 11654	Escaso a moderado	Blanco cremoso	XXX	XXX
	Feofaciens	XX	XX	XX	XX
	RO 1441	Abundante	Marrón	Blanco nieve	X
	P 4871	Abundante y característico	X	XX	X
205	Viridifaciens	Buena	Alquitrán a marrón claro	X	X
	Fuscofaciens	Escaso a moderado	XX	XX	XX

# 318910



Persimilis Escaso a mo- Marrón Blanco nieve X  
derado

X = No registrado

210 XX = No descrito

XXX = Sin crecimiento

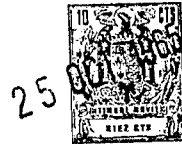
T A B L A 5

AGAR SINTÉTICO CZAPEK-DOX :

	Sucrosa .....	30 gm
215	NaNO <sub>3</sub> .....	2
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,5
	ClK .....	0,5
	FeSO <sub>4</sub> .....	0,01
220	Agar .....	20
	H <sub>2</sub> O destilada hasta 1000	cc
	pH = 7,0 a 7,3	

Cepa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
225		Sin crecimiento		
	Aureofaciens			col. Piping Rock
	ATCC 10762	Abundante	Blanco	Blanco a gris ratón 13A2 (+) a gris ratón
	ATCC 11652	Escaso	XX	XXX
230	ATCC 11653	Escaso	XX	Blanco Gris ratón
	ATCC 11654	Escaso	XX	Sin crecimiento en la superficie XXX
	Feofaciens	X	Ligero	XXX
	RO 1441	Escaso	XXX	XXX
	P 4871	Muy escaso	XXX	XXX
235	Persimilis	Moderado a bueno	XI	Gris ratón Bueno

318910



Viridifaciens Escaso      XX                      X                      X

X = No registrado

XXX = Sin crecimiento

240      XX = No descrito

(+) Maerz A., Paul M.R. "A dictionary of colours" -  
McGraw Hill (1950)

T A B L A      6

GLUCOSA-PEPTONA-AGAR :

245	Glucosa .....	30	gm
	Peptona .....	10	
	Agar .....	20	
	H <sub>2</sub> O destilada hasta	1000	cc
	pH = 5.9		

250

Cepa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
Str.1616	Moderado	Naranja clara a rojo	Blanco a gris rosa	XXX
Aureofaciens	Bueno	Amarillo ocre	Blanco	XXX
255      ATCC 10762	XX	XX	XX	XX
ATCC 11652	XX	XX	XX	XX
ATCC 11653	XX	XX	XX	XX
ATCC 11654	XX	XX	XX	XX
Feofaciens	XX	XX	XX	XX
260      RO 1441	XX	XX	XX	XX
P 4871	XX	XX	XX	XX
Persimilis	XX	XX	XX	XX
Fuscofaciens	XX	XX	XX	XX

# 318910



-11-

XX = Sin describir

265 XXX = Sin crecimiento

T A B L A 7

AGAR ALMIDÓN :

	Almidón soluble ....	10 gm
	NaNO <sub>3</sub> .....	1
270	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,3
	ClNa .....	0,5
	MgCO <sub>3</sub> .....	1
	Agar .....	15
	H <sub>2</sub> O destilada hasta	1000 cc

275	Cepa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
	str. 1616	Muy escaso	Incoloro	XXX	XXX
	Aureofaciens ATCC 10762	Abundante	Marrón claro a col. Piping Rock 13A2 (+)	Blanco a gris	Gris ratón
280	ATCC 11652	Moderado	X	X	Buena esporulación blanca a gris ratón a negro
	ATCC 11653	Moderado	Blanco a gris ratón	Blanco	Gris ratón de claro a oscuro
	ATCC 11654	Escaso a moderado	Blanco en los márgenes haciéndose gris amarillento a marrón gris	XXX	XXX
	Peofaciens RO 1441	Muy escaso	Incoloro	XXX	XXX
		X	Muy lento y escaso	X	X
285	P 4871	XX	XX	XX	XX
	Persimilis	Muy escaso	X	X	X
	Viridifaciens	XX	XX	XX	XX

318910

25



-12-

Fuscofaciens Escaso a mo- Tinta azul clara XXX XXX  
derado

X = No registrado

290 XX = No descrito

XXX = Sin crecimiento

(+) Maezr A., Paul M.R. - "A Dictionary of colors"  
McGraw Hill (1950).

T A B L A 8

295 AGAR PATATA :

Patatas hasta .....	200 gm
Glucosa .....	20
Agar .....	20
H <sub>2</sub> O destilada hasta	1.000 cc

300	Cepa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
	Str. 1616	Escaso	Naranja a rojizo na ranja	XXX	XXX
	Aureofaciens ATCC 16762	Abundante	Incoloro	Blanco	Gris ratón
305	ATCC 11652	XX	XX	XX	XX
	ATCC 11653	XX	XX	XX	XX
	ATCC 11654	XX	XX	XX	XX
	Feofaciens RO 4871	Muy escaso	Marrón	X	Muy escaso marrón XX
310	P 4871	XX	XX	XX	XX
	Persimilis	XX	XX	XX	XX
	Viridifaciens	Subido, su perficie no dulada	Crudo beis	X	X
315	Fuscofaciens	Bueno	Gris oliva y amarillo o marrón claro a marrón obscuro	XXX	XXX

# 318910

25



-13-

X = No registrado

XX = No descrito

XXX = Sin crecimiento

T A B L A 9

520 TACOS DE PATATAS :

Cepa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
325 Str. 1616	Bueno	Brigand Red 2J11 (+)	Blanco a rosa gris a ceniza gris	Ceniza gris
Aureofaciens ATCC 10762	Escaso a moderado	Marrón amarillento a marrón	Blanco grisáceo en los márgenes	X
ATCC 11652	Bueno	Marrón amarillo claro a marrón olivosa oscuro	Blanco	De ninguna a blancas a gris marronáceo
330 ATCC 11653	Moderado	Blanco crema a amarillo crema a amarillo mostaza	XXX	XXX
ATCC 11654	Bueno	Marrón olivosa	XXX	XXX
Feofaciens	XX	XX	XX	XX
RO 1441	XX	XX	XX	XX
335 P 4871	XX	XX	XX	XX
Persimilis	XX	XX	XX	XX
Viridifaciens	XX	XX	XX	XX
Fuscofaciens	XX	XX	XX	XX

X = No registrado    XXX = Sin crecimiento

XX = No descrito

(+) Maerz A., Paul M.R. - "A Dictionary of colors"

McGraw Hill (1950)

330

318910 25



-14-

345 Como se verá evidentemente en las tablas y datos precedentes, el *Streptomyces* sp 1616, debido a sus características morfológicas, bioquímicas y de cultivo, no puede ser identificado como perteneciente a ningún grupo reconocido de microorganismos descritos como productores de tetraciclina.

350 Hemos descubierto que la acción estabilizadora del carbonato de estroncio, y las mezclas del carbonato de estroncio y carbonato de calcio, sobre el pH, tanto del medio de crecimiento como del de fermentación, da como resultado un crecimiento mejorado en el caso del medio de crecimiento y rendimiento mejorado de tetraciclina  
355 en el caso del medio de fermentación. Esta es una propiedad inesperada, no registrada hasta ahora en la literatura con relación a un proceso microbiológico comparable.

360 Además, hemos descubierto que se obtienen máximos rendimientos cuando el medio de fermentación comprende seda de mazorca frescas o ensiladas *Zea mays*. Hemos visto que la seda de mazorca contiene factores de crecimiento que no están presentes en otras plantas. Así, cuando hemos substituído la seda de mazorca por soja,  
365 el rendimiento de tetraciclina disminuyó considerablemente. El factor de crecimiento contenido en la seda de mazorca, puede extraerse de la misma por medio de agentes, tanto ácidos como álcalis. También hemos hallado que añadiendo fosfatos, el metabolismo de los car  
370 bohidratos se activa con un mayor incremento en el rendimiento del antibiótico, a diferencia de lo que se deter

318910



-15-

mina en la literatura.

375 Los fosfatos han sido añadidos al medio como fosfato de amonio en substitución de una cierta cantidad de cloruro de amonio, de modo que la cantidad de nitrógeno amónico, necesaria para la fermentación, permaneció sin cambiar.

380 Tanto el medio de crecimiento como el de fermentación deben tener un pH inicial de 6,0 a 7,0. Durante la fermentación, el pH del medio debe ser entre 5,7 y 6,8. La temperatura del medio de crecimiento y el medio de fermentación debe estar entre 24° y 35° C, y, preferiblemente, entre 26° y 28° C.

385 Para el medio de crecimiento, hemos hallado un medio preferido que contiene, por 1.000 cc.:

Dextrina de grano 10 a 40 gramos

Carbonato de estroncio 2 a 12 gramos

Filtrado de seda de mazorca (+) 250 a 300 cc.

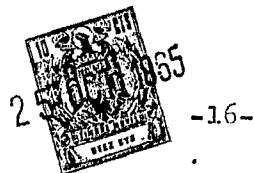
Sulfato de amonio 1 a 5 gramos

390 Agua en cantidad suficiente para hacer 1.000 cc.

(+) Zea mays el filtrado de seda de mazorca se prepara hirviendo 720 gramos de seda de mazorca en dos litros de agua y después filtrando la mezcla de manera que se obtenga un filtrado de color marrón con un pH de 395 6,2 aproximadamente y una concentración total de nitrógeno de aproximadamente un 0,2 por ciento.

400 Antes de la esterilización, el pH debe ajustarse a 0,5 aproximadamente con ácido hidroclicórico. Después de la esterilización, el pH debe encontrarse dentro de los límites de 6 a 7. La presencia del carbonato de

318910



estroncio regula el pH y afecta beneficiosamente al rendimiento de tetraciclina.

405 Los siguientes ejemplos revelan el crecimiento de Streptomyces sp. 1616, y se pueden usar para obtener un inoculante para el medio de fermentación.

EJEMPLO 1

410 Esporas de la cepa Streptomyces sp. 1616 fueron lavadas desde el sesgo con agua estéril al 1 por mil para formar una suspensión conteniendo unas 500.000.000 de esporas por cc. Se utilizó 1 cc. de esta suspensión para inocular una redoma de tres litros conteniendo 500 cc. del medio siguiente:

- 415
- Dextrina de cereal . . . . . 20 grs.
  - Carbonato de estroncio . . . . . 10 grs.
  - Filtrado de seda de mazorca, preparado según se describió . . . . . 250 grs.
  - Sulfato de amonio . . . . . 2 grs.
  - Agua suficiente para hacer . . . . . 1000 cc.

420 El pH del medio antes de la esterilización se ajustó a 5,0 con ácido hidroclicórico. El pH del medio después de la esterilización era 6,35 a 6,5.

El crecimiento continuó en el medio entre 24 y 48 horas.

EJEMPLO 2

425 Se repitió el procedimiento del ejemplo I, con la excepción de que el medio contenía:

- 430
- Dextrina de cereal . . . . . 20 grs.
  - Carbonato de estroncio . . . . . 10 grs.
  - Filtrado de seda de mazorca, según se ha descrito . . . . . 500 cc.

318910



Sulfato de amonio . . . . . 2 grs.  
 Agua suficiente para hacer 1.000 cc.

EJEMPLO III

435 Se repitió el procedimiento del ejemplo I, con la excepción de que el medio contenía:

Dextrina de grano . . . . . 20 grs.  
 Carbonato de estroncio . . . . . 10 grs.  
 Filtrado de seda de mazorca, según se ha descrito . . . . . 750 cc.  
 Sulfato de amonio . . . . . 2 grs.  
 440 Agua suficiente para hacer .. 1.000 cc.

Se obtuvo tetraciclina en alto rendimiento cuando se inculó del 2 al 4 por ciento del peso de micelio, crecido entre 24 y 48 horas en los medios nutrientes de los antes mencionados ejemplos I, II y III, en los  
 445 siguientes medios de fermentación:

EJEMPLO IV

Filtrado neutro de seda de mazorca (+) . . . . . 250 cc.  
 $\text{CaNH}_4$  . . . . . 4,5 grs.  
 Almidón de cereal . . . . . 55 grs.  
 450 Soja . . . . . 10 grs.  
 $\text{SrCO}_3$  . . . . . 8 grs.  
 Agua de manantial hasta 1.000 cc.

El pH antes de la esterilización, debe estar ajustado a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es de 6,2.  
 455

(+) El filtrado neutro de seda de mazorca se prepara hirviendo 720 grs. de flores de Zea en dos litros de agua, filtrando para producir un líquido de color ma -



460

rrón con un pH de 6,2, y una concentración total de ni  
trógeno de 0,02 por ciento del peso.

EJEMPLO V

465

Filtrado neutro de seda de mazorca (+) . . . . .	500 cc.
$\text{ClNH}_4$ . . . . .	4,5 cc.
Almidón de cereal . . . . .	55 grs.
Soja . . . . .	10 grs.
$\text{SrCO}_3$ . . . . .	8 grs.
Agua de manantial hasta . . .	1.000 cc.

470

El pH antes de la esterilización debe ser ajustado  
a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es de  
6,2.

EJEMPLO VI

475

Filtrado neutro de seda de mazorca (+) . . . . .	750 cc.
$\text{ClNH}_4$ . . . . .	4,5 grs.
Almidón de cereal . . . . .	55 grs.
Soja . . . . .	10 grs.
$\text{CO}_3\text{Sr}$ . . . . .	8 grs.
Agua de manantial hasta . . .	1.000 cc.

480

El pH antes de la esterilización debe ser ajustado  
a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es de  
6,2.

(+) El filtrado neutro de seda de mazorca, se prepara  
según se describe en el ejemplo IV.

EJEMPLO VII

485

Filtrado alcalino de seda de mazorca (++) . . . . .	250 cc.
$\text{ClNH}_4$ . . . . .	4,5 grs.

318910

25



Almidón de cereal. . . . .	55	grs.
Soja . . . . .	10	grs.
CO <sub>2</sub> Sr. . . . .	8	grs.
Agua de manantial hasta. .	1.000	cc.

490 El pH antes de la esterilización debe ser ajustado a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es de 6,2.

(++) El filtrado alcalino de seda de mazorca se prepara suspendiendo 720 grs. de seda de mazorca en dos litros de agua y ajustando el pH a 9,0 con un veinte por ciento de peso de hidróxido de sodio. Entonces, se hierve la mezcla durante veinte minutos y se filtra. El filtrado es un líquido marrón amarillento, con un pH de 9,0 con un total de concentración de nitrógeno del 0,22 por ciento del peso.

EJEMPLO VIII

Filtrado alcalino de seda de mazorca (++) . . . . .	500	cc.
ClNH <sub>4</sub> . . . . .	4,5	grs.
Almidón de cereal . . . . .	55	grs.
Soja . . . . .	10	grs.
CO <sub>2</sub> Sr. . . . .	8	grs.
Agua de manantial hasta .	1.000	cc.

505 El pH antes de la esterilización debe ser ajustado a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es 6,2.

510 (++) El filtrado álcali de seda de mazorca se prepara según se describe en el ejemplo VII.

EJEMPLO IX

Filtrado álcali de seda de mazorca (++) . . . . .	750	cc.
---	-----	-----

318910

250



515	ClNH <sub>4</sub> . . . . .	4,5	grs.
	Almidón de cereal . . . . .	55	grs.
	Soja . . . . .	10	grs.
	CO <sub>3</sub> Sr . . . . .	8	grs.
	Agua de Manantial hasta	1.000	cc.

520 El pH, antes de la esterilización, debe ser ajustado a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es de 6,2.

(++) El filtrado álcali de seda de mazorca se prepara según se describe en el ejemplo VII.

525

EJEMPLO X

	Filtrado ácido de seda de mazorca (+++) . . . . .	250	cc.
	ClNH <sub>4</sub> . . . . .	4,5	grs.
	Almidón de cereal. . . . .	55	grs.
	Soja ... . . . .	10	grs.
530	CO <sub>3</sub> Sr . . . . .	8	grs.
	Agua de manantial hasta. .	1.000	cc.

El pH, antes de la esterilización, debe ajustarse a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es de 6,2.

535

(+++)  
El filtrado ácido de seda de mazorca se prepara suspendiendo 720 gramos de seda de mazorca en 2 litros de agua, acidificando la mezcla con un veinte por ciento de volumen de ácido hidroclicórico para llevar el pH a 3, hirviendo y filtrando después la mezcla para que

540

de un líquido amarillento con un contenido de nitrógeno del 0,2 por ciento del peso.



25

EJEMPLO XI

	Filtrado ácido de seda de mazorca (+++) . . . . .	500 cc.
	$\text{ClNH}_4$ . . . . .	4,5 grs.
545	Almidón de cereal . . . . .	55 grs.
	Soja . . . . .	10 grs.
	$\text{CO}_3\text{Sr}$ . . . . .	8 grs.
	Agua de manantial hasta .	1.000 cc.

pH antes de la esterilización = 5,0 a 5,5

550 pH después de la esterilización = 6,2

(+++)  
El filtrado ácido de seda de mazorca se prepara según se describe en el ejemplo X.

EJEMPLO XII

	Filtrado ácido de seda de mazorca (+++) . . . . .	750 cc.
555	$\text{ClNH}_4$ . . . . .	4,5 grs.
	Almidón de cereal . . . . .	55 grs.
	Soja . . . . .	10 grs.
	$\text{CO}_3\text{Sr}$ . . . . .	8 grs.
	Agua de manantial hasta .	1.000 cc.

560 El pH antes de la esterilización debe ser ajustado a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es de 6,2.

(+++)  
El filtrado ácido de seda de maíz se prepara según se describe en el ejemplo X.

EJEMPLO XIII

565	Filtrado neutro de seda de mazorca (+) . . . . .	500 cc.
	$\text{ClNH}_4$ . . . . .	4,3 grs.
	$\text{HPO}_4(\text{NH}_4)_2$ . . . . .	0,1 grs.

318910



	Almidón de cereal . . .	55	grs.
570	Soja . . . . .	10	grs.
	CO <sub>3</sub> Sr . . . . .	8	grs.
	Agua de manantial hasta	1.000	cc.

El pH antes de la esterilización debe ser ajustado a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es de 6,2.

(+) El filtrado neutro de seda de mazorca se prepara como se describe en el ejemplo IV.

EJEMPLO XIV

	Filtrado alcalino de seda de mazorca (++) . . . . .	500	cc.
580	ClNH <sub>4</sub> . . . . .	4,3	grs.
	HPO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,1	grs.
	Almidón de cereal . . . . .	55	grs.
	Soja . . . . .	10	grs.
	CO <sub>3</sub> Sr . . . . .	8	grs.
585	Agua de manantial hasta .	1.000	cc.

El pH antes de la esterilización debe ser ajustado a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es de 6,2.

(++) El filtrado alcalino de seda de mazorca se prepara según se describe en el ejemplo VII.

EJEMPLO XV

	Filtrado ácido de seda de mazorca (+++) . . . . .	500	cc.
	ClNH <sub>4</sub> . . . . .	4,3	grs.
	HPO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,1	grs.
595	Almidón de cereal . . . . .	55	grs.

318910



Soja . . . . . 10 grs.  
CO<sub>3</sub>Sr . . . . . 8 grs.  
Agua de manantial hasta . 1.000 cc.

600 El pH antes de la esterilización debe ajustarse a 5,0 a 5,5; el pH después de la esterilización es de 6,2.

(+++) El filtrado ácido de seda de maíz, se prepara según se describe en el ejemplo X.

605 Al final de la fermentación se filtra el micelio. El caldo que contiene el antibiótico se ajusta a un pH entre 0,5 y 6,0. A continuación se añaden iones cúpricos y un agente activo aniónico de superficie, en exceso de la cantidad estequiométrica basada en la cantidad de antibiótico que se encuentra presente.

610 El complejo así formado por el antibiótico y el agente activo de superficie, se separa por filtración. La fase orgánica, libre de cobre, se seca a pequeño volumen al vacío. Después se diluye con alcohol metílico para dar una concentración de 100.000 a 150.000 gammas, por cc.

615 Añadiendo ClH concentrado, el antibiótico se obtiene como sal cristalina. Hemos hallado que se pueden obtener muy altos rendimientos de tetraciclina del medio de fermentación antedicho,

620 Hemos determinado que los más altos rendimientos de tetraciclina, se obtienen cuando se emplea carbonato de estroncio como regulador del pH para el medio de fermentación. Sin embargo, otros carbonatos de metales terro

318910<sup>25</sup>



-24-

625            sos alcalinos, tales como carbonato de bario y carbonato de calcio, pueden ser usados, preferiblemente junto con carbonato de estroncio. Si se utilizan en lugar de carbonato de estroncio, el rendimiento de tetraciclina se reduce. Además, según se ha indicado arriba, el rendimiento de tetraciclina se reduce considerablemente si el constituyente seda de mazorca se substituye por soja o por otro nutriente. Creemos que hay presente un factor de crecimiento en la seda de mazorca que aumenta materialmente el rendimiento de tetraciclina cuando se emplea como microorganismo el Streptomyces sp. 1616.

630

--ooOoo--

635            N C T A.    -    Se reivindica la propiedad de esta Patente de Invención:

- 1) - Procedimiento para la producción de tetraciclina, en el cual el microorganismo productor, Streptomyces sp 1616, crece en un medio nutriente.
- 640            2) - Procedimiento para la producción de tetraciclina, según 1ª reivindicación, en el cual el medio nutriente contiene un carbonato de una tierra metálica alcalina.
- 3) - Procedimiento para la producción de tetraciclina, según 2ª reivindicación, en el que el carbonato de la
- 645            tierra metálica alcalina es carbonato de estroncio.
- 4) - Procedimiento para la producción de tetraciclina, según 1ª reivindicación, en el que el medio nutriente contiene seda de mazorca.
- 5) . Procedimiento para la producción de tetraciclina,

318910



- 650 según 1ª reivindicación, en el que el medio nutriente contiene fosfatos.
- 6) - Procedimiento para la producción de tetraciclina según 5ª reivindicación, caracterizado porque los fosfatos se pueden añadir bajo forma de fosfato de amonio.
- 655 7) - Procedimiento para la producción de tetraciclina, en el que la tetraciclina se produce por fermentación de un medio nutriente que contiene seda de mazorca, carbonato de estroncio y fosfatos, y con un pH entre 5,7 y 7,0 después de la esterilización, por medio del micro
- 660 organismo *Streptomyces* sp. 1616.
- 8) - Procedimiento para la producción de tetraciclina, de acuerdo con la 7ª reivindicación, en el que la temperatura durante la fermentación debe mantenerse entre 22° y 28° C.
- 665 9) - Procedimiento para la producción de tetraciclina, según reivindicación 5ª, en el cual, el medio nutriente contiene iones de cloro.
- 10)- "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE TETRACICLINA"  
Esta Memoria Descriptiva consta de veinticinco ho
- 670 jas foliadas y mecanografiadas por una sola cara.

Madrid, 25 OCT. 1965

~~C. ALONSO~~