

324850



324850

MEMORIA DESCRIPTIVA de Patente de Inven-
ción que, por veinte años en España y posesiones, solicita
la firma ANKERFARM, S.p.A., establecida en Cinisello Bâlsamo
(Milán), Viale Lombardia, 5, por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PRO-
DUCCION DE SUPLEMENTOS ESPECIALES PARA ALIMENTOS ANIMALES
POR FERMENTACION".

Inventores: Dr. Enzo Zannini - Via Washington, 72 - Milán
D. Caputo Ezio - Via P. Finzi, 15 - Milán
D. Fabbri Giuseppe - Via L. Manara, 18 - Binas-
co (Milán).

==ooOoo==

La ciencia de la alimentación animal ha sido dirigida ha-
cia el estudio de substancias especiales que son capaces de
equilibrar y enriquecer las dietas usadas en la alimentación
animal. Entre éstas substancias las más interesantes por los

324850



5 buenos resultados dados son algunos derivados de la fermenta-
ción de ciertos microorganismos, substancias que son ricas en
factores de crecimiento, factores vitamínicos, elementos mine-
rales, substancias antibióticas. Tales microorganismos son
10 cultivados en medios nutritivos adecuados en condiciones par-
ticulares de esterilidad, aeración y termoregulación. Así se
obtienen masas microbiales puras que contienen proteínas, ami-
noácidos, grasas, hidratos de carbono, sales minerales, subs-
tancias antibióticas y los "factores desconocidos de crecimen-
to" (F.D.C.), bien conocidos.

15 Es bien conocida la acción estimulante y promotora del cre-
cimiento de los antibióticos a causa de su actividad antibac-
teriana sobre la microflora del tracto digestivo. También es
bien conocida la importancia de ciertas substancias, todavía
no definidas químicamente que han sido denominadas "factores
20 desconocidos de crecimiento". Entre ellas se pueden mencionar
un "factor de fermentación". Hemos descubierto recientemente
nuevos microorganismos capaces de producir antibióticos de te-
traciclina. Estos microorganismos han sido seleccionados y
estudiados a fin de evidenciar su aptitud para producir anti-
25 bióticos y para crecer en medios nutritivos especiales. Tales
medios nutritivos pueden estimular la producción de factores
de crecimiento y el metabolismo del organismo para producir
proteínas, teniendo un contenido de aminoácidos ya bien equi-
librado para la alimentación animal. Nuestros microorganismos
30 producen antibióticos de tetraciclina, que entre otros suple-
mentos que contienen antibióticos poseen la acción más venta-
josa y constante con respecto al estado sanitario de los ani-
males.

324850



35 Tales antibióticos son adecuados como medicamentos si se usan en dosis elevada y como estimuladores del crecimiento si se usan en dosis baja.

Así pues hemos ensayado el obtener un suplemento que contiene un elevado porcentaje de antibióticos y uno que contiene un bajo porcentaje.

40 Las características bioquímicas, morfológicas y fisiológicas de los organismos usados

Estreptomices T457 mutación del Estreptomices sp.1616, productor de tetraciclina.

45 Estreptomices C1842 productor de clorotetraciclina y Estreptomices 02824 productor de oxitetraciclina, se explican más abajo

T A B L A 1

50	<u>W.6</u>	Peptona.....10 g
		Glucosa.....20 g
		Cl Na..... 5 g
		Agar.....18 g
		Agua para 1000 ml

Cepa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio Aéreo	Esporas
55 Estr. T457	Escaso	Marron claro	-	-
Estr. C1842	"	Colonias Rojas aisladas	-	-
Estr. 02824	Moderado	Marron claro	blanco lechoso	blanco

T A B L A 2

60 Gelatina- DIFCO

324850



- Estr. T457 : Fluidificación escasa; pigmento Marrón claro.
- Estr. C1842 : Fluidificación completa; pigmento rojo-marrón
- Estr. 02824 : Fluidificación completa.

T A B L A 3

65 Glucosa -esparragina

- Glucosa.....10 g
- Esparragina..... 0,5 g
- K₂HPO₄..... 0,5 g
- Extracto de carne.... 2 g
- 70 Agar.....18 g
- H₂O destilada para 1000 ml
- pH - 6.8

Cepa	Cre- cimi- ento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
Estr. T457	Escaso	Marrón claro	-	-
75 Estr. C1842	Escaso	Rojo-naranja	Rosa-gris	Gris-rosa
Estr. 02823	Moderado	Marrón claro	Rosa-gris	Rosa-gris

T A B L A 4

Agar nutritivo

- 80 Peptona..... 5 g
- Extracto de carne..... 5 g
- NaCl..... 5 g
- Agar.....20 g
- Agua destilada para 1000 ml
- pH - 7.2 -7.4



1966-5-

85	Cepa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
	Estr. T457	Escaso	marrón	-	-
	Estr. C1842	Escaso	Colonias rojas	-	-
	Estr. 02823	Bueno	marrón claro	blanco lechoso	blanco

T A B L A 5

90 Czpek-Dox-agar

Sacarosa.....	30	g
NaNO ₃	2	g
K ₂ HPO ₄	1	g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5	g
KCl.....	0,5	g
FeSO ₄	0,01	g
Agar.....	20	g
Agua destilada para	1000	ml

95

pH - 7.0- 7.3

100	Cepa	Crecimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
	Estr. T457	Muy escaso-Incoloro		-	-
	Estr. C1842	N O H A Y C R E C I M I E N T O			
	Estr. 02823	Muy esca so	Incoloro	-	-

T A B L A 6

105 Saboraud: (Glucosa-peptona-agar)

Glucosa.....	30	g
--------------	----	---

324850



-6-
1966

110

Peptona.....10 g
 Agar.....20 g
 Agua destilada para 1000 ml
 pH - 5.9

Cepa	Cre- cimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
Estr. T457	Moderado	Caramelo a verde marrón	-	-
Estr. C1842	Escaso	Colonias rojo naran- ja aisladas	-	-
Estr. 02823	Moderado	Marrón claro	blanco lechoso	blanco

115

T A B L A 7

Almidón agar

120

Almidón soluble..... 10 g
 NaNO₃..... 1 g
 K₂HPO₄..... 0,3 g
 NaCl..... 0,5 g
 MgCO₃..... 1,0 g
 Agar..... 15 g
 Agua para 1000 ml

125

Cepa	Cre- cimiento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
Estr. T457	Muy esca- so	Incoloro	-	-
Estr. Ø1842	Muy esca- so	Incoloro	-	-
Estr. 02823	Bueno	Verde amarillo a marrón claro	blanco lecho so difuso	blanco difuso

324850



-7-

1966

T A B L A 8

Patata agar

130	Patatas.....200 g
	Glucosa..... 20 g
	Agar..... 20 g

Cepa	Cre- cimi- ento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
Estr. T457	Escaso	Colonias aisladas	-	-
135 Estr. C1842	Escaso	Incoloro a marrón	-	-
Estr. 02823	Bueno	Marrón claro	gris rosado blanco claro	

T A B L A 9

Patatas

Cepa	Cre- cimi- ento	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Esporas
140 Estr. T457	Bueno	Marrón claro	Blanco a gris	Gris
Estr. C1842	Moderado	Colonias aisladas color negro	Gris blanco	-
Estr. 02823	Moderado	Castaño	Gris ceniza	-

145 El complejo medio nutritivo usado para cultivar los orga-
nismos anteriormente mencionados contiene hidratos de carbono,
proteínas, sales minerales, vitaminas, grasas y factores de cre-
cimiento. Los hidratos de carbono son suministrados en forma
de almidón , harina de maiz, glucosa; las proteínas son sumi-
nistradas en forma de harina de cebada, harina de soja, harina
de pescado, harina de cacahuete, harina de semillas de algodón.

324850



R. 1966

150 Las sales minerales son añadidas de acuerdo con la relación fisiológica en forma de calcio, magnesio, cinc, hierro, cobre, manganeso, sodio, potasio. Hay añadidas también elevadas cantidades de fosfatos, que pueden acelerar el metabolismo de los carbohidratos en favor de la síntesis proteínica de los hongos.

155 Se añaden a los caldos de cultivo de fermentación grasas naturales integrales que contienen vitaminas liposolubles, por ejemplo, vitaminas A y D, contenidas en el aceite de hígado de bacalao, manteca de cerdo y aceite de cacahuete. Se suministran igualmente factores vitamínicos con la adición de lisatos de levadura o fermentos.

160 Al medio de fermentación se le añade una fuente barata y original de proteínas y de factores de crecimiento, Es el extracto de las plantas de Zea mays (maiz), que es muy útil para estimular el crecimiento de los microorganismos y la producción de antibióticos (veáse la solicitud de patente italiana nº 40166). Como las cepas descritas producen también vitamina B₁₂, añadimos a los medios elevadas cantidades de cobalto que pueden promover la acumulación de la vitamina. Así se enriquece el suplemento con las vitaminas del grupo B₁₂. A
165
170 continuación exponemos algunos ejemplos de medios usados para cultivar los microorganismos anteriormente citados.

Ejemplo 1

	Almidón de maiz.....	30% ^o
	Harina de maiz.....	15% ^o
175	Harina de semilla de soja.....	10% ^o
	Extracto de Zea Mais.....	500 ml
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4% ^o
	NH ₄ Cl.....	2% ^o
	CuSO ₄	0,005% ^o

324850



-9-
AR. 1966

180	ZnSO ₄	0,004% Ω
	FeSO ₄	0,005% Ω
	KH ₂ PO ₄	0,5% Ω
	MgSO ₄	1% Ω
	CaCO ₃	4% Ω
185	SrCO ₃	4% Ω
	Aceite de semilla de soja.....	2% Ω
	Aceite de manteca de cerdo.....	0,5% Ω
	Aceite de higado de bacalao.....	0,5% Ω
	Agua de fuente para	1000 ml
190	<u>Ejemplo 2</u>	
	Almidón de maiz.....	40% Ω
	Harina de semilla de soja.....	15% Ω
	Extracto de Zea Mais.....	500 ml
	Extracto de levadura.....	1,5% Ω
195	(NH ₄) ₂ SO ₄	5% Ω
	NH ₄ Cl.....	1% Ω
	CuSO ₄	0.005% Ω
	ZnSO ₄	0.004% Ω
	FeSO ₄	0.005% Ω
200	KH ₂ PO ₄	0.5%
	MgSO ₄	1% Ω
	CaCO ₃	2% Ω
	SrCO ₃	6% Ω
	CoCl ₂	0.005% Ω
205	Aceite de cacahuete.....	2% Ω
	Aceite de manteca de cerdo.....	0.5% Ω
	Aceite de higado de bacalao.....	0.5% Ω
	Agua para.....	1000 ml

324850



MAR 1966

-10-

Ejemplo 3

210	Almidón de maiz.....	40% ^o
	Harina de maiz.....	15% ^o
	Harina de pescado.....	10% ^o
	Extracto de Zea Mais.....	500% ^o
	Extracto de levadura.....	1.5% ^o
215	(NH ₄) ₂ SO ₄	8% ^o
	CuSO ₄	0.005% ^o
	ZnSO ₄	0.004% ^o
	FeSO ₄	0.005% ^o
	KH ₂ PO ₄	0.35% ^o
220	MgSO ₄	1% ^o
	SrCO ₃	8% ^o
	Aceite de manteca de cerdo.....	0.5% ^o
	Aceite de hígado de bacalao.....	0.5% ^o
	Agua para.....	1000 ml.

225 Hemos ensayado la acción de nuestros suplementos para alimentación animal administrando a pollos algunas mezclas de alimentos dictaminados como adecuados para el crecimiento de los pollos (E. Borghioli "Zootechnics" - pag. 386 - J- Barbera Publi. 1955).

230	<u>Nº 1</u>	
	Moyuelo.....	25%
	Derivado de la industria mohtory..	25%
	Harina de maiz.....	20%
	Harina de semilla de soja.....	20%
235	Harina de carne.....	5%
	Harina de huesos.....	1 5%

324850



-11-

Nº 2

	Harina de maiz.....	30%
	Moyuelo de trigo.....	20%
240	Harina de cebada.....	20%
	Harina de cacahuete.....	16%
	Harina de leche desnatada.....	10%
	Mezcla mineral.....	4%

A éstas mezclas hemos añadido:

245. 1) Diferentes cantidades de antibióticos producidos por nuestras cepas;
- 2) Caldo de cultivo de fermentación de los organismos anteriormente mencionados de los cuales habíamos recuperado previamente el antibiótico totalmente;
- 250 3) El cultivo de fermentación conteniendo los antibióticos producidos por nuestras cepas. Los resultados obtenidos han mostrado que los animales alimentados con las mezclas citadas sin adiciones habían ganado mucho menos peso que aquellos alimentados con las mezclas y las adiciones. Hemos no
- 255 tado que el incremento de peso es debido no solamente a la presencia de antibiótico sino especialmente a los factores desconocidos de crecimiento presentes en el caldo de cultivo de fermentación.

Experimentos exhaustivos han mostrado la total ausencia

260 de toxicidad del antibiótico y de los caldos de cultivo de fermentación. Otra peculiaridad de nuestro invento es el método de estabilización del antibiótico en el suplemento. Es bien conocida la acción estabilizadora de la adición de 7-cloro-4-epitetraciclina en la preservación de la potencia antibiótica.

265 ca. Se ha encontrado que los isómeros de los antibióticos de

324850



-12-

tetraciclina ejercen la misma acción sobre la preservación de la potencia antibiótica contenida en el alimento para uso animal. Nuestro proceso está basado en un tratamiento particular del caldo de cultivo de fermentación en el que los isómeros de los antibióticos de tetraciclina se forman directamente en el caldo de cultivo de fermentación por medio de la epimerización de un porcentaje del antibiótico contenido en él.

Tal método original permite un suministro barato e inmediato de epímero y una mejor estabilización del antibiótico a causa de la uniformidad de distribución del antibiótico junto con el epímero.

Informamos algunos ejemplos de tal método a título de ilustración.

Ejemplo 1

Un caldo de fermentación conteniendo tetraciclina es acidificado con ácido fosfórico hasta PH 1.7 después el pH es llevado a 3.2 con natrón líquido 30%. Después es calentado a 50-60°C bajo agitación, manteniendo ésta temperatura durante 3 horas; se enfría a la temperatura ambiente y se añade lentamente lodo hidratado en pequeñas porciones hasta 6. pH. El pH es llevado entonces a 8.5 con natron. Después de un pequeño periodo de agitación el caldo se concentra bajo vacío a una temperatura no menor de 45°C. El sólido residual molido contiene tetraciclina en presencia de su epímero en diferentes cantidades de acuerdo con el tiempo de epimerización.

Ejemplo 2

Un caldo de fermentación conteniendo tetraciclina es acidificado con ácido sulfúrico a 1.5 pH. El caldo es filtrado. El micelio es re-suspendido en el caldo agotado tratado con

324850



A. 1985 -13-

295 0.5 -2% de fosfato sódico monobásico calculado sobre el volú-
men de la suspensión. El pH es ajustado a 3.3 y la suspensión
se calienta a 50-60°C durante 2 horas aproximadamente. Se en
fría a la temperatura ambiente y se añade lodo hidratado en
pequeñas porciones hasta pH6. El pH se ajusta después a 8.5
300 con natron y después de un corto periodo de agitación la sus-
pensión se concentra bajo vacío a baja temperatura. Cuando el
contenido de agua del residuo sólido es menor del 20% es se-
parado. El residuo sólido contiene tetraciclina en la presen-
cia de éste epímero en diferentes cantidades de acuerdo con
305 el tiempo de epimerización.

Este tipo de suplemento puede contener de 1 a 6 g/Kg de
antibiótico.

Ejemplo 3

310 Un caldo de fermentación conteniendo tetraciclina es aci-
dificado con ácido fosfórico hasta 1.7 pH. El pH se ajusta des-
pués a 3.2 con natrón. Entonces se calienta a 50-60°C bajo
agitación, manteniendo ésta temperatura durante 2 horas apro-
ximadamente. Se enfría a la temperatura ambiente y se añade
lentamente lodo hidratado en pequeñas porciones hasta 6.0 pH.
315 Entonces se ajusta el pH a 8.5 con natrón y después de un cor-
to periodo de agitación se filtra el caldo y el sólido es se-
cado y molido. Contiene tetraciclina en la presencia de su
epímero en diferentes cantidades según el tiempo de epimeriza-
ción.

320 Ejemplo 4

Un caldo de fermentación conteniendo tetraciclina es aci-
dificado con ácido fosfórico hasta 1.6 pH. El pH es ajustado
entonces hasta 3.2 con natrón. El caldo se calienta a 50-60°C

324850



-14-

325 bajo agitación, manteniendo ésta temperatura durante 2 horas
aproximadamente. Después se enfría a la temperatura ambiente
y se añade lentamente lodo hidratado en pequeñas porciones has-
ta 6.0 pH. Después se ajusta el pH hasta 8.5 con natrón y clo-
330 ro sódico se añade en cantidad suficiente para obtener una
precipitación completa de cada parte proteínica en el caldo.
Después del filtrado se seca el producto con un separador cen-
trífugo de polvo.

Contiene tetraciclina en la presencia de su epímero en
cantidades diferentes según el tiempo de epimerización.

Ejemplo 5

335 Un caldo de fermentación que contiene tetraciclina se aci-
difica con ácido fosfórico hasta 1.7 pH. El pH se ajusta des-
pués a 3.2 por medio de natrón. Se calienta el caldo a 50-
60°C bajo agitación, manteniendo ésta temperatura durante 2
horas aproximadamente. Se enfría a la temperatura ambiente y
340 se ajusta a 8.5 pH con natrón. Después de un corto periodo
de agitación se filtra el caldo y se seca el sólido. Contie-
ne tetraciclina en la presencia de su epímero en cantidades
diferentes según el tiempo de epimerización.

Ejemplo 6

345 Un caldo de fermentación que contiene clorotetraciclina
se acidifica a 1.7 pH con ácido fosfórico. Después se ajusta
el pH a 3.2 con natrón líquido 30%. El caldo se calienta des-
pués a 50-60°C bajo agitación, manteniendo ésta temperatura
durante 2 horas aproximadamente. Después se enfría a la tem-
350 peratura ambiente y se añade lentamente lodo hidratado en pe-
queñas porciones hasta 6 pH. Después se ajusta el pH a 8.5
con natrón. Después de una breve agitación se concentra el

324850



-15-
AH 10/30

355 caldo bajo vacío a una temperatura inferior a 45°C. El sólido residual contiene clorotetraciclina en la presencia de su epímero en cantidades diferentes según el tiempo de epimerización.

Ejemplo 7

360 Un caldo de fermentación que contiene clorotetraciclina se acidifica con ácido sulfúrico hasta 1.5 pH. El caldo es filtrado. Se recupera la clorotetraciclina procedente del caldo filtrado. El micelio es vuelto a suspender en el caldo agotado y tratado con 0.5 - 2% de fosfato monobásico calculado sobre el volumen de la suspensión. Después se ajusta el pH a 3.2 y se calienta la suspensión a 50-60°C durante 2 horas. Después se enfría a la temperatura ambiente y se añade lentamente lodo hidratado en pequeñas porciones hasta 6 pH. El pH se ajusta a 8.5 con natrón y después de una breve agitación se concentra la suspensión bajo vacío a baja temperatura. Cuando el contenido de agua es menor del 10% se separa o descarga el sólido. El sólido residual molido contiene clorotetraciclina en la presencia de su epímero en cantidades diferentes según el tiempo de epimerización. Este tipo de suplemento contiene de 1 a 6 g/Kg de antibiótico.

365

370

Ejemplo 8

375 Un caldo de fermentación que contiene clorotetraciclina es acidificado con ácido fosfórico hasta 1.7 pH. Después se ajusta el pH hasta 3.2 con natrón. El caldo se calienta a 50-60°C bajo agitación, manteniendo ésta temperatura durante 2 horas aproximadamente. Se enfría a la temperatura ambiente y se añade lentamente lodo hidratado en pequeñas porciones hasta 6.0 pH. El pH es ajustado después a 8.5 con natrón y después de una breve agitación se filtra el caldo y se seca el

380

324850



-16-

1965

sólido y se muele. Contiene tetraciclina (cloro) en presencia de su epímero en cantidades diferentes de acuerdo con el tiempo de epimerización.

385 Ejemplo 9

Un caldo de fermentación que contiene clorotetraciclina se acidifica con ácido fosfórico hasta 1.6 pH. Después se ajusta el pH hasta 3.2 con natrón. El caldo se calienta a 50-60° C bajo agitación, manteniendo esta temperatura durante dos horas aproximadamente. Después se enfría a la temperatura ambiente y se añade lentamente lodo hidratado en pequeñas porciones hasta obtener 6.0 pH. Después se ajusta el pH hasta 8.5 con natrón y se añade bajo agitación cloruro sódico en una cantidad suficiente para obtener una precipitación completa de cada parte proteínica en el caldo. Después de la filtración se seca el producto con un separador centrífugo de polvo. Contiene clorotetraciclina en la presencia de su epímero en cantidades diferentes según el tiempo de epimerización.

Ejemplo 10

400 Un caldo de fermentación que contiene clorotetraciclina se acidula con ácido fosfórico hasta un pH 1.7, el pH se ajusta entonces a 3.2 con natrón. Se calienta el caldo a 50-60° C bajo agitación, manteniendo ésta temperatura durante dos horas. Se enfría a la temperatura ambiente y se ajusta el pH a 8.5 con natrón. Después de una breve agitación se filtra el caldo y se seca el sólido. Contiene clorotetraciclina en presencia de su epímero en cantidades diferentes de acuerdo con el tiempo de epimerización.

En cuanto al:



-17-

MAR 1956

324850

410

Ejemplo 11

Un caldo de fermentación que contiene oxitetraciclina se acidifica con ácido sulfúrico hasta 1.5 pH. Después de $\frac{1}{2}$ hora de agitación se filtra el caldo y el micelio es almacenado para los siguientes trabajos. Se ajusta el filtrado claro hasta 415 8.5 - 9.0 pH con natrón y se calienta a 45°C. El complejo de oxitetraciclina así precipitado se filtra y se seca hasta que tenga un contenido de agua inferior al 1%. Los caldos agotados son almacenados para el siguiente trabajo. El complejo anhidroso obtenido de ésta forma se disuelve en una cantidad 420 mínima de ácido acético. La solución se deja en reposo de 24 a 48 horas a una temperatura de 30°C en atmósfera de gas inerte. En un aparato adecuado se combinan el caldo agotado, el micelio y la solución acética del complejo. Todo ello se ajusta bajo agitación a 6 pH con lodo hidratado y después a 8.5 425 pH con natrón. Después de una corta agitación se concentra la mezcla bajo vacío a una temperatura inferior a 45°C. El sólido residual molido contiene oxitetraciclina en presencia de su epímero en cantidades diferentes según el tiempo de epimerización.

430

Ejemplo 12

Un caldo de fermentación que contiene oxitetraciclina es acidificado con ácido sulfúrico hasta 1.5 pH. Después de una agitación de $\frac{1}{2}$ hora se filtra el caldo y el micelio se almacena para los trabajos siguientes. El filtrado claro es ajustado a 435 8.5 - 9.0 pH con natrón y calentado a 45°C. El complejo de oxitetraciclina precipitado de ésta forma se filtra y se seca hasta que tenga un contenido de agua de 1%. El caldo agotado es almacenado para el siguiente trabajo. Se disuelve el

324850^{29 MAR}



440 complejo anhidroso obtenido de ésta forma en una cantidad mínima de ácido acético y se deja la solución obtenida en reposo de 24 a 48 horas a una temperatura de 30°C en atmósfera de gas inerte. En un aparato adecuado se combinan el caldo agotado, el micelio y la solución acética del complejo. Todo ello se ajusta a 6 pH bajo agitación con lodo hidratado y después a 445 8.5 con natrón. Después se añade una cantidad de cloruro sódico suficiente para obtener una precipitación completa de cada parte proteínica en el caldo. Se filtra la mezcla y se seca el sólido con un separador centrífugo de polvo. Contiene oxitetraciclina en presencia de su epímero en cantidades diferentes según el tiempo de epimerización. 450

Ejemplo 13

Un caldo de fermentación conteniendo oxitetraciclina es acidificado con ácido sulfúrico hasta 1.6 pH. Después de 1/2 hora de agitación se filtra el caldo y el micelio se almacena 455 para el siguiente trabajo.

El filtrado claro se ajusta a 8.5 - 9.0 pH con natrón y se calienta a una temperatura de 45°C. El complejo de oxite- traciclina precipitado de ésta forma se filtra y se seca hasta que tenga un contenido de agua menor de 1%. El caldo ago- 460 tado se almacena para el siguiente trabajo. Se disuelve el complejo anhidroso obtenido en la mínima cantidad de ácido acé- tico y se deja la solución obtenida en reposo de 24 a 48 horas a 30°C de temperatura en atmósfera de gas inerte. En un apa- rato adecuado, se combinan el caldo agotado, el micelio y la 465 solución acética del complejo. Todo ello se ajusta a 6 pH bajo agitación con lodo hidratado y después a 8.5 pH con natrón. Después de una corta agitación se filtra la mezcla y se seca

324850



470 el sólido con un separador centrífugo de polvo. El sólido residual molido contiene oxitetraciclina en presencia de su epímero en cantidades diferentes según el tiempo de epimerización.

Ejemplo 14

475 Un caldo de fermentación que contiene oxitetraciclina se acidifica con ácido sulfúrico hasta 1.5 pH. Después de $\frac{1}{2}$ hora de agitación se filtra el caldo. Se recupera la oxitetraciclina del filtrado claro. El micelio se suspende en el caldo agotado, se ajusta la suspensión a 6 pH con lodo hidratado y a 8.5 con natrón. Después se añade una pequeña cantidad de solución acética de un complejo obtenido con los trabajos anteriores. Después se ajusta el pH hasta 8.5 y después de una
480 breve agitación se concentra la suspensión bajo vacío a baja temperatura. Cuando el contenido de agua del sólido residual sea menor del 10% se muele el sólido. Contiene oxitetraciclina en presencia de su epímero. El contenido de antibiótico de éste tipo de suplemento es de 1 a 6 g/kg.

===oooOooo===

485 N O T A . - Se reivindica la propiedad de ésta Patente de Invención:

1) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, en que uno de tales suplementos contiene caldo de cultivo de fermentación
490 -del Estreptomices T457, mutación del Estreptomices sp. 1616 ATCC 15299.

2) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivin

324850

79M



-20-

- dicación 1ª, en que el estreptomices T457 produce tetraciclina.
- 495 3) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 1ª, en que la tetraciclina contenida en el caldo de cultivo puede ser recuperada.
- 500 4) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 1ª, en que el estreptomices T457 es cultivado en un medio nutritivo que contiene hidratos de carbono, proteínas, sales minerales, factores de crecimiento y componentes especiales que lo enriquecen con vitaminas.
- 505 5) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 4ª, en que uno de tales ingredientes es aceite de hígado de bacalao, que suministra a los suplementos vitaminas A y D.
- 510 6) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 1ª, en que otro de tales ingredientes es el extracto de levadura que suministra al suplemento las vitaminas del grupo B.
- 515 7) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 1ª, en que el estreptomices T457 produce bajo condiciones especiales igualmente vitamina B₁₂.
- 520 8) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 7ª, en que produce vitamina B₁₂ en cantidad mayor o menor de acuerdo con la cantidad de cobalto presente.

324850



-21-

- 525 9) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 1ª, en que el estreptomices T457 es cultivado bajo condiciones aeróbicas inmersas a una temperatura entre 23ª y 36ªC a un pH entre 5.0 y 8.0 durante 48 a 120 horas.
- 530 10)- Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, por la estabilización del antibiótico en el suplemento.
- 11)- Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 10ª, en que la estabilización se obtiene por la presencia de un epímero.
- 535 12) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 11ª, en que el epímero es epitetetraciclina 4.
- 540 13) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 12ª, en que la epitetetraciclina 4 se forma directamente en el caldo de cultivo de fermentación.
- 545 14) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 13ª, en que el porcentaje de epitetetraciclina-4 puede cambiar según se describe en los ejemplos 1 a 6.
- 15) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, en que uno de tales suplementos contiene caldo de cultivo de Estreptomices C1842.
- 550 16) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivin

324850



-22-

- dicación 15ª, en que el *Streptomices* C1842 produce clorotetra-
ciclina.
- 555 17) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
dicación 15ª, en que la clorotetraciclina contenida en el cal-
do del cultivo de fermentación puede ser recuperada.
- 560 18) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
dicación 15ª, en que el *Streptomices* C1842 es cultivado en un
medio nutritivo que contiene hidratos de carbono, proteínas,
sales minerales, factores de crecimiento y componentes especia-
les que lo enriquecen con vitaminas.
- 565 19) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
dicación 18ª, en que uno de tales componentes es aceite de hi-
gado de bacalao que suministra a los suplementos las vitaminas
A y D.
- 570 20) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
dicación 18ª, en que otro de tales componentes es el extracto
de levadura que suministra al suplemento con las vitaminas del
grupo B.
- 575 21) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
dicación 15ª, en que el *Streptomices* C1842 bajo condiciones
especiales produce también vitamina B₁₂.
- 580 22) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
dicación 21ª, en que la cepa produce vitamina B₁₂ en mayor o

324850 29



menor cantidad, según la cantidad de cobalto presente.

- 585 23) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 15ª, en que el *Streptomyces* C1842 crece en cultivo sumergido aerado a una temperatura entre 23º y 36ºC a un pH entre 5 y 8 durante 48 a 120 horas.
- 24) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, por la estabilización del antibiótico en el suplemento.
- 590 25) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 24ª, en que la estabilización se obtiene por la presencia de un epímero.
- 595 26) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 25ª, en que el epímero es 7-cloro-4-epitetraciclina.
- 600 27) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales, para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 26ª, en que 7-cloro-4-epitetraciclina se forma directamente en el caldo de cultivo de fermentación.
- 28) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 27ª, en que el porcentaje de 7-cloro-4-epitetraciclina puede cambiar según se describe en los ejemplos 6 a 10.
- 605 29) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, en que uno de tales suplementos contiene un caldo de cultivo de fermentación de *Streptomyces* O2824.
- 30) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-

324850 29



- 610 les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
dicación 29^a, en que el *Streptomyces* 02824 produce oxitetra-
ciclina.
- 31) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
615 dicación 29^a, en que la oxitetraciclina contenida en el caldo
de cultivo puede ser recuperada.
- 32) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
dicación 29^a, en que el *Streptomyces* 02824 es cultivado en un
620 medio nutritivo que contiene hidratos de carbono, proteínas,
sales minerales, factores de crecimiento y componentes parti-
culares que lo enriquecen con vitaminas.
- 33) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
625 dicación 32^a, en que uno de tales componentes es de aceite de
higado de bacalao, que suministra al suplemento vitaminas A y
B.
- 34) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
630 dicación 32^a, en que otro componente es extracto de levadura,
que suministra al suplemento las vitaminas del grupo B.
- 35) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
dicación 29^a, en que el *Streptomyces* 02824 bajo condiciones
635 particulares produce también vitamina B₁₂.
- 36) - Procedimiento para la producción de suplementos especia-
les para alimentos animales por fermentación, según la reivin-
dicación 35^a, en que el *Streptomyces* 02824 produce vitamina

324850 29 M



- 640 B₁₂ en cantidad mayor o menor, según la cantidad de cobalto presente.
- 37) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 29^a, en que el Estreptomices 02824 es cultivado en cultivo sumergido aerado a una temperatura entre 23^o y 28^oC a un pH entre 5 y 8.5 durante 48 a 120 horas.
- 645 38) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, por la estabilización del antibiótico en el suplemento.
- 39) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 38^a, en que la estabilización se obtiene con la presencia de un epímero.
- 650 40) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 39^a, en que el epímero es epioxitetraciclina - 4.
- 655 41) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 40^a, en que la epioxitetraciclina-4 se forma directamente en el caldo de cultivo de fermentación.
- 660 42) - Procedimiento para la producción de suplementos especiales para alimentos animales por fermentación, según la reivindicación 41^a, en que el porcentaje de epioxitetraciclina-4 puede cambiar según se describe en los ejemplos 11 a 14.
- 665 43) - "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE SUPLEMENTOS ESPECIALES PARA ALIMENTOS ANIMALES POR FERMENTACION".

Esta Memoria Descriptiva consta de veintiseis hojas fo-

324850

29 MAR



liadas y mecanografiadas por una sola cara.

Madrid, 29 MAR. 1966

C. ALCONADA
Per pose

[Handwritten signature]