



532787

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años en España, por "UN PROCEDIMIENTO

PARA AUMENTAR EL RENDIMIENTO DE LA TILOSINA

PRODUCIDA POR FERMENTACION"

a favor de

ELI LILLY AND COMPANY

domiciliado en 740 South Alabama Street, Indiana-

polis, Indiana, EE.UU.



1 Este invento se refiere a un procedimiento mejorado
para la producción de tilosina. Más particularmente, este
invento se refiere a un procedimiento para obtener mayores
5 rendimientos de tilosina mediante la adición al medio de
fermentación en el cual se produce el antibiótico de ciertos
agentes químicos que estimulan la producción del anti-
biótico deseado.

Hemos descubierto que ciertos productos de degrada-
ción obtenidos en la escisión hidrolítica de la tilosina y
10 antibióticos afines inesperadamente aumentan los rendimien-
tos del antibiótico hasta un grado sorprendente cuando se
añaden al medio de fermentación. El mecanismo por el cual
tales sustancias adicionales tienen eficacia para aumentar
el rendimiento de tilosina no se conoce actualmente y no
15 se avanzará aquí ninguna teoría con el propósito de expli-
car los resultados obtenidos. Se ha hallado, no obstante,
que estos rendimientos mayores aparentemente son el resulta-
do de una verdadera estimulación de la producción de tilosi-
na y no de la mera conversión del material añadido en tilo-
20 sina. De hecho, las mayores cantidades obtenidas de tilosi-
na con frecuencia son hasta diez veces mayores que las que
resultarían meramente de la conversión estequiométrica del
producto de degradación añadido en el antibiótico.

Entre los productos de degradación que pueden obte-
25 nerse por escisión hidrolítica de la tilosina se encuentra
la desmicosina, O-micaminosil-tilonolida, a la que nos re-
feriremos de aquí en adelante como OMT, micarosa, micamino-
sa y micinosa. La O-micaminosil-tilonolida y la desmicosina
son sustancias antibacterianas eficaces por sí mismas. La
30 micinosa, micarosa y micaminosa son azúcares, siendo el nom-



1 - brado en último lugar un aminoazúcar básico.

5 Todos los productos de degradación de la tilosina mencionados, cuando se añaden al medio de fermentación, estimulan la producción de tilosina en cierto grado, pero la desmicosina y OMT son los estimulantes especialmente preferidos. Los productos de degradación pueden añadirse en forma purificada o, si se desea, pueden emplearse preparaciones crudas con resultados satisfactorios. El hidrolizado crudo de tilosina puede prepararse calentando una solución acuosa de tilosina, o una sal de adición con ácido de la misma, 10 aproximadamente a pH 2, lavando la mezcla de reacción con un disolvente orgánico inmiscible como cloroformo y similares y concentrando a sequedad la fase acuosa lavada.

15 Los correspondientes productos de degradación obtenidos a partir de la dihidrotilosina, que generalmente se produce simultáneamente con la tilosina en la fermentación de ésta, también son eficaces como estimulantes de la producción de tilosina. Estos comprenden la dihidrodesmicosina y la dihidro-OMT así como los azúcares anteriormente mencionados. 20

25 La concentración de producto de degradación empleada en el medio de fermentación para aumentar el rendimiento de tilosina puede variar entre unos 25 y unos 1500 mcg/ml. A niveles hasta 500 mcg/ml aproximadamente, el aumento de la proporción de aditivo se refleja en rendimientos de tilosina proporcionalmente mayores. A concentraciones mayores de unos 500 mcg/ml, sin embargo, el aumento de la cantidad de 30 tilosina obtenida no es proporcional a la cantidad de aditivo empleado y, de hecho, a niveles muy altos la cantidad de tilosina producida es menor que la obtenida cuando se em-



2.60

1 -plean las concentraciones óptimas de aditivo. No obstante, -
incluso a estas altas concentraciones la cantidad de tilosi-
na producida es mayor que la obtenida cuando no se emplea
ningún aditivo. Al parecer, la producción óptima de tilosi-
5 na ocurre cuando se emplean concentraciones del aditivo com-
prendidas entre unos 100 y unos 200 mcg/ml y, por lo tanto,
estas concentraciones son las preferidas en la puesta en prác-
tica de la invención.

El momento en el cual se incorpora el aditivo al me-
10 dio de fermentación puede variar dentro de amplios límites.
Así, en general, los rendimientos de tilosina obtenidos cuan-
do el producto de degradación se añade al principio de la
fermentación son aproximadamente equivalentes a los rendimien-
tos resultantes cuando la adición se lleva a cabo a las 20-
15 24 horas después de iniciarse la fermentación. Sin embargo,
los rendimientos máximos obtenidos de tilosina disminuyen
cuando el aditivo se agrega 48 horas después de la inocula-
ción y las adiciones posteriores producen una estimulación
progresivamente menor.

20 La estimulación de la producción de tilosina se po-
ne de manifiesto por primera vez después de que la fermenta-
ción se ha estado produciendo durante 48 horas aproximada-
mente y se hace más pronunciada a medida que la fermentación
prosigue. Cuando el aditivo se emplea a la concentración pre-
25 ferida de unos 100 a 200 mcg/ml, o en un valor próximo a és-
tos, su presencia en el medio de fermentación puede detectar-
se durante las primeras 48 horas de fermentación aproxima-
mente, pero cuando la fermentación ha transcurrido durante
unas 72 horas o más, no queda ninguna cantidad detectable.
30 A concentraciones superiores a los límites preferidos y espe-



1 cialmente a concentraciones superiores a unos 500 mcg/ml, -
permanece algo de aditivo sin transformar en el medio de fer-
mentación a lo largo de todo el período que dura la misma.

5 La estimulación observada de la síntesis de tilosi-
na se produce en una amplia variedad de medios de fermenta-
ción. En general, aquellos medios que dan mayores rendimien-
tos de tilosina sin estimulación también responden en mayor
grado a la presencia del aditivo estimulante del rendimiento.
Así, según el medio de fermentación empleado, se han observa-
10 do rendimientos mayores de tilosina comprendidos entre un
10 % y un 40 % aproximadamente superiores a los valores de
control no estimulados.

La adición de los productos de degradación parece
tener la misma eficacia para aumentar la producción de tilo-
15 sina tanto si la fermentación se lleva a cabo en matraces
agitados por sacudidas o en equipos provistos de agitadores.
Además, las cantidades relativas de las especies de tilosina
producidas durante la fermentación no parecen estar muy in-
fluenciadas por la adición de cualquiera de los aditivos.
20 Así, por ejemplo, la relación de tilosina a dihidrotilosina
producida en una fermentación es prácticamente constante ya
se realice la fermentación por el procedimiento empleado has-
ta ahora, ya se emplee el procedimiento mejorado del presente
invento utilizando un estimulante de la producción.

25 La puesta en práctica del presente invento no re-
quiere prácticamente ninguna desviación del procedimiento de
fermentación usual para la producción de tilosina sin el be-
neficio de los aditivos estimulantes del rendimiento. Así,
por ejemplo, los medios empleados en todas las etapas del
30 proceso de fermentación pueden ser idénticos a los empleados



1 con anterioridad excepto en la adición del producto de degra-
dación al medio de producción final. Las suspensiones de esporas
de los organismos productores de tilosina Streptomyces
5 fradiae NRRL 2702 o NRRL 2703 se producen en tubos inclinados
de agar como es costumbre en la técnica. A continuación las
suspensiones de esporas se emplean para producir un cultivo
vegetativo intermedio y el cultivo vegetativo así obtenido se
emplea para inocular el medio de fermentación usado para la
producción del antibiótico. Si el producto de degradación se
10 emplea a concentraciones inferiores a unos 500 mcg/ml, no que-
da nada de aditivo en el caldo de fermentación al final del
período de fermentación y, por lo tanto, el aislamiento y pu-
rificación de la tilosina se realizan siguiendo los procedi-
mientos descritos con anterioridad para ello.

15 Para determinar el efecto de un aditivo particular
sobre la producción de tilosina generalmente no es necesario
aislar el antibiótico cristalino en forma pura. El curso de
la fermentación y el efecto del aditivo sobre los rendimien-
tos de tilosina pueden determinarse fácilmente por extracción
20 en cloroformo del caldo de fermentación, ajustado a pH 5. La
cantidad de tilosina presente en el extracto puede determinarse
espectrofotométricamente midiendo la absorbancia del ex-
tracto en cloroformo a 283 milimicras y comparando los valo-
res con los obtenidos con soluciones patrón. Los resultados
25 así obtenidos presentan excelente concordancia con los obte-
nidos mediante el aislamiento efectivo del antibiótico.

La puesta en práctica de la invención queda mejor
ilustrada en las preparaciones y ejemplos que se dan a con-
tinuación.



1

Preparación de OMT

A. Preparación de OMT cruda. Una solución acuosa de tilosina, en forma de base libre o de sal de adición con ácido, se ajusta a pH 2 añadiendo un ácido mineral. La solución
5 ácida resultante se calienta en un baño de vapor durante unas 100 horas, se enfría y se lava con cloroformo para eliminar los materiales coloreados. La fase acuosa se concentra a sequedad para dar una preparación de OMT cruda que contiene aproximadamente del 25 al 30 % en peso de OMT.

10

B. Preparación de OMT purificado. Se sigue el procedimiento descrito en el párrafo A hasta la etapa de lavado con cloroformo. Se ajusta la fase acuosa a pH 5 mediante adición de una solución acuosa de una base y se lava de nuevo con cloroformo para separar la desmicosina que se encuentre
15 presente. El pH de la fase acuosa se ajusta de nuevo a 9 mediante adición de una base y la solución básica se extrae con cloroformo. La capa de cloroformo, que contiene la OMT, se evapora a sequedad a vacío. Se purifica más la OMT por cromatografía de una solución de la misma en cloroformo sobre columna de alúmina.
20

EJEMPLO 1

Se prepara en la forma usual una suspensión de esporas de Streptomyces fradiae NRRL 2702 a partir de un cultivo del organismo mantenido en tubos inclinados de agar con semilla de lima a 4°C. Se emplea una porción de 5 ml de la suspensión de esporas para inocular 800 ml de un medio vegetativo contenido en un erlenmeyer de 2 litros. El medio vegetativo contiene 1,5 % de "cerelose", 0,5 % de sólidos de infusión de maíz, 0,5 % de levadura y 0,3 % de carbonato cálcico
25 en agua destilada. El medio vegetativo inoculado se incuba a
30



1 - 28°C durante 48 horas para proporcionar un medio de siembra.
 Este último se emplea para inocular un medio de producción
 constituido por 1,75 % de harina de pescado, 2,0 % de mela-
 zas de remolacha, 3,0 % de aceite de soja crudo, 0,2 % de
 5 carbonato cálcico, 0,04 % de fosfato diamónico y 0,1 % de
 cloruro sódico en agua. El medio se distribuye en un cierto
 número de matraces de boca ancha de 500 ml, que reciben ca-
 da uno 100 ml del medio y cada matraz se inocular con 5 ml del
 medio de siembra descrito más arriba. Los matraces inocula-
 10 dos se colocan en mesas agitadoras giratorias que funcionan
 a 250 rpm y se deja que la fermentación tenga lugar a 28°C
 durante 138 horas.

Una serie paralela de matraces conteniendo el mismo
 medio de producción e inoculados de la misma forma se incu-
 15 ban en las mismas condiciones con concentraciones variables
 de OMT añadida en el momento de la inoculación. El efecto
 de la concentración de OMT sobre el rendimiento de tilosina
 puede verse en la Tabla I.

TABLA I

<u>Concentración de OMT, mcg/ml</u>	<u>Tilosina producida, mcg/ml</u>
0	4000
50	4665
100	5340
200	5810
25 300	6025
500	5985
750	6100 ^a
1000	5810 ^a
1500	5580 ^a

30 (a) Después de 6 días de fermentación todavía se encuentra



1 presente en estos caldos un exceso de OMT.

EJEMPLO 2

En el siguiente experimento se determinara la velocidad de síntesis de la tilosina en presencia y ausencia de OMT y el efecto de la variación del tiempo de adición de OMT sobre la cantidad total de tilosina producida.

Se preparan en la forma descrita en el Ejemplo 1 unos matraces para agitación por sacudidas que contienen el medio de producción inoculado. Se llevan a cabo dos series de fermentaciones, conteniendo la primera solamente el medio de producción inoculado y la segunda el medio de producción inoculado al que se han añadido 500 mcg/ml de OMT. A menos que se indique lo contrario, la OMT se añade inmediatamente después de la inoculación. Los matraces se cosechan a intervalos de 1 día durante 6 días para seguir el progreso de la fermentación. Los rendimientos de tilosina están indicados en la Tabla II.

TABLA II

<u>Tiempo de fermentación</u>	<u>Medio de producción inoculado solamente</u>	<u>Medio de producción inoculado mas OMT</u>
Horas	mcg/ml	mcg/ml
24	45	50
48	530	655
72	1500	2155
96	2575	3750
120	3345	4680
144	4325	5800
144	4325	5700 ^a
144	4325	4875 ^b
144	4325	4650 ^c



26

- 1 (a) OMT añadida 24 horas después de la inoculación.
- (b) OMT añadida 48 horas después de la inoculación.
- (c) OMT añadida 72 horas después de la inoculación.

EJEMPLO 3

5 La capacidad de la OMT para estimular la producción de tilosina en medios de composición variable se demostró de la forma siguiente:

Se sigue el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1 pero variando la composición del medio de producción.

10 El Medio I es el mismo empleado en el Ejemplo 1.

El Medio II contiene 2 % de melazas de remolacha, 2 % de extracto de levadura, 0,5 % de caldo de infusión de maíz y 3 % de aceite de soja crudo en agua.

El Medio III tiene la siguiente composición:

15	Fosfato dipotásico hidrógeno	2,3 %
	Cloruro sódico	2 g/l
	Sulfato magnésico	5 g/l
	Citrato férrico amónico	1 g/l
	Sulfato de cinc heptahidrato	0,01 %
20	Carbonato cálcico	3 %
	Glicina	7 %
	L-Alanina	2 %
	L-Valina	1 %
	Betaina	5 %
25	Dextrosa	3,5 %
	Oleato de metilo	2,5 %

El pH del Medio III se ajusta a 7,5 aproximadamente antes de la esterilización en autoclave.

30 El efecto de la OMT a diversas concentraciones sobre los rendimientos de tilosina en cada uno de los medios de



1 - fermentación descritos anteriormente está indicado en la Tabla III.

TABLA III

OMT añado	Medio I		Medio II		Medio III	
	Rendimien to de ti- losina ^a	Aumento sobre el control	Rendimien to de ti- losina ^a	Aumento sobre el control	Rendimien to de ti- losina ^a	Aumento sobre el control
mcg/ml	mcg/ml	%	mcg/ml	%	mcg/ml	%
0	4360	--	3395	--	1870	--
50	5580	28	3745	9	1895	--
100	5745	30	3830	13	2125	14
200	6030	38	3770	9	2095	12

(a) Corregido teniendo en cuenta la conversión de OMT en ti- losina.

EJEMPLO 4

15 La estimulación del rendimiento de tilosina por otros productos de degradación de la misma se demuestra por un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1. El efecto de la adición del producto de degradación indicado sobre el rendimiento de tilosina se encuentra en la Tabla IV.

TABLA IV

Producto de degrada- ción añadido	Cantidad añadida mcg/ml	Rendimiento de ti- losina ^a
Ninguno	--	5990
OMT	50	6525
Desmicosina	50	6630
Micinosina	200 ^b	6365

(a) Corregido teniendo en cuenta la conversión de OMT en tilo- sina.

(b) Añadido 48 horas después de la inoculación.



EJEMPLO 5

1 La capacidad de la OMT para estimular la producción
de tilosina en equipo con agitadores se demuestra en unos tan-
ques de reacción de 15 litros, de acero inoxidable, provistos
5 de agitadores. El equipo se esteriliza a 120°C durante 30 mi-
nutos antes de proceder a su carga. Se emplea una fermenta-
ción en tres etapas. Se emplea un medio de siembra vegetativo
incubado con la misma composición que el empleado en el Ejem-
plo 1 para inocular un medio acuoso, en su etapa de agitación
10 por golpeteo, constituido por el 0,5 % de levadura, 0,5 % de
harina de pescado, 1 % de caldo de infusión de maíz, 0,5 % de
aceite de soja crudo y 0,3 % de carbonato cálcico. A su vez,
este medio en etapa de golpeteo se emplea para inocular el
medio de fermentación final empleado en el Ejemplo 1. El efec-
15 to sobre el rendimiento de tilosina al cabo de un periodo de
fermentación de 136 horas a 28°C está indicado en la Tabla V.

TABLA V

<u>OMT añadida, mcg/ml</u>	<u>Rendimiento de tilosina mcg/ml</u>
Nada	3670
50	4310
100	3930
100 ^a	4635

(a) OMT añadida 22 horas después de la inoculación.

EJEMPLO 6

25 El efecto de la dihidro-OMT sobre los rendimientos de
tilosina se determina por un procedimiento análogo al descri-
to en el Ejemplo 1. No se detecta cantidad alguna de dihidro-
OMT en el caldo de fermentación al final de la misma. El efec-
30 to sobre los rendimientos de tilosina está indicado en la Ta-



1 -bla VI.

TABLA VI

	<u>Concentración de dihidro-OMT</u>	<u>Tilosina producción</u>
	mcg/ml	mcg/ml
5	0	4960
	25	5100
	100	5410
	150	5660
	200	5450

10 En resumen, la Patente de Invención que se solicita
recaerá sobre las siguientes:

15

20

25

30



REIVINDICACIONES

1
5
10
15
20
25
30

1. Un procedimiento para aumentar el rendimiento de la tilosina producida por fermentación del micro-organismo Streptomyces fradiae NRRL 2702 o NRRL 2703 en un medio nutritivo, caracterizado por añadir al medio de fermentación entre unos 50 y unos 1500 mcg/ml de un hidrolizado de tilosina, desmicosina, O-micaminosil-tilonolida, dihidrodesmicosina, dihidro-O-micaminosil-tilonolida, micarosa, micinosa o micaminosa.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1 caracterizado por añadir al medio de fermentación un hidrolizado de tilosina crudo preparado calentando una solución acuosa de tilosina a pH 2, lavando la mezcla resultante con un disolvente orgánico inmiscible y concentrando la fase acuosa a sequedad.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1 caracterizado por añadir al medio de fermentación entre unos 100 y unos 500 mcg/ml de desmicosina.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1 caracterizado por añadir al medio de fermentación entre unos 100 y unos 500 mcg/ml de O-micaminosil-tilonolida.

5. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque la adición al medio de fermentación tiene lugar dentro de las 24 horas aproximadamente después de la iniciación de la fermentación.

6. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR EL RENDIMIENTO DE LA TILOSINA PRODUCIDA POR FERMENTACION".

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre-



sente memoria descriptiva que consta de quince páginas mecanografiadas.

Madrid, 26 de octubre de 1.936

BERNARDO UNGRIA

P.P.