



AGO. 1967

344347

P A T E N T E
D E
I N V E N C I Ó N

por "PROCEDIMIENTO FERMENTATIVO PARA LA PREPARACIÓN DE TETRACICLINA", a favor de la firma italiana SOCIETÀ FARMACEUTICI ITALIA, domiciliada en MILANO (Italia), Largo G. Donegani 1-2.

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

Objeto de este invento es un procedimiento fermentativo para la preparación de tetraciclina.

- Más particularmente, se describe un procedimiento microbiológico para la preparación de tetraciclina por el uso
5. de un nuevo microorganismo, el Streptomyces avellaneus, llamado también Streptomyces F.I. 2758. (El Streptomyces avellaneus ha sido registrado en el Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey (Gran Bretaña), con el número de índice I.M.I.126840 y en el Institute of Microbiology of the
 10. Rutgers University (EE.UU.) con el número de índice 3911.)

POOR
QUALITY



344347

El antibiótico tetraciclina, su preparación y sus propiedades químicas, físicas y biológicas se han descrito plenamente en la literatura (Waksman, S.A., "The Actinomycetes", vol. III, 1962, pág. 389).

5. Ahora se ha descubierto que mediante la fermentación del nuevo microorganismo Streptomyces F.I. 2758 se forman cantidades elevadas del antibiótico tetraciclina y que la presencia de iones de cloro en el terreno fermentativo no incluyen en el proceso en el sentido de determinar alguna formación de clortetraciclina.
10. El nuevo microorganismo productor de tetraciclina, aislado de una muestra de terreno procedente de las Grutas de Caudano (Cunco, Italia), presenta las siguientes características morfológicas, culturales y bioquímicas:

Características morfológicas:

15. El micelio vegetativo presenta en los terrenos de cultivo comunes hifas de 0,9 a 1,1 micras de espesor, longitud variable y ramificación abundante. De éstas se originan hifas más grandes, de 1,2 a 1,5 micras de espesor, no muy largas, rectas, generalmente recogidas en mechones que simulan un abanico y ramificadas simpodialmente;
20. en cierto momento, estas hifas conidióforas se transforman en conidios que presentan superficies lisa, en forma de barrilete o ligeramente cilíndrica, de dimensiones 1,2-1,5 x 1,4-1,7 micras. Al principio estos conidios están dispuestos en cadenas de 5 a 15 conidios.

344347



1967

dios cada una y luego están libres.

Características culturales y bioquímicas:

5. En la Tabla I se registran las características culturales observadas en los terrenos que se indican, haciendo crecer el microorganismo a 28°C y realizando las observaciones al cabo de 5, 15 y 25 días del momento de la siembra en probetas y en placas de Petri. La vepa crece bastante lentamente en los terrenos de cultivo, a base de agar, tanto sintéticos como orgánicos, formando en los terrenos sintéticos un micelio vegetativo que consiste siempre en una pátina originada por la confluencia de diversas colonias poco elevadas y de color pajizo a amarillo anaranjado pardusco.

10. En los terrenos orgánicos se forma una pátina originada por la confluencia de colonias discretamente elevadas, en forma de cúpula, cuyo color pasa de un amarillo más o menos neto a un pardo castaño bastante cargado, que a veces presenta tonalidades rojo-parduscas.

15. El micelio aéreo, en los terrenos sintéticos, es generalmente escaso o está ausente. El aspecto es raso y de color variable del blanco al beige, con leves tonalidades de pardo avellanado.

- 20.



344347

En los terrenos orgánicos, por lo general, el micelio aéreo se desarrolla con bastante abundancia, con aspecto raso y color del pardo avellanado claro al avellanado neto.

5. El Streptomyces F.I. 2758i no se desarrolla en la leche y la deja inalterada; no hidroliza la gelatina, no reduce los nitratos a nitritos, no produce ácido sulfhídrico, no produce tirosinasas ni tampoco melanina. Hidroliza abundantemente el almidón, utiliza para el crecimiento la glucosa,
10. la sacarosa y la maltosa, mientras que no se utiliza la l-arabinosa, la d-xilosa, el mesoinositol, la d-manosa, la d-fructosa, la ramnosa ni la rafinosa.

- La cepa no produce pigmentos solubles, no produce esclerosis en cultivo sólido y no crece a 50°C. En cultivo
15. líquido aireado produce el antibiótico tetraciclina.



TABLA I -

344347

Características culturales del Streptomyces F.I. 2758.

| MEDIO | CRECIMIENTO | MICELIO AEREO | MICELIO VEGETATIVO |
|---|---|---|--|
| 5. Agar de ben- net (1) | Discreto, en pe- queñas colonias que confluyen en pátina ligera- mente realzada | Crecimiento discreto, en pátina rasa pulverulenta de color cha- mois claro | color de amarillo limón a castaño claro; envés aná- logo, pero de co- lor más atenuado |
| 10. Agar de Cza- peck (1) | Pequeñas colo- nias que con- fluyen en una pátina escasa, casi transpa- rente | ausente | incoloro, con un envés casi pajizo |
| 15. Agar-aspara- gina-glucosa (1) | Discreto, en pequeñas co- lonias que confluyen en pátina lige- ramente real- zada | ausente | de color pajizo a castaño claro, con envés de color aná- logo |
| 20. Agar-gliceril- na-glicina (1) | Escaso, de pequeñas co- lonias que confluyen en pátina lige- ramente real- zada | Escaso, en pá- tina rasa, li- geramente pul- verulenta, de color blanco con leves tona- lidades de par- do chamóis | de incoloro a pa- jizo castaño has- ta pardo castaño claro, con envés de color pajizo |
| Agar de Emer- son (1) | Discreto, de pequeñas co- lonias que confluyen en pátina plega- da | ausente | de anaranjado cas- taño hasta castaño con leves tonalida- des rojizas |

344347



5.

10.

15.

| | | | |
|--|---|--|---|
| <p>Agar, almidón y sales (2)</p> | <p>Discreto, en pequeñas colonias que confluyen en pátina lisa</p> | <p>Discreto, en pátina rasa; pulverulenta, de color blanco a pardo chamois, con leves tonalidades rosadas, vinosas</p> | <p>de pajizo a castaño claro, con envés de color pajizo</p> |
| <p>Agar-patata (4)</p> | <p>Discreto, en pequeñas colonias que confluyen en pátina ligera monte rugosa</p> | <p>Escaso, en pátina arrasada, pulverulenta, de color blanco con tonalidades de pardo chamois</p> | <p>de pajizo anaranjado a pardo castaño claro, con envés de color análogo pero más atenuado</p> |
| <p>Agar-avena (3)</p> | <p>Discreto, en pequeñas colonias que confluyen en pátina lisa</p> | <p>Discreto, de blanco pardusco a chamois claro</p> | <p>de pajizo a castaño claro, con envés de color análogo</p> |
| <p>Agar-asparagina-glicerina (1)</p> | <p>Escaso, en pequeñas colonias que confluyen en pátina lisa</p> | <p>Escaso, blanco, con tonalidad parda chamois, de crecimiento raso, pulverulento</p> | <p>de pajizo con leves tonalidades verdosas, a anaranjado y pardo castaño claro</p> |
| <p>Agar-extracto de levadura-glucosa (1)</p> | <p>Discreto, en pequeñas colonias que confluyen en pátina ligera monte rugosa</p> | <p>ausente</p> | <p>de amarillo anaranjado a pardo castaño</p> |



344347

- (1) Waksman, S.A.: "The Actinomycetes", vol. II, The Williams and Wilkins Company, 1961, pág. 328-334.
- (2) Pridham T.G., Anderson P., Feley C., Lindenfelser L.A., Hesselstine C.M. y Benedict R.B.: "Antibiotic Annual 1956-1957", pág. 947-953.
- (3) Baldacci E., Giolitti G., Küster E.; y Scotti T.: *Journal of Microbiology*, 2, pág. 39, 1961.
5. (4) a 200 g de patatas horvidas y filtradas con gasa se añaden 20 g de glucosa y 20 g de agar; luego se ajusta al volumen de 1 litro y se esteriliza a 120°C durante 20 minutos.

Identificación de la cepa

Las características que presenta el microorganismo en examen y que se han descrito precedentemente permiten referirlo al género Streptomyces Waksman y Henrici (Bergey's 10. Manual of Determinative Bacteriology, 7ª edición, 1957, pág. 744-745).

El Streptomyces F.I. 2758 pertenece a la sección "Rectus flexibilis", de Pridham y col. (*Appl. Microbiol.*, 6, 15. 1958, pág. 52), por cuanto forma esporóforos rectos. Esta sección se divide en seis "series", caracterizadas por el color del micelio aéreo: blanco, ante oliváceo, amarillo, azul, rojo y gris.

Nuestro microorganismo, que presenta micelio aéreo de color típicamente avellana, no puede evidentemente ser referido a ninguna de estas series ni, por lo tanto, a las especies respectivas.



344347

5. El Streptomyces F.I. 2758 pertenece además a la sección II de Baldacci: "micelios vegetativos coloreados; desarrollo sobre agar generalmente abundante, consistente (cremoso, pelucoso, etc.); esporificación retardada y a veces parcial" (Journal of Microbiology, 6, 1958, pág. 10),

Esta sección está dividida en "series" caracterizadas por diferentes combinaciones de los colores del micelio vegetativo y del micelio aéreo.

10. Ninguna de estas combinaciones corresponde a la de nuestro microorganismo, que se caracteriza por micelio vegetativo anaranjado pardusco y micelio aéreo color avellana.

15. Por último, el Streptomyces F.I. 2758 pertenece al grupo de series melanino-negativas de Waksman (The Actinomycetes", vol. II, 1961, pág. 117). Las series de este grupo se caracterizan por diferentes combinaciones de los caracteres siguientes: color del micelio aéreo, color del micelio vegetativo y formación de espirales. Ninguna de estas combinaciones coincide con la de nuestro microorganismo, que se caracteriza por micelio aéreo de color avellana, micelio vegetativo de color anaranjado pardusco y ausencia de espirales;
- 20.

344347



1967

En la Tabla II se expone una comparación entre las características del Streptomyces F.I. 2758 y las de los otros estreptomicetos productores de tetraciclina; de esa comparación resulta evidente que el Streptomyces F.I. 2758 no es identificable con ninguno de tales microorganismos.

Se concluye que el microorganismo en examen debe considerarse especie diversa de las conocidas hasta ahora, y por tanto lo consideramos especie nueva y lo definimos con el binomio Streptomyces avellaneus.

10. TABLA II

Comparación entre el Streptomyces F.I. 2758 y las especies productoras de tetraciclina.

| | <u>Streptomyces F.I. 2758</u> | <u>Streptomyces aureofaciens</u> mutante, cp. 11834 ATCC | <u>Streptomyces</u> cp. 3054, mutante de <u>S. aureofaciens</u> |
|-----------------|--|--|---|
| 15. Esporóforos | rectos, sección RF | rectos, sección RF | rectos, sección RF |
| Esporas | cilíndricas; de 1,2-1,5 x 1,4-1,7 micras | ovalos, de 0,5-1,6 x 0,5-1,6 micras | ovalos o cilíndricas, de 1 x 1,5 micras |



344347

| | | | | |
|-----|--------------------|---|---|---|
| | Micelio vegetativo | de amarillento pálido a pardo castaño claro; envés de amarillo pajizo a castaño | de hialino a amarillo anaranjado; envés de amarillo a pardo | de blanco rosado a rojo salmón; envés de chamois oliváceo |
| 5. | Micelio aéreo | de blanco a pardo avellanado claro | de blanco a gris | de blanco a amarillo; algodonoso o pulverulento |
| 10. | Pigmentos solubles | ausente | a veces presente; de amarillo limón a tierra de Siena | ausente |
| 15. | Almidón | + | + | + |
| | Gelatina | - | - | + |
| | Nitratos | - | - | + |
| | Tirosina | - | dato no indicado | dato no indicado |
| | Melamina | - | " | " |
| | Ácido sulfhídrico | - | - | " |
| | Galactosa | falta el dato | + | " |
| | Manitol | - | - | " |
| 20. | Leche | - | - | + |

+ reacción positiva

- reacción negativa



344347

| | <u>Streptomyces</u> <u>cp. U. V.8,</u> <u>mutante de S.</u> <u>aureofaciens</u> | <u>Streptomyces</u> cp. <u>11652 ATCC</u> | <u>Streptomyces</u> <u>verticillatus</u> <u>cp. AB929</u> | <u>Streptomyces</u> <u>cp. CDS. 314</u> <u>mutante de S.</u> <u>aureofaciens</u> |
|-----|---|--|---|---|
| 5. | Los cultivos viejos muestran coloración negra, con pequeñas manchas de un micelio blanco; son masas de cuerpos en cadenillas breves y miden de 0,5 a 4,5 micras | espirales abicrtas; sección RA | biverticilado sin espirales; sección BV | con ganchos apicales; sección RA |
| 10. | | cilíndricas, de 0,99-1,32 x 0,66 micras | cilíndricas, de 0,6 a 0,8 x 1,9-2,5 micras | no indicado |
| | de incoloro a amarillo | ceroso, de amarillo a anaranjado y rojo o bien oliváceo pardusco | blanco, con envés blanco | no indicado |
| 15. | de blancuzco a gris | de blanco a gris ratón hasta gris negruzco | verde oliváceo, con tonalidades blanco-grisáceas | blanco |
| | de pardo a verde algunas veces | tierra de Siena o bien rojo o pardo negruzco | ausente | ausente |
| 20. | no indicado | + | + | no indicado |
| | " | + | + | " |
| | " | - | + | " |
| | " | no indicado | no indicado | " |
| | " | " | " | " |
| | " | " | + | " |
| | " | " | no indicado | " |
| | " | " | " | " |
| | " | - | + | " |



344347

| | <u>Streptomyces</u> <u>88 Ist. Antibiot.</u> <u>Polonia</u> | <u>Streptomyces</u> <u>inscofaciens</u> <u>cp. 12061</u> <u>ATCC</u> | <u>Streptomyces</u> <u>psamnoticus</u> | <u>Streptomyces</u> <u>cp</u> <u>13938 ATCC</u> |
|-----|---|---|---|---|
| 5. | rectos, sección RF | no indicado | rectos, sección RF | rectos, sección RF |
| | no indicado | no indicado | no indicado | esféricas y ovales, de 1,4 x 1,4-2,1 micras |
| 10. | no indicado | de incoloro a pardo; envés pardusco con tonalidad roja | de amarillo claro a pardo claro | de incoloro a amarillo; envés de amarillo a negro |
| | rojo sucio o anaranjado | casi siempre ausente, blanuzco gris | de pardo claro a pardo oscuro con tonalidades verdosas | de blanuzco a pardo grisáceo |
| 15. | de verde pardusco a amarillo de oro anaranjado | de gris a rojo pardo o también a negro cargado | de pardo claro a pardo oscuro hasta verde pardo cargado | ausente |
| 20. | + - - no indicado " " " " | + - - no indicado " " " " | - + no indicado " - no indicado " " " | + - no indicado " " + + + |

344347



GO. 1967

| | <u>Streptomyces</u> <u>persimilis</u> | <u>Streptomyces aureo-</u> <u>faciens Mediolanum</u> cp. 462840 | <u>Streptomyces</u> <u>aurofaciens</u> cp. A377 ATCC 10762 | <u>Streptomyces</u> <u>viridifaciens</u> cp. BL567201 ATCC 11980 |
|-----|---|---|--|---|
| 5. | no indicado | no indicado | flexuosos, con tendencia a formar espira- les; sección RA | espirales abiertas; sección RA |
| 10. | no indicado | no indicado | lisas, de es- féricas a re- dondas | no indicado |
| 10. | amarillo claro a pardo | de amarillo cre- ma a amarillo anaranjado hasta pardo | de hialino a amarillo ana- ranjado hasta pardo púrpura | de pardo pálido a pardo |
| 15. | de blanco de nieve a gris claro hasta gris obscuro | de blanco amari- llento a blanco grisáceo hasta azul | de blancuzco a gris ceniza hasta gris cargado | gris-ratón |
| 15. | de amarillo claro a ama- rillo pardo | de amarillo fluo- rescente a ama- rillo pardo | algunas veces presentes; de amarillo pá- lido a pardo pálido | amarillo verdoso |
| 20. | + = no indicado " " " " " " | no indicado " " " " " " " | - + no indicado " - + no indicado " " + - - | no indicado " " " " " " " |



344347

El Streptomyces avellaneus se conserva mediante liofilización, utilizando leche como medio susponsor.

5. La producción de antibióticos se efectúa con los métodos normales bien conocidos y consiste en hacer desarrollar la nueva especie en un terreno de cultivo líquido, previamente esterilizado, en condiciones aeróbicas, a temperatura variable entre 22°C y 35°C (de preferencia a 28°C), por un período de tiempo variable entre 72 y 168 horas (de preferencia, 120 horas) y con un pH que al principio es de 6,0-7,0
10. y al final del proceso fermentativo es de 6,5-7,2.

El terreno de cultivo consiste en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una fuente de sales.

15. La fuente de carbono puede estar constituida por almidón, dextrina, glicerina, maltosa, maceración de maíz, solubles de los destiladores, aceite de soja, aceite de lardo y otras materias que se emplean ordinariamente con tal fin.

20. La fuente de nitrógeno, aparte de las sustancias complejas indicadas antes, puede estar constituido por extracto de carne, levadura seca, peptona o harina de semillas de algodón, caseína o hidrolizados de caseína y por sales de amonio como: sulfato de amonio, fosfato diamónico y nitrato de amonio, además de otros empleados corrientemente para tal fin.

344347



AGO. 1967

- Las sales minerales útiles para la producción del antibiótico varían según el terreno que se use. En un terreno que contenga sustancias complejas, como harinas diversas y residuos de fermentación, han resultado útiles las
5. adiciones de carbonato de cal y de fosfatos de sodio y potasio. En terrenos a base de dextrina y caseína o de sales amónicas se necesitan adiciones de sales minerales, entre ellas las sales de potasio, de magnesio, de hierro, de cobre, de zinc, de manganeso y de cobalto.
10. La fermentación puede efectuarse en matraces de Erlenmeyer o en fermentadores de laboratorio e industriales de diversa capacidad.
- La tetraciclina de los caldos de fermentación se determina cuantitativamente por métodos químicos o biológicos.
15. Para extraer de los caldos la tetraciclina, pueden emplearse los métodos convencionales de extracción conocidos en el campo de los antibióticos, como las extracciones con disolventes comunes en presencia o no de coadyuvantes o adsorbentes. Entre estos métodos, uno que permite extraer o purificar óptimamente
20. la tetraciclina de los caldos de fermentación obtenidos según el procedimiento de este invento consiste en esencia en una extracción con una mezcla de tricresol y tetracloruro de carbono, en pH alcalino. Las mezclas de tricresol (constituido por las tres formas isómeras del cresol y que tiene un
25. peso específico de 1,030 a 1,038) y de tetracloruro de carbo-



344347

- no que se emplean con preferencia para la extracción son las comprendidas entre las relaciones 1:1 y 1:3 de tricresol a tetracloruro de carbono. Más particularmente, la extracción se realiza del modo siguiente: al caldo de cultivo que contiene la tetraciclina, se añade ácido oxálico, se filtra y al filtrado se agrega un agente quelante para iones metálicos polivalentes, como por ejemplo tetracetato sódico de etilendiamina; a continuación se extrae con una mezcla de tricresol y tetracloruro de carbono después de haber ajustado el pH a 8-8,5 por adición de una base alcalina.
- 5.
 - 10.

- Se separan las fases orgánicas (de preferencia, por centrifugación) y se les añade acetona y una solución acuosa de un ácido inorgánico u orgánico (de preferencia, ácido cítrico). Se sacude la mezcla y se separan las fases.
- 15.

- Para facilitar la separación de las dos fases y el paso de dichas impurezas coloreadas en la fase orgánica, resulta conveniente añadir, antes de efectuar la extracción, cierta cantidad de sustancias tensioactivas, como sulfonatos de alquilo alcalinos o sales amónicas cuaternarias y análogos.
- 20.
 - 25.

A continuación se separa la fase acuosa, ajustada a pH 5-7 por adición de una base alcalina (por ejemplo,



344347

hidratos o carbonatos alcalinos). El antibiótico tetraciclina se precipita y es aislado como tal y purificado por recristalización o transformado en sus sales con un ácido inorgánico u orgánico, según las técnicas conocidas.

5. Los ejemplos que siguen sirven para ilustrar el invento, pero sin limitarlo.

EJEMPLO 1

Se prepararon dos matraces de Erlenmeyer de 300 cc que contenían cada uno 60 cc del siguiente terreno vegetativo:

| | | |
|-----|----------------------|----------|
| 10. | Maceración de maíz | 1,5% |
| | Sulfato amónico | 0,4% |
| | Carbonato cálcico | 0,6% |
| | Almidón soluble | 2% |
| | Glucosa | 0,5% |
| 15. | Harina de maíz | 0,1% |
| | Fosfato monopotásico | 0,06% |
| | Agua del grifo hasta | 1000 cc. |

La esterilización se efectuó por calentamiento en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

20. El pH después de la esterilización era de 6,6.

Cada matraz se inculó con un tercio aproximadamente de la superficie micolar de un cultivo on slant de



= 18 =

344347

Streptomyces avellaneus de 10 días de edad, desarrollado a 28°C en el siguiente terreno sólido:

| | | |
|----|---------------------------------------|----------|
| | Extracto de malta | 1% |
| | Extracto de levadura | 0,4% |
| 5. | Glucosa | 0,4% |
| | Agar | 1,8% |
| | Agua destilada hasta | 1000 cc. |
| | pH después de la esterilización: 6,2. | |

10. Se incubaron los matraces a 28°C durante 27 horas, en un agitador giratorio a 240 vueltas por minuto y con excentricidad de 3,5 cm.

3 cc de un cultivo así desarrollado se introdujeron como inóculo en un matraz de Erlenmeyer de 300 cc, que contenía 300 cc del terreno siguiente:

| | | |
|-----|---------------------------|----------|
| 15. | Almidón | 6% |
| | Carbonato cálcico | 0,4% |
| | Harina de soja desgrasada | 3% |
| | Caseína | 1% |
| | Sulfato de magnesio | 0,05% |
| 20. | Melaza | 0,2% |
| | Aceite de lardo | 1% |
| | Agua del grifo hasta | 1000 cc. |

El pH después de la esterilización a 120°C durante 20 minutos fue de 6,8.



344347

Se incubó a 28°C en un agitador giratorio a 220 vueltas por minuto, con una excentricidad de 3,5 cm, tal como se ha descrito para la fase vegetativa.

5. Al cabo de 120 horas de fermentación, se ha obtenido la actividad máxima, correspondiente a una concentración de 6000 microgramos/ml de tetraciclina.

EJEMPLO 2

Se procedió tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, con la diferencia de que para la fase vegetativa se utilizó el

10. terreno siguiente:

| | |
|----------------------|----------|
| Maceración de maíz | 3,5% |
| Carbonato cálcico | 1,8% |
| Sacarosa | 0,5% |
| Agua del grifo hasta | 1000 cc. |

15. Esterilización: 120°C durante 20 minutos.

pH después de la esterilización 6,5;

y para la fase productiva, el terreno siguiente:

| | |
|-----------------------|-------|
| Almidón | 12% |
| Maceración de maíz | 2,6% |
| 20. Carbonato cálcico | 1% |
| Sulfato amónico | 1% |
| Sulfato de manganeso | 14,5% |
| Cloruro de cobalto | 0,78% |

= 20 =



344347

| | |
|------------------------------|----------|
| Harina de semilla de algodón | 0,45% |
| Aceite de lardo | 2,5% |
| Agua del grifo hasta | 1000 cc. |

5. El pH se ajustó a 6,2 con hidróxido sódico antes de la esterilización y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos.

10. Al cabo de 120 horas de fermentación en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1, se alcanzó una actividad correspondiente a una concentración de 10,500 microgramos/ml de tetraciclina.

EJEMPLO 3

Se procedió como en el Ejemplo 1, con la diferencia de que la fase vegetativa se realizó en el terreno siguiente:

| | |
|----------------------|----------|
| Maceración de maíz | 1,5% |
| 15. Sulfato amónico | 0,4% |
| Carbonato cálcico | 0,6% |
| Fosfato monopotásico | 0,03% |
| Almidón | 2% |
| Glucosa | 0,5% |
| 20. Harina de maíz | 0,1% |
| Harina de soja | 0,4% |
| Aceite de lardo | 0,25% |
| Agua del grifo hasta | 1000 cc. |



1967

= 21 =

344347

El pH se ajustó a 6,6 por adición de hidróxido sódico.

La fase productiva se realizó en el terreno siguiente:

| | | |
|-----|----------------------|---------|
| | Almidón | 6% |
| 5. | Glucosa | 0,5% |
| | Maceración de maíz | 2,5% |
| | Harina de soja | 0,5% |
| | Harina de maíz | 1% |
| | Sulfato amónico | 0,6% |
| 10. | Cloruro amónico | 0,1% |
| | Sulfato de manganeso | 0,01% |
| | Cloruro de cobalto | 0,0005% |
| | Aceite de lardo | 3%. |

15. Al cabo de 120 horas de fermentación, se alcanzó una producción máxima de 7700 microgramos/ml de tetraciclina.

EJEMPLO 4

En un fermentador de vidrio de 10 litros se esterilizaron por calentamiento a 120°C durante 30 minutos 6 litros del terreno vegetativo que se ha expuesto en el Ejemplo 2.

20. Después del enfriamiento, se inoculó con 200 cc de un cultivo vegetativo preparado en matraz de Erlenmeyer tal como se ha explicado en el Ejemplo 1.



= 22 =

344347

- Se incubó durante 24 horas a 28°C, con una corriente de aire correspondiente a 6 litros por minuto y con una agitación de 350 vueltas por minuto de un agitador provisto de cuatro palas. El terreno vegetativo así obtenido sirvió
5. para inocular, en la proporción de 5%, 6 litros del terreno productivo expuesto en el Ejemplo 2, contenido en un fermentador de 10 litros y esterilizado a 120°C durante 30 minutos.

- Se incubó a 28°C con una corriente de aire de 6 litros por minuto y con una agitación de 450 vueltas por minuto
10. de un agitador provisto de cuatro palas. Al cabo de 5 días de incubación, se obtuvo una producción correspondiente a 7500 microgramos/ml de tetraciclina.

EJEMPLO 5

- A 7,330 kg de un caldo de cultivo preparado tal
15. como se ha descrito en el Ejemplo 4 y que contenía 55 g de tetraciclina (calculada como clorhidrato) se añadieron 87 g de ácido oxálico y se agitó la mezcla durante una hora. Se agregaron 500 g de tierra de infusorios y se filtró. Luego se lavó la torta con 2,5 litros de una solución acuosa que contonía
20. 1,1% de ácido oxálico. Se obtuvieron 9,8 litros de filtrado, a los que se añadieron 55 g de tetraacetato sódico de etilendiamina y una mezcla compuesta por 500 cc de tricresol y 1000 cc de tetracloruro de carbono. Se agitó la mezcla enérgi-



344347

camente durante la adición de 275 cc de un solución acuosa al 20% de hidróxido sódico y el pH a 8.

5. Se separaron luego las fases por centrifugación y la fase orgánica se lavó con un poco de agua, se sacudió con 5 g de carbón decolorante y se filtró en filtro de papel que sostenía una capa de tierra de infusorios.

10. Se añadieron al filtrado 500 cc de acetona y 300 cc de una solución acuosa al 10% de ácido cítrico. Se agitó, se separaron las fases y la fase orgánica se extrajo sucesivamente con dos porciones de 200 cc y 100 cc de una solución acuosa al 10% de ácido cítrico. Se combinaron los extractos hidroacetónicos, se les añadieron 10 cc de una solución acuosa al 10% de sulfato de estearil-trimetilamonio y se sacudió la mezcla con 320 cc de butanol. El butanol, que quedó ahora coloreado de amarillo pardusco, se separó y se eliminó.

15. Se agitó el extracto acuoso purificado, se le añadió una solución acuosa de potasa al 20% hasta pH de 5,8, se enfrió en baño de hielo y al cabo de 20 horas se recogió sobre filtro el precipitado obtenido, se le lavó con agua y se le secó a 50°C en vacío. Se obtuvieron 35,21 g de producto con una potencia de 102,2 microgramos/mg, equivalentes a 35,21 g de clorhidrato de tetraciclina. De las aguas madres, por alcalinización a pH 7, se pudo separar otra cantidad más de antibiótico, que, secado a 50°C en vacío, resultó estar constituido por 6,69 g de tetraciclina, con una potencia de



= 24 =

344347

355 microgramos/mg, equivalentes a 5,72 g de clorhidrato de tetraciclina.

EJEMPLO 6

- A 16 kg de caldo de cultivo que contenían 160 g
5. de tetraciclina en forma de clorhidrato, se añadieron 200 g de ácido oxálico. Se agitó la mezcla durante una hora, se le añadió 1 kg de tierra de infusorios y se filtró. Se lavó la torta con 5,5 litros de una solución acuosa al 1% de ácido oxálico. Al filtrado así obtenido se añadieron 160 g de
 10. tetracetato sódico de etilendiamina, se ajustó el pH de la mezcla a 8,4 y se la extrajo con una mezcla de 1,07 litros de tetracloruro de carbono y 1,07 litros de tricresol. La fase orgánica se extrajo con 1050 cc de acetona y 750 cc de una solución acuosa al 10% de ácido cítrico. Se agitó, se separaron las fases y se extrajo la fase orgánica, sucesivamente,
 15. con dos porciones de 400 y 350 cc de una solución acuosa de ácido cítrico al 10%. Los extractos hidroacetónicos reunidos se purificaron por sacudimiento con 500 cc de metilisobutilcetona y 1 g de sulfonato sódico de laurilo. Se desechó
 20. el extracto en el disolvente orgánico y se trató el extracto acuoso con 5 g de carbón decolorante. Al extracto filtrado se añadió una solución acuosa al 20% de KOH hasta pH 5,5 y, después de enfriamiento en hielo durante 30 horas, se recogió



344347

sobre filtro el precipitado obtenido, se le lavó con agua y se le secó a 50°C en vacío.

Se obtuvieron 98,7 g de tetraciclina con una potencia de 106 microgramos/mg, equivalente a 104 g de clorhidrato

5. de tetraciclina.

De las aguas madres, que contenían 17 g de clorhidrato de tetraciclina, se obtuvieron todavía, por extracción con tricresol/tetracloruro de carbono, siguiendo un procedimiento análogo al que se ha descrito antes, 11,5 g de anti-

10. bitótico con una potencia de 951 microgramos/mg, equivalentes a 10,93 g de clorhidrato de tetraciclina.

EJEMPLO 7

A 11,25 kg de caldo de cultivo que contenían 113,6 g de tetraciclina (calculada como clorhidrato) se añadieron

15. 200 g de ácido oxálico.

Se agitó la masa durante una hora, se añadió 1 kg de tierra de infusorios y se filtró. Luego se lavó la torta con 7 litros de solución acuosa de ácido oxálico al 1%.

Al filtrado (14,8 litros) se añadieron 100 g de
20. tetraacetato sódico de etilendiamina, 700 cc de tricresol y 1400 cc de tetracloruro de carbono. Se ajustó el pH a 8,4 con solución acuosa al 20% de hidróxido sódico y se agitó durante 15 minutos. Se separaron las dos fases en la centri-



= 26 =

344347

fugadora y la fase acuosa se extrajo todavía una vez con 100 cc de tricresol y 300 cc de tetracloruro de carbono y luego se desechó.

- Se combinaron los extractos orgánicos y se filtraron sobre filtro de papel que sostenía una capa de tierra de infusorios.
- 5.

- Se añadieron al filtrado (1240 cc), sucesivamente, 300 cc de acetona y 980 cc de solución acuosa de ácido cítrico al 10%, se agitó y, para desvanecer un ligero enturbiamiento, se agregaron 150 cc de una solución acuosa de ácido sulfúrico al 20%.
- 10.

- Se agitó todavía y se separaron las fases. La fase orgánica se extrajo aún por dos veces con 200 cc de solución acuosa de ácido cítrico al 10%. A los extractos hidroacetónicos combinados se añadieron 600 cc de butano normal y se agitó. Luego se añadió una solución acuosa de hidróxido potásico al 20% hasta alcanzar un pH de 5,5.
- 15.

- Se prosiguió la agitación durante 63 horas a la temperatura ambiente, se recogió el precipitado sobre filtro y se le lavó con butanol normal y luego con agua.
- 20.

Secando a 50°C y en vacío, se obtuvieron 90,600 g de tetraciclina, con una potencia de 991 microgramos/mg, equivalentes a 89,78 (rendimiento, 79%).



1967

= 27 =

344347

N O T A

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente italiana nº 14040 A/67 del 23 de Marzo de 1967.

5. 1. Procedimiento fermentativo para la preparación de tetraciclina, caracterizado por cultivarse el nuevo Streptomyces avellancus en condiciones aerobias en un medio nutritivo que contiene una fuente de carbono, hidrógeno y sales minerales, a temperatura entre 22º y 35ºC, por un
10. período de 72 a 168 horas y con un pH de 6,0 a 7,2, por separarse del caldo de fermentación la tetraciclina formada y por purificarla como tal o transformarla en sus sales con ácidos inorgánicos u orgánicos, atóxicos y farmacéuticamente aceptables, de manera conocida.
15. 2. Procedimiento fermentativo para la preparación de tetraciclina.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 27 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 22 de Marzo de 1967
p.a.

JAIME IERN

Firmado: ROQUE SANZ HERRERO