

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

19 ES	21	NUMERO	20 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		470.382	
		31-5-1978	

5 DIC. 1978

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
77/16.674	1-6-1977	Francia
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"UN PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE ANTIBIOTICOS DEL GRUPO DE LAS TETRACICLINAS POR VIA MICROBIOLOGICA"		
71 SOLICITANTE (S)		
L'AIR LIQUIDE, SOCIETE ANONYME POUR L'ETUDE ET L'EXPLOITATION DES PROCEDES GEORGES CLAUDE (SERIE: 2.301-A.L.-LB/LR-CODE: 210)		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
75, Quai d'Orsay, Paris 75007 Francia		
72 INVENTOR (ES)		
Yves Gouges y Jean Amen		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ		(P.-69.035)

jga

1                    La presente invención se refiere a un procedi-  
miento de cultivo de microorganismos, especialmente de bac-  
terias productoras de sustancia fisiológicamente activa. Di-  
cha invención se refiere a la producción, por cultivo sumer-  
5 gido, de antibióticos del grupo de las tetraciclinas entre  
las cuales se encuentran tetraciclina, oxitetraciclina y  
clorotetraciclina.

                  En los procedimientos utilizados para producir  
los antibióticos del grupo de las tetraciclinas, por vía mi-  
10 crobiológica, los medios de cultivo son complejos. Dichos  
medios contienen generalmente almidón, proteínas, por ejem-  
plo harina de soja, licor de maceración de maíz, y sales  
minerales nutritivas. Estas fermentaciones son aerobias,  
proporcionándose el oxígeno necesario a partir de aire in-  
15 suflado por un compresor durante todo el cultivo. El medio  
se agita generalmente. Las bacterias son del género *Strepto-  
myces*.

                  Durante el transcurso del cultivo, el medio, ba-  
jo el efecto conjugado de la agitación y de la aireación,  
20 tiene tendencia a formar una espuma abundante. Con el fin  
de evitar un vaciado parcial del fermentador, como conse-  
cuencia de la formación de la espuma, se introducen periódicamente uno o varios agentes antiespumantes, generalmente  
25 aceites animales tales como aceite de manteca de cerdo. Es-  
tos aceites son metabolizados por la bacteria del mismo título que el substrato carbonado principal.

                  La duración de un ciclo de fermentación es como  
mínimo de aproximadamente 120 horas. La temperatura de fer-  
mentación se mantiene constante y se sitúa generalmente en-  
30 tre 25 y 30°C.

1 El oxígeno disuelto es uno de los parámetros  
principales a controlar para efectuar de una manera correc  
ta una fermentación de antibiótico del grupo de las tetra-  
ciclinas. Durante el cultivo de un Streptomyces productor  
5 de antibiótico del grupo de las tetraciclinas, se observa  
un fuerte descenso del oxígeno disuelto durante la primera  
mitad del cultivo.

Para que el antibiótico se produzca a la veloci-  
dad óptima, se ha comprobado que el contenido en oxígeno  
10 disuelto debe ser inferior a un valor mínimo. Si el valor  
del oxígeno disuelto es demasiado bajo, de ello se sigue  
una reducción de la velocidad de producción y una disminu-  
ción de la concentración final.

15 El oxígeno disuelto en el medio de fermentación  
es el resultado, por una parte, de la transferencia de oxí-  
geno realizada por el aparato de fermentación y, por otra  
parte, de la demanda del microorganismo que se desarrolla.

Se han encontrado condiciones de cultivo en at-  
mósfera sobreoxigenada que, manteniendo el oxígeno disuelto  
20 en un valor conveniente durante el cultivo, permiten conser-  
var la velocidad máxima de producción de antibióticos del  
grupo de las tetraciclinas.

Se ha observado que generalmente este procedi-  
miento permitía mejorar la concentración final de antibió-  
25 ticos, tomando como referencia una fermentación bien condu-  
cida en el seno del aire.

El nuevo procedimiento presenta ventajas de ca-  
rácter técnico, a saber una disminución de las inversiones  
y una seguridad absoluta del desarrollo del procedimiento.

30 Según la invención, la producción de antibióti-

1 cos del grupo de las tetraciclinas por vía microbiológica  
se conduce en presencia de una atmósfera sobreoxigenada  
que contiene al menos 21% y hasta aproximadamente 40% de  
oxígeno introducido en el medio de fermentación, manteniend  
5 do el contenido de oxígeno disuelto en el medio en un va-  
lor al menos igual a 0,30 partes por millón (ppm). Este  
contenido está comprendido con preferencia entre 0,30 y 3  
ppm, y en particular entre 0,30 y 1,5 ppm.

10 La introducción de la atmósfera sobreoxigenada  
es una introducción progresiva de cantidades crecientes de  
oxígeno de tal manera que el contenido de oxígeno disuelto  
esté mantenido dentro de los contenidos anteriormente indi-  
cados.

15 Tomando como referencia una fermentación con  
aire exclusivamente, cuya concentración de oxígeno disuelto  
es superior a 0,30 ppm, se ha constatado en los casos de  
cultivo en atmósfera sobreoxigenada, una ganancia de anti-  
biótico al final del cultivo del 5% al 30%.

20 A continuación se dan ejemplos que ilustran la  
invención a título no limitante.

Ejemplo 1.

PRODUCCION DE OXITETRACICLINA

25 En una serie de fermentadores idénticos, de la  
boratorio, de 5 litros de capacidad y que poseen eje y es-  
calones de agitación, se realizan las fermentaciones si-  
guientes.

30 Las condiciones de cultivo son idénticas a las  
de todos los fermentadores, excepto en lo que concierne a  
la agitación y la presión parcial de oxígeno del gas inyec-  
tado.

1 El medio de producción de la oxitetraciclina es el siguiente:

almidón, 35 g;

licor de maceración de maíz, 20 g;

5 sulfato de amonio, 7,5 g;

carbonato de calcio, 7 g;

cloruro de amonio, 1,5 g;

cloruro de cobalto, 5 ml en una solución de concentración 1 g/litro;

10 aceite de cacahuete, 5 g;

agua destilada, cantidad suficiente para 1 litro;

pH = 7, con esterilización durante 20 minutos a 120°C;

temperatura de fermentación, 28°C;

volumen útil de los fermentadores, 3 litros.

15 La cepa productora de oxitetraciclina es Streptomyces varsoviensis.

El medio de cultivo se inocula con 300 ml de un precultivo de 24 horas.

20 Como agente antiespumante se utiliza aceite de manteca de cerdo.

Las condiciones de aireación-agitación se consig-  
nan en la tabla I:

25

30

1

Tabla I

	Aireación	Agitación	Características del	
	<u>RPM</u>	<u>RPM</u>	<u>gas de aireación</u>	
5	Fermentador 1	1 VVM	430	Aire + O <sub>2</sub> puro
	Fermentador 2	1 VVM	430	Aire + O <sub>2</sub> puro
	Fermentador 3	1 VVM	430	Aire + O <sub>2</sub> puro
	Fermentador 4	1 VVM	650	Aire
	Fermentador 5	1 VVM	430	Aire

10

Los términos VVM y RPM designan respectivamente:  
 VVM = volumen de aire por volumen de medio y por minuto, y  
 RPM = revoluciones por minuto.

15

En el fermentador 1, se mantiene el oxígeno disuelto en un valor medio de 0,3 ppm por enriquecimiento del aire con oxígeno puro.

20

Por el mismo medio, se mantiene el oxígeno disuelto en 0,65 ppm en el fermentador nº 2, y en 1,5 ppm en el fermentador nº 3. En los fermentadores 4 y 5, se insufla solamente aire.

25

En el caso del fermentador nº 4, el contenido de oxígeno disuelto en el curso de la fermentación no es inferior a 0,3 ppm.

30

En el caso del fermentador nº 5, se señalan zonas de varias horas durante las cuales la proporción de oxígeno disuelto es nula.

Tomando en consideración la velocidad de producción de la oxitetraciclina y la concentración de antibióticos a las 120 horas de cultivo, los resultados obtenidos fi



1 El medio contiene almidón, licor de maceración  
de maíz, harina de soja, sales minerales, y aceite de man-  
teca de cerdo como antiespumante. Antes de la inoculación  
se esteriliza el medio durante 20 minutos a 120°C. Durante  
5 la fermentación, se mantiene la temperatura constante en  
las proximidades de 28°C. La cepa utilizada es un Strepto-  
myces productor de tetraciclina. Se introduce el aire a  
un caudal de aire de 0,5 VVM, y se regula por enriquecimien-  
to del aire en oxígeno puro el contenido en oxígeno disuel-  
10 to del medio de fermentación, en un valor de 0,6 ppm. Para  
este valor, se constata que la velocidad de producción de  
la tetraciclina es máxima.

15

20

25

30

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un procedimiento de fabricación de antibióticos del grupo de las tetraciclinas por vía microbiológica, caracterizado por el hecho de que la fermentación se conduce en presencia de una atmósfera sobreoxigenada que contiene más de 21% y hasta 40% de oxígeno, introducido progresivamente en el medio de fermentación por cantidades crecientes de oxígeno de manera tal que el contenido en oxígeno disuelto se mantenga en un valor al menos igual a 0,30 ppm.

15

20

2ª.- Un procedimiento de fabricación de antibióticos del grupo de las tetraciclinas, según la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el contenido en oxígeno disuelto en el medio de fermentación está comprendido entre 0,30 y 3 ppm.

25

3ª.- Un procedimiento de fabricación de antibióticos del grupo de las tetraciclinas, según la reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que el contenido en oxígeno disuelto en el medio de fermentación está comprendido entre 0,30 y 1,5 ppm.

30

4ª.- Un procedimiento de fabricación de antibióticos del grupo de las tetraciclinas por vía microbiológica.

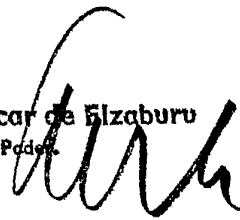
1 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

5 Esta Memoria consta de nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 26 JUN. 1978

P.A.

Oscar de Elizaburu  
Por Poder



10

15

20

25

30