



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

## FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

## CONTACT

Please contact [publications@unido.org](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)



08914-S



Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial

Distr. LIMITADA

ID/WG.300/5  
23 mayo 1979

ESPAÑOL  
Original: INGLÉS

Seminario Regional sobre Aplicaciones Industriales  
de la Microbiología en la Industria Farmacéutica

La Habana (Cuba), 2-9 julio 1979

PROCESO DE FERMENTACION Y PRODUCCION DE GENTAMICINA C,  
COMPLEJO ANTIBIOTICO AMINOGLICOSIDO<sup>ms</sup>

por

J. Gyimesi<sup>ms</sup>

<sup>ms</sup> Las opiniones expresadas en esta monografía son las del autor, y no reflejan necesariamente las de la secretaría de la ONUDI. El presente documento es traducción de un texto no revisado por la secretaría de la ONUDI.

<sup>ms</sup> Instituto de Investigación de Fármacos, Budapest (Hungría).

Los aminoglicósidos constituyen un grupo de antibióticos de principal importancia. Desde hace algún tiempo, se viene utilizando en la terapia humana un número cada vez mayor de estos agentes antimicrobianos (por ejemplo, estreptomina, neomicina, kanamicinas, paromomicina, gentamicinas, tobramicina, sisomicina) y de sus derivados semisintéticos (como la amikacina, la dibekacina, etc.), obtenidos mediante modificación química. Además, este tipo de antibióticos también ha encontrado aplicación en la agricultura. Es preciso descubrir nuevos aminoglicósidos, bien sea mediante examen convencional del suelo, modificación química de aminoglicósidos conocidos o biosíntesis mutacional (hibrimicinas), a fin de evitar problemas de toxicidad inherente y combatir las infecciones causadas por cultivos resistentes a la estreptomina, a la kanamicina, etc.

Un estudio detallado realizado por Price, Godfrey y Kawaguchi muestra las relaciones estructura-actividad de los aminoglicósidos que contienen 2-deoxistreptamina. El estudio de Takashi Nara también ofrece un buen resumen de avances recientemente realizados en esta esfera.

En 1977, el importe de las ventas de aminoglicósidos en el mundo entero ascendió a 350 millones de dólares.

El complejo de gentamicina, producido por diversas especies de *Micromonospora*, fue descrito por vez primera en 1963 por Weinstein, Luedemann, Oden y Wagnan. Los principales componentes de este complejo son las gentamicinas  $C_1$ ,  $C_2$  y  $C_{1a}$ , utilizadas ampliamente en la práctica clínica. El complejo de gentamicina C es bactericida y desarrolla mayor actividad antibacteriana que la estreptomina, la neomicina o las kanamicinas. Es eficaz contra muchas cepas de bacterias gramnegativas, incluidas especies de *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, y algunas *Proteus*, así como contra *Pseudomonas aeruginosa*. Se han comunicado concentraciones inhibitorias mínimas que varían de 0,06 a 8 mcg por ml.

Entre los organismos grampositivos, los de la especie *Staphylococcus aureus* son muy sensibles a la gentamicina a concentraciones inhibitorias mínimas comprendidas, según comunicaciones, entre 0,125 y 1 mcg por ml. Otros cocos grampositivos son menos sensibles, pero los *Bacillus*, *Clostridium* y *Corynebacterium* spp. pueden inhibirse mediante concentraciones normales. El sulfato de gentamicina se utiliza para tratar la septicemia y otras infecciones sistémicas graves ocasionadas por organismos gramnegativos sensibles. Al tratar con gentamicina infecciones de las vías urinarias, deben administrarse álcalis para elevar el pH urinario a un valor superior a 7. La dosis usual de gentamicina administrada por vía intramuscular es de 400 a 800 mcg, cada 8 horas, por kg de peso corporal. La gentamicina se ha administrado por vía intravenosa en las mismas dosis que por vía intramuscular. En

general, el tratamiento debe limitarse a un período de 7 días. La gentamicina no se absorbe bien en el sistema gastrointestinal. El tratamiento con gentamicina debe suspenderse inmediatamente si se observan síntomas de ototoxicidad. Por otra parte, debe administrarse con cuidado y en dosis reducidas a pacientes con disfunciones renales.

El complejo de gentamicina C se viene produciendo en Hungría desde 1974. La cepa productora es la *Micromonospora purpúrea* var. *nigrescens* nova varietas, aislada del suelo en 1970, y marcada como X-148. A esta cepa de *Actinomyces* se le ha asignado el número de acceso MNC 00112 en la Colección Nacional Húngara de Cultivos. A continuación, en el cuadro 1, se estableció una comparación entre la cepa X-148 y las de *M. purpúrea* (NRRL-2953) y *M. purpúrea* var. *violácea* 55-5829 (número de acceso: Coll. Microb. Bulg., DKILS, 55/3 III.1971).

Por sus características considerablemente distintas, la cepa X-148 puede distinguirse con claridad de las siguientes especies o variantes de cepas de *Micromonospora* productoras de gentamicinas o de antibióticos del tipo gentamicina:

- Micromonospora purpúrea* NRRL-2953
- Micromonospora purpúrea* var. *violácea* 55-5829
- Micromonospora echinospora* NRRL-2985
- Micromonospora echinospora* var. *ferrugínea* NRRL-2995
- Micromonospora echinospora* var. *pallida* NRRL-2996
- Micromonospora grisea* NRRL-3800
- Micromonospora rhodorangosa* NRRL-5326
- Micromonospora inyoensis* NRRL-3292

Teniendo en cuenta lo indicado, la nueva cepa X-148 fue designada como *Micromonospora purpúrea* var. *nigrescens* nov. var. A continuación se describe, con arreglo al sistema de Waksman, la cepa X-148 aplicada:

#### Morfología:

Crecimiento muy lento. Las colonias se asemejan a las bacterianas, con superficie ligeramente seca y bordes no dentados, por regla general; sobresalen ligeramente del agar nutriente, pero al mismo tiempo se hunden en él. Por ser el pigmento no dispersor, su color es púrpura negrozco. No se forma micelio aéreo. Vistas al microscopio, las hifas son largas y extensamente ramificadas, y de un diámetro de 0,6-0,7  $\mu$ . Los conidios (esporas), raramente discernibles sobre las hifas son redondeados y lisos, y de un diámetro de 1,0-1,3  $\mu$ . No se forman esporóforos.

#### Propiedades bioquímicas y físicas:

Las características bioquímicas se describen en el siguiente cuadro.

Cuadro 1

Características	M. purpúrea (NRRL-2953)	X-148 (MNG 00112)	M. purpúrea var. violácea 55-5829
<b>Macromorfología</b>	No poseen micelio aéreo; colonias lobuladas; forma espiral; crecimiento abundante; cerosas. Color de la superficie: entre terracota y parduzco. Reverso: entre rojizo y castaño oscuro. No poseen pigmentos solubles.	No poseen micelio aéreo; colonias lobuladas, pero se hunden en el medio de cultivo; cerosas; superficie ligeramente seca; crecimiento muy escaso. Color: púrpura intenso negruzco. No poseen pigmentos solubles.	No poseen micelio aéreo; crecimiento abundante; forma irregular; colonias lisas. Observadas al microscopio, la superficie aparece rugosa; cerosa; los canales radiales forman cordones que con el tiempo se alisan. Colonias: violeta.
<b>Micromorfología</b>	Las hifas son largas y ramificadas, regulares, amorfas y de un diámetro de 0,5µ. Se forman esporas, en el extremo de esporóforos individuales, de forma esférica o elipsoidal y de un diámetro de 1,0 µ.	Las hifas son largas y extensamente ramificadas y de un diámetro de 0,6-0,7 µ. Los conidios son raros, y de forma esférica y lisos. Diámetro: 1,0-1,3 µ; no poseen esporóforos.	En las hifas jóvenes se forman esporas unicelulares de forma ovalada; diámetro: 1,0 µ. En medios líquidos, las hifas son finas y completamente basófilas en posición estrellada.
<b>Gelatina</b>	Licucción débil	Licucción	Licucción
<b>Sacarosa</b>	Invertida	Ligeramente invertida	Invertida
<b>Almidón</b>	Hidrolizado	Hidrolizado	Hidrolizado
<b>Celulosa</b>	Ligeramente descomponente	Ligeramente descomponente	
<b>Agar glucosa-asparagina</b>	Buen crecimiento; color: entre melocotón (durazno) brillante a rojo anaranjado mediano.	Muy poco crecimiento; color: púrpura negruzco.	
<b>Agar tirosina</b>	Buen crecimiento; sin pigmentos solubles.	Crecimiento muy lento únicamente a 37°C; color canela claro; pigmentos solubles.	Color crema; más oscuro en el centro.

Cuadro 2

Utilización de carbohidratos

Carbohidratos	M. purpúrea (NHRL-2953)	X-148 (MNC 00112)	M. purpúrea var. violácea 55-5829
D-glucosa	+	+	+
D-galactosa	+	-	+
Sacarosa	+	+	+
Maltosa	0	+	+
Lactosa	-	-	+
Rafinosa	-	-	+
Sorbosa	0	-	0
Celobiosa	0	+	0
Trehalosa	0	[+]	0
Melibiosa	0	-	0
Melecitosa	0	[+]	0
Glicerol	0	-	-
Sorbitol	-	-	-
Almidón soluble	+	+	+
D-xilosa	+	+	+
L-arabinosa	+	+	-
L-ramnosa	-	+	-
Galactitol	0	-	+
D-manitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Salicina	0	-	0
$\alpha$ -metil-D-glucósido	0	-	0
Fructosa	-	0	-
Manosa	+	0	0
Celulosa	-	+	0
Dextrina	0	0	+

Agar glucosa-asparagina: se forman escasas colonias de superficie seca; son ligeramente lobulares, pero se hunden en el agar; los bordes no son dentados; color púrpura negroazulado.

Agar tirosina: no se producen crecimientos a 26°C; crecimiento muy lento a 37°C; las colonias son de color púrpura intenso; pigmento de color canela claro que se dispersa en el agar.

Agar de harina de maíz: crecimiento lento, análogo al observado en el agar glucosa-asparagina.

Agar-sangre: color de las colonias: malva grisáceo; no se produce hemólisis.

Suero sanguíneo de Löffler: las colonias son de color carne; puede observarse una fuerte proteólisis.

Celulosa: escaso crecimiento.

Tolerancia al NaCl: 3,5% (sobre agar de extracto de glucosa-levadura).

Gelatina: licuación.

#### I. Conservación de la cepa Micromonospora productora de gentamicina

1. Para la conservación de la cepa, se utiliza caldo-agar inclinado con un pH de 7,2, ajustado con un 0,5% de peptona y un 0,5% de NaCl. Los cultivos inclinados se incuban a 37°C durante un día (en el caso de inoculación de un cultivo procedente de un frasco de agitación) y durante 5 días (si la inoculación procede de una sola colonia), almacenándose después a 4° - 10°C. En estas condiciones, se conserva en general la capacidad productora de la cepa.

2. La cepa esporulada varía escasamente en los distintos medios ensayados por nosotros. Sin embargo, su capacidad productora puede conservarse durante un período de un año liofilizando un cultivo de semillas vegetativo.

3. A -15°C, la cepa puede conservarse por lo menos durante tres meses. A tal fin, el medio siguiente es inoculado con cultivo de agar inclinado:

0,3% extracto de bovino  
0,1% peptona  
0,1% sacarosa  
2,4% almidón soluble  
0,4% CaCO<sub>3</sub>

y agua corriente, a un pH de 7,0 antes de la esterilización. El medio se esteriliza a 121°C durante 20 minutos.

En un vaso de Erlenmeyer de 500 ml se agita un volumen de 200 ml durante 2-3 días a 37°C, después de lo cual se agrega un 3% del glicerol y se procede a su congelación en una mezcla de acetona-CO<sub>2</sub>.

## II. Conservación y verificación de la capacidad productora

1. La forma más eficaz de conservar la capacidad productora es la siguiente:

El cultivo vegetativo congelado a muy baja temperatura se pone en una placa de caldo-agar, a un pH de 7,2. Tras incubación durante 4 días, a 37°C, se efectúa la inoculación, mediante colonias individuales, de cultivos de agar inclinados de la misma composición. Al cabo de otros cuatro días de incubación a 37°C, el cultivo se inoculara en vasos de Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con un volumen de trabajo de 100 ml, de la siguiente composición, utilizando tres derivaciones:

3,0% harina de soja  
1,5% almidón  
0,4% CaCO<sub>3</sub>  
2 mcg/ml CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

y agua corriente, a un pH de 7,0-7,5 antes de la esterilización. La esterilización se realiza a 121°C durante 20 minutos.

La incubación se efectúa a 37°C en un agitador rotatorio (320 r.p.m. y una carrera de 37 mm). De los cultivos que date de 3 días se toma muestras estériles y se mantienen a 4-10°C durante 4 días más. Mientras tanto, se verifica la productividad de los cultivos, y del cultivo almacenado que posea la máxima capacidad productora se efectúa una inoculación en el caldo de cultivo inclinado, a un pH de 7,2. Después de la incubación a 37°C durante un día, los cultivos de semillas vuelven a inocularse, a efectos de congelación, del cultivo inclinado, utilizando para ello el método descrito en el apartado I/3.

2. La verificación de la producción se realiza en el medio siguiente:

En vasos de Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, y con un volumen de trabajo de 100 ml compuesto de

3,0% harina de soja  
1,5% almidón de patata  
0,4% CaCO<sub>3</sub>  
2 mcg/ml CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

disueltos en agua corriente, a un pH de 7,0-7,5, efectuándose la esterilización a 121°C durante 20 minutos.

Los medios se inoculan con 1 ml. de suspensión a base de cultivo de agar inclinado o de cultivo vegetativo congelado a muy baja temperatura, y se agitan a 28°C en un agitador rotatorio (320 r.p.m. y carrera de 37 mm).

La producción, la esterilidad, la morfología se verifican primero al cabo de 72 horas, y, por regla general, durante un período adicional de 3 días.

3. Los cultivos de una edad de 72 horas se caracterizan por un micelio denso de hifas delgadas y ligeramente onduladas. Transcurrido un período de 72 a 96 horas, se inicia una ligera esporulación, que aumenta con la edad. No se observa una fragmentación considerable.

4. El pH del cultivo -inicialmente de 7,0- disminuye en 0,5-1 unidad, aumentando después en general a 8,0-8,2 al cabo de 144 horas.

5. Desarrollo medio de la producción:

Inoculados con cultivo de agar inclinado:

72 h	200-300 mcg/ml
96 "	300-400 "
120 "	400-500 "
144 "	500-600 "

Inoculados con cultivo vegetativo congelado a baja temperatura:

72 h	200-250 mcg/ml
96 "	250-350 "
120 "	350-450 "
144 "	450-500 "

6. Composición media del componente del complejo, determinada a base del complejo de gentamicina C, preparado con caldo de fermentación (sustancia en bruto) de una edad de 144 horas:

C <sub>1a</sub>	19%
C <sub>2</sub>	45%
C <sub>1</sub>	36%

### III. Preparación de cultivos de semillas

1. Para la preparación de un cultivo de semillas se emplea inóculo vegetativo congelado a muy baja temperatura y de una edad no superior a los tres meses. La composición del medio es la siguiente:

0,3%	extracto de bovino
0,1%	peptona
0,1%	sacarosa

2,4% almidón soluble  
0,5% extracto de levadura  
0,4%  $\text{CaCO}_3$

y con agua corriente, a un pH de 7,0.

Se prepara un medio de 200 ml en vasos de Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, efectuándose la esterilización a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos.

2. Tres vasos que contengan, respectivamente, 200 ml de medio se inoculan con 1-1 ml de semilla y se agitan durante 48-72 h a  $37^\circ\text{C}$ . Tras una verificación microscópica, se utilizan 500 ml de inóculo para inocular 5 litros de medio de cultivo.

3. Características microscópicas del cultivo de 72 horas de edad: las colonias consisten en micelios de hifas delgadas y ligeramente onduladas, que no forman una red continua; ligera formación de esporas; no se produce fragmentación.

#### IV. Proceso de fermentación

El cultivo así obtenido se emplea para inocular 2.000 litros del medio esterilizado en un depósito de fermentación de  $3\text{ m}^3$  y con la siguiente composición (gramos/litro):

Almidón de patata	10 g
sacarosa	5 "
extracto de levadura	5 ml (ε lución al 10%)
hidrolizado de caseína	20 " ( " " 20%)
peptona	2 g
licor de maíz macerado	1 " (50% de peso en seco)
$\text{CaCO}_3$	4 "
aceite de palma	2 ml
agua corriente	

con un pH de 7,0 antes de la esterilización. El medio inoculado se airea a una velocidad de 1/1 v/v y se agita a razón de 130 r.p.m., a  $35^\circ\text{C}$ , durante 50-60 horas. El cultivo resultante se inocula después en el depósito de fermentación productor, de una capacidad de  $30\text{ m}^3$ , que contiene  $20\text{ m}^3$  de la siguiente composición (gramos/litro):

harina de soja	30 g
almidón de patata	15 "
glicerol	15 ml

CaCO <sub>3</sub>	5 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2 mg
aceite de palma	2 g
agua corriente	

con un pH de 7,0 antes de la esterilización. Esta se realiza al tiempo que se agita la composición, durante una hora, a 121°C. La fermentación tiene lugar en depósitos de acero ácido-resistentes. La velocidad de agitación es de 130 r.p.m., efectuándose el aireado a una velocidad de 1/1 v/v.

La producción del antibiótico se inicia al cabo de 35-40 horas, alcanzándose el valor más elevado transcurridas 100-110 horas.

La actividad antibiótica total del caldo referida a la gentamicina-C normal es de 850 U/ml (1 U es igual a 1 mcg de gentamicina normal; C<sub>1</sub>: 32%, C<sub>2</sub>: 48%, C<sub>1a</sub>: 20%), determinada en organismo de ensayo *Staphylococcus epidermidis* por el método de difusión en placa de agar grande. La cantidad total de antibióticos producidos es de 1000-1050 mcg/ml, de los que un 75% es gentamicina-C. Composición de la fracción de gentamicina-C: C<sub>1</sub> = 36%, C<sub>2</sub> = 45%, C<sub>1a</sub> = 19%.

Las fermentaciones realizadas fueron de carácter discontinuo, y no posemos experiencia alguna respecto de la fermentación semicontinua. La economía del proceso mejora, desde luego, aumentando el volumen de los depósitos de fermentación. Con un volumen de 30 m<sup>3</sup>, la producción ya resultaba económica, pero un volumen de 100 m<sup>3</sup> sería económicamente más ventajoso. En cuanto a la automatización, merece la pena automatizar por lo menos la temperatura, el pH y la adición de agentes antiespumantes.

Como las materias primas (arriba indicadas) que intervienen en el proceso de fermentación son productos agroindustriales, puede disponerse de ellas localmente. En cuanto a las fuentes de suministro de equipo, para la fermentación de gentamicina no se requiere equipo especial, por lo que el equipo necesario podría adquirirse en cualquier parte.

Se prevé que las pérdidas debidas a la contaminación serán de alrededor de un 5%.

#### Aislamiento del complejo de gentamicina en bruto

A un metro cúbico del caldo de fermentación (850 mcg/ml) obtenido por el proceso indicado, se añadió el ácido sulfúrico 5N, a 20°C, necesario para ajustar el pH a 2,0. Se filtró el caldo y se lavó la torta micelial con agua corriente

en volumen de 0,1, dando 920 l de filtrado. A este filtrado se añadieron 2,7 kg de ácido oxálico, ajustándose además el pH a un valor de 7,5 mediante una solución de hidróxido sódico. Después de 10 minutos de calentamiento a 80-90°C, se filtró el caldo y se lavó la torta micelial con 50 l de agua corriente. La solución de 980 l (825 mcg/ml) obtenida se hizo pasar por un sistema de 3 columnas con relleno de resina a la temperatura ambiente, conteniendo cada columna (8 x 60 cm) 3-3 l de resina de intercambio de cationes tipo carboxílico (Wofatit CP-300) en forma Na. La velocidad de paso era de 50 l/h. Durante el proceso de absorción, la primera columna quedó prácticamente saturada, es decir, que se obtuvo un efluente de una actividad de 800 mcg/ml. Alrededor del 15% de la actividad antibiótica total fue absorbido por la segunda columna. El efluente de ésta contenía solamente 5 - 10 mcg/ml al término del proceso de absorción. En casos de tratamiento continuo, esta columna se empleó además para la absorción de caldo activo. La primera columna se lavó con 25 l de agua destilada, tras lo cual se eluyeron antibióticos con ácido sulfúrico 4 N a una velocidad de paso de 0,5 l/h. Las fracciones de efluente que contenían más de 5.000 mcg/ml se mezclaron, obteniéndose 4.500 ml de solución con una actividad de 136.000 mcg/ml. (En proceso discontinuo, se obtuvieron de manera similar, de la segunda y tercera columnas, 3.500 ml de eluato con una actividad de 40.000 mcg/ml y 2.600 ml de eluato con una actividad de 15.000 mcg/ml, respectivamente.)

El pH del eluato ácido de color pardo oscuro obtenido de la primera columna se ajustó a un valor de 4,5 agitándolo con trietilamina, y a continuación se añadió metanol (unos 2.500 ml) a la solución hasta que la turbidez empezó a desaparecer. Se agregó seguidamente a la solución carbón vegetal activado, y se la filtró tras 30 minutos de agitación. Se lavó el carbón con agua destilada, resultando 6.900 ml de solución con una actividad de 83.000 mcg/ml. Esta solución se vertió, con agitación continua, en 35 l de metanol. La gentamicina precipitada en bruto se filtró, se lavó dos veces con metanol y se secó en vacío a 30-40°C. De este modo se obtuvieron 962 gramos de complejo antibiótico en forma de sal de sulfato con 536 mcg/mg; contenido de ceniza: 2,0%; rotación:  $(\alpha)_D^{25} = +104^\circ$  (1,0% en agua).

En proceso discontinuo, los eluatos de ácido sulfúrico obtenidos en forma similar de la segunda y tercera columnas dieron 168 g más de sal de sulfato en bruto, con una actividad de 536 mcg/mg. Cantidad total obtenida: 1.130 g de sulfato de gentamicina en bruto.

Cuadro 3

Separación cromatográfica de gentamicina en bruto

Fracciones	Mezclas de antibióticos	Principal(es) componente(s)	Peso (g)
6 ~ 30	I	Compuesto I-1	24,2
31 ~ 91	II	Gentamicina A, antibiótico G-418, compuesto II-2	49,8
92 ~ 123	III	garamicina, gentamicina A <sub>1</sub>	17,1
124 ~ 175	IV	gentamicina B, B <sub>1</sub>	18,6
176 ~ 198	V	sisomicina	17,3
199 ~ 260	VI	gentamicina C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>1a</sub>	345,5
261 ~ 298	VII	gentamicina C <sub>2</sub>	16,2

Figura 1

Separación cromatográfica de componentes de gentamicina.  
Pesos y valores Rf de los componentes

(TLC, sistema B)

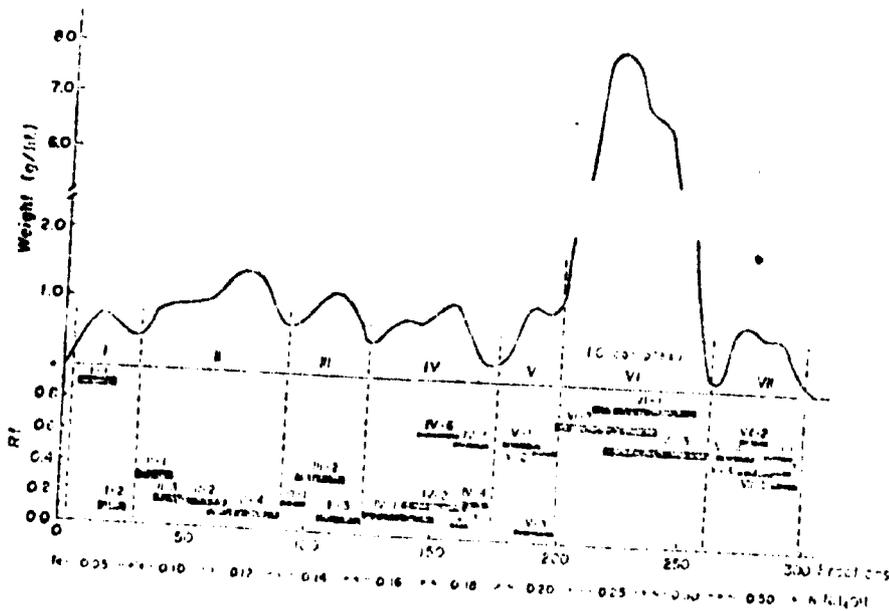
Resina: Amberlite CG-50 I (tamiz de 100~200 mallas)

Columna: 12 x 100 cm

Muestra: 500 g de gentamicina en bruto

Elución: 30~30 litros de hidróxido amónico 0,05, 0,10, 0,12, 0,14, 0,16, 0,18, 0,20, 0,25, 0,30 y 0,50 N

Fracciones: 1.000 ml



Quadro 4

Propiedades físicas y químicas de componentes menores de gentamicina

Structure	Compound number	Identical	Formula	MW	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> (1% water)	PC	TLC	
						Rf (rel. H <sub>2</sub> O) System A	Rf System B	Rf System C
1	I-1	New compound	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	444	+144°	1.60	0.93	0.16
2	I-2	Gentamicin A <sub>1</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>11</sub>	455	+138°	0.25	0.08	0.47
3	II-1	G-418	C <sub>20</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub>	496	+168°	0.73	0.27	0.60
4	II-2	New compound	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub>	482	+140°	0.52	0.15	0.73
5	II-3	Gentamicin X <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub>	482	+158°	0.56	0.16	0.66
6	II-4	Gentamicin A	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub>	468	+146°	0.36	0.08	0.84
7	III-1	New compound	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	482	+156°	0.46	0.18	0.67
8	III-2	Garamite	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	321	-137°	0.91	0.31	0.71
9	III-3	Gentamicin A <sub>1</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	468	-167°	0.37	0.09	0.82
10	IV-1	Gentamicin B	C <sub>20</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub>	482	+155°	0.41	0.15	0.79
11	IV-2	Gentamicin B <sub>1</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub>	496	-163°	1.00	0.23	0.62
12	IV-3	JH-20A	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	481	-	0.59	0.14	0.76
13	IV-4	JH-20B	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	495	+150°	0.94	0.25	0.46
14	V-1	Sisomicin	C <sub>20</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	447	+188°	0.86	0.60	0.24
15	V-2	New compound	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	449	+156°	0.75	0.56	0.19
16	V-3	Gentamicin A	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	452	-165°	0.79	0.06	0.84
17	VII-1	New compound	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	463	+142°	1.13	0.69	0.13
18	VII-2	Gentamicin C <sub>1</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	318	-88°	1.35	0.73	0.19
19	VII-3	New compound	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	449	+148°	0.92	0.55	0.17
20	VII-4	Gentamicin C	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	301	-92°	1.12	0.59	0.27
21	VI-5	New compound	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	435	+144°	0.71	0.48	0.20
22	VII-6	Gentamicin C <sub>1</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	290	-97°	0.82	0.42	0.28



### Aislamiento de componentes

El complejo de gentamicina en bruto (500 g del cual corresponden a 670 g de la sal de sulfato en bruto antes indicada) fue primero cromatografiado en columna de resina Amberlite CG-50 tipo-I, y desarrollado con creciente concentración de amoníaco en disolución acuosa. La fig. 1 representa los resultados de la cromatografía. El complejo antibiótico se separó en siete mezclas, indicadas en el cuadro 3.

El análisis cromatográfico por sistemas A, B y C de las mezclas I-VII, indica la complejidad de las mismas. Existe más o menos superposición de mezclas, cada una de las cuales contiene 4-12 componentes. La detección bioautográfica mostró que todos los componentes, salvo los I-1 y III-2, desarrollan actividad biológica contra B. subtilis.

La aplicación del método de elución de gradiente escalonado permitió una buena resolución de sustancias de diferentes características estructurales pero de análoga polaridad. Mediante la apropiada combinación de diversos procedimientos cromatográficos de intercambio iónico pudieron separarse 35 componentes puros del complejo de gentamicina.

Mezcla I: El compuesto I-1, relativamente apolar, fue separado del compuesto I-2 (gentamicina A<sub>2</sub>) en columna QAE-Sephadex, utilizándose agua como eluente. El compuesto I-1 fue eluido primero y purificado después mediante cromatografía de exclusión de iones repetida en columna de resina Dowex 1- $\times$ 2. La gentamicina A<sub>2</sub> se aisló de las fracciones posteriores mediante cromatografía en columna CM-Sephadex, utilizándose como eluente hidróxido amónico 0,05; 0,07 y 0,10 N, sucesivamente. La gentamicina A<sub>2</sub> en bruto fue purificada por precipitación con éter de solución metanólica.

Mezcla II: Separamos los principales componentes de esta complicada mezcla de la siguiente manera: el primer paso consistió en una repetida cromatografía en columna de resina Amberlite CG-50 tipo-II mediante elución gradiente con hidróxido amónico 0,08-0,12 N. El compuesto II-1 (antibiótico G-418) fue aislado de las primeras fracciones enriquecidas mediante cromatografía de exclusión de iones en columna de resina Dowex 1- $\times$ 2. Las fracciones activas siguientes se mezclaron y se volvieron a separar mediante cromatografía en columna de resina Amberlite XE-69. La elución se realizó utilizando sucesivamente hidróxido amónico 0,08; 0,10 y 0,12 N. Las fracciones finales (0,12 N) de esta cromatografía contenían el compuesto II-4 (gentamicina A) cristalizado a partir de etanol-agua. Las fracciones

que contenían compuestos II-2 y II-3 (gentamicina X<sub>2</sub>) se mezclaron y se cromatografiaron nuevamente en columna de resina Amberlite CG-400 tipo-II, utilizándose como eluyente agua libre de iones. La gentamicina X<sub>2</sub> fue eluida primero, y a continuación el compuesto II-2. La purificación final de componentes se efectuó en columnas de resina Amberlite CG-50 tipo-I mediante elución con hidróxido amónico 0,1 N.

**Mezcla III:** El compuesto III-1 en bruto fue aislado de las primeras fracciones obtenidas por cromatografía repetida de esta mezcla en columna de resina Amberlite CG-40 tipo-II, utilizándose como eluyente hidróxido amónico 0,12-0,14 N, y se purificó mediante cromatografía de exclusión de iones en columnas de resina Dowex 1-X2. Las fracciones mezcladas y evaporadas, libres de compuesto III-1, fueron cromatografiadas de nuevo en columna de CM-Sephadex, y eluidas sucesivamente con hidróxido amónico 0,10; 0,12, y 0,14 N. Las primeras fracciones empacadas del compuesto III-2 (garosamina) se sometieron a cromatografía de exclusión de iones con objeto de obtener garosamina pura. Las fracciones finales, que contenían principalmente compuesto III-3 (gentamicina A<sub>1</sub>) se mezclaron y purificaron por cromatografía repetida en columna de CM-Sephadex.

**Mezcla IV:** Las primeras fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión de iones de esta mezcla, efectuada en columna de resina Dowex 1-X2, contenían componentes apolares (compuestos IV-5 y IV-6) y compuestos IV-3 (antibiótico II-20A) y IV-4 (antibiótico II-20B). Estas fracciones se mezclaron y se volvieron a separar por cromatografía en columna de resina Amberlite CG-50 tipo-II, utilizándose como eluyente hidróxido amónico 0,12; 0,14 y 0,16 N. Las fracciones que contenían antibióticos II-20A y II-20B se mezclaron, separándose la mezcla mediante TLC y utilizando el sistema B como eluyente. Las principales fracciones de la cromatografía de exclusión de iones de la mezcla IV, que contenían IV-1 (gentamicina B) y IV-2 (gentamicina B<sub>1</sub>) fueron cromatografiadas en columna de CM-Sephadex, utilizándose como eluyente hidróxido amónico 0,12 y 0,15 N, y se separaron las gentamicinas B y B<sub>1</sub>.

**Mezcla V:** Esta mezcla fue cromatografiada en columna de SP-Sephadex. La elución sucesiva con hidróxido amónico 0,12; 0,14; 0,16 y 0,18 N dio compuestos V-3 (gentamicina A<sub>3</sub>), V-1 (sisomicina), y V-2, por este orden. Las fracciones que contenían cada componente se mezclaron y se purificaron por cromatografía repetida en columnas de resina Amberlite CG-50 tipo-II, utilizándose como eluyente hidróxido amónico 0,15 N.

**Mezcla VI:** Mediante cromatografía repetida de la mezcla VI (complejo de gentamicina C) en columna de resina Amberlite CG-50 tipo-II aislamos gentamicina C<sub>2</sub> pura de las primeras fracciones. Las fracciones subsiguientes se mezclaron y cromatografiaron en columna de CM-Sephadex, utilizándose como eluyente hidróxido amónico

0,15 y 0,18 N. El eluato 0,15 N contiene gentamicinas  $C_{1a}$  y  $C_2$ , mientras que el eluato 0,18 N contiene prácticamente gentamicina  $C_1$  pura. Después de la mezcla de gentamicina  $C_{1a}$ - $C_2$ , separada por cromatografía en gel de sílice, se eluyó una pequeña cantidad de un nuevo componente (compuesto VI-4). Es muy similar en todos los aspectos (fórmula molecular, PMR y espectro de masa, y actividad biológica) a la gentamicina  $C_2$ , excepción hecha de la rotación óptica ( $[\alpha]_D + 124^\circ$ ). Suponemos que este material puede ser idéntico a la gentamicina  $C_{2a}$ .

Aislamiento de la mezcla VI con fines de producción industrial de sulfato de gentamicina C:

Se mezclaron las fracciones de eluato 199-260 (62 l) y se evaporaron en vacío a  $85^\circ\text{C}$  hasta una concentración del 30% (peso seco). A la temperatura ambiente, se añadió carbón vegetal a esta solución concentrada, agitándose la mezcla durante 30 minutos y filtrándose después. La torta de carbón se lavó con agua. El pH de los filtrados agitados y enfriados se ajustó a un valor de 4,5 con ácido sulfúrico 5 N. La solución volvió a decolorarse con carbón, se agitó durante 30 minutos, se filtró y se lavó bien con agua. Los filtrados así obtenidos se vertieron, al tiempo que se agitaban, en 10 volúmenes de metanol muy puro. Después de permanecer una hora a  $5^\circ\text{C}$ , se filtró el complejo de sulfato de gentamicina C y se lavó con metanol. Seguidamente se secó en vacío a  $50^\circ\text{C}$ , hasta conseguir un peso constante. El rendimiento de sulfato de gentamicina corresponde a unos 468 g de producto anhidro prácticamente puro, con 640 mcg/mg: contenido de cenizas: alrededor de 0,1%; sustancias volátiles: 2,8%; rotación:  $(\alpha)_D^{25} = +112^\circ$  (1,0% en agua); componentes:  $C_1 = 34-36\%$ ,  $C_2 = 45-49\%$ ,  $C_{1a} = 17-19\%$ . El rendimiento total de gentamicina C obtenido del caldo se ha calculado en un 70,5%.

Mezcla VII: Esta mezcla, bastante complicada, y que contiene por lo menos 12 componentes, fue primero cromatografiada en columna de resina Amberlite XE-69 y eluido sucesivamente con hidróxido amónico 0,16; 0,20; 0,30; 0,40 y 0,60 N. Las primeras fracciones contenían compuesto VII-4 (gentamicina  $C_2$ ), que fue purificado mediante esta elución a partir de etanol-agua. Las fracciones siguientes se dividieron en tres partes. Cada mezcla secundaria fue cromatografiada en columnas de CE-Sephadex, y los componentes separados se purificaron mediante cromatografía de exclusión de iones en columnas de QAE-Sephadex o Dowex 1 x 2. De la primera mezcla secundaria (0,20; 0,30 N) se aislaron compuestos VII-5 y VII-6 (gentamicina  $C_{1a}$ ). La cromatografía de la segunda mezcla secundaria (0,40 N) dio como resultado compuestos VII-2 (gentamicina  $C_1$ ) y VII-3, obteniéndose el compuesto VII-1 de la cromatografía de la tercera mezcla secundaria (0,60 N).

16

REFERENCIAS

Publicaciones de carácter general

- E. Price, J. Godfrey, H. Kavaguchi: Adv. Appl. Microbiol. 18, 191/1974/  
Ann. Reports on Fermentation Processes Vol. 1. Editado por D. Perlman,  
Capítulo 12. Aminoglycoside Antibiotics, por Takashi Nara, Academic  
Press/1977/

Monografía

- M. Weinstein, G. Luedemann, E. Oden and G. Wagman: J. Med. Chem.  
6, 463/1963/

Patentes de cepas y de producción

- Ger. Offen 2.145.395/1972/  
USP. 3.091.572/1963/

Metabolismo, fisiología e influencia de la producción

- A.A. Abu-Zeid, Indian J. Technol. 14, 513/1976  
" J. Appl. Chem. Biotechnol. 24, 655/1974/  
" J. Appl. Chem. Biotechnol. 26, 318/1976/  
I.V. Gracseva, Antibiotiki 21, 102/1976/  
T.N. Laznikova, " 22, 102/1977/  
" " 22, 519/1977/  
" " 23, 499/1978/  
T.P. Krasnova, " 23, 12/1978/

Genética

- A.V. Vladimirov, Antibiotiki 21, 1066/1976/

Rotas biosintéticas:

- S.I. Drum, J. Ant. 30, 93/1977/  
E.K. Lee, J. Ant. 26, 72/1973/  
" " 27, 322/1974/  
" " 28, 163/1975/  
B.K. Lee, Antimicrob. Agents and Chemother. 9, 151/1976/  
D. Ross, J. Ant. 30, 54/1977/  
R.P. Testa, J. Ant. 29, 179/1976/  
Yu-Min-Chen, Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 603/1977/

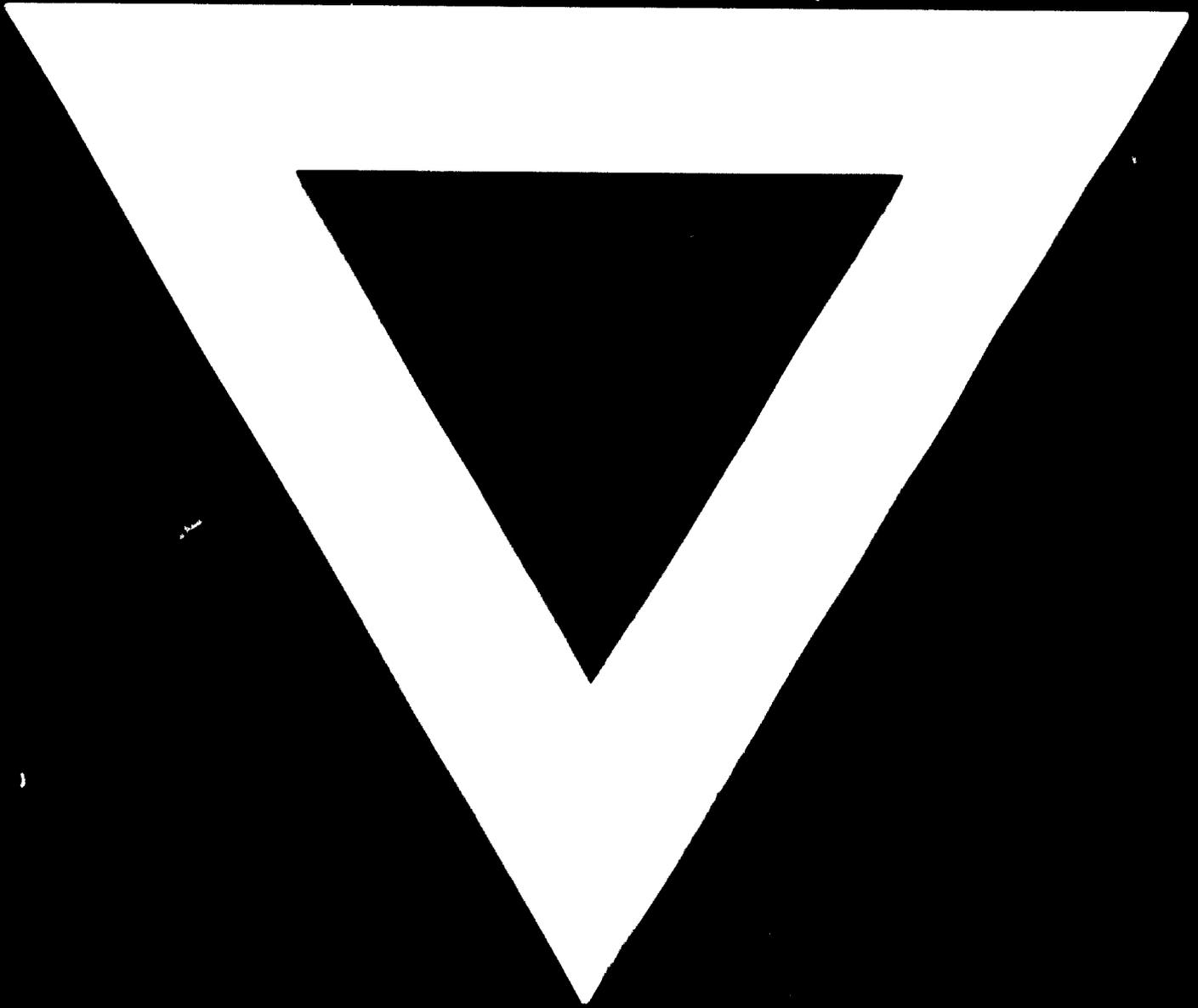
Aislamiento y quimioterapia

- J. BOrdz, J. Ant. 30, 945/1977/



We regret that some of the pages in the microfiche copy of this report may not be up to the proper legibility standards, even though the best possible copy was used for preparing the master fiche.

**1 - 85**



**80.02.05**