



328,927

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD., entidad japonesa, establecida en 4, Ohtemachi- 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japón, por:

" UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR L-LISINA "

=====

El invento se refiere a un procedimiento para producir L-lisina. Más particularmente se refiere a un procedimiento para la producción de L-lisina por hidrólisis bioquímica. Todavía más particularmente, el invento se refiere a un procedimiento para la producción de L-lisina por hidrólisis bioquímica a partir de 5-(4-aminobutil) hidantoina.

Los procedimientos empleados en la técnica anterior para la producción de L-lisina incluyen extracción de la solución de hidrolizados de proteínas naturales, fermenta-

5

10



24 JUL 1950

tación; síntesis, que comprende producir DL-lisina a partir de diversos materiales de partida con determinados compuestos orgánicos y después resolver ópticamente el producto, y similares. En el método de síntesis, por ejemplo, se requieren los procesos de resolución óptica y de racemización. Por esto, son económicamente desventajosos y se han buscado desde hace tiempo mejoras de éstos.

La L-lisina, ácido 2,6-diaminohexanóico, es un amino ácido esencial bien conocido en la técnica. Ha sido utilizada en el campo de enriquecimiento de alimentos, con la que el suplemento de alimentos basados en trigo con lisina mejora su calidad proteínica y da como resultado un crecimiento mejorado y síntesis de tejidos. Este compuesto ha sido utilizado también en medicina como nutriente. Así, sería lo más ventajoso tener disponible un procedimiento para la producción de éste que se pueda llevar a cabo económicamente y ventajosamente a una escala industrial.

Uno de los objetos del presente invento es crear un procedimiento mejorado para la producción de L-lisina que supera las desventajas y deficiencias de los métodos de la técnica anterior.

Otro objeto del presente invento es crear un procedimiento para producir L-lisina que se puede llevar a cabo de una mezcla eficaz y simple.

Otro nuevo objeto del presente invento es crear un procedimiento para producir L-lisina que proporciona el producto con alta pureza y buenos rendimientos.

Otro nuevo objeto más del invento es crear un procedimiento para producir L-lisina que se puede llevar a



cabo ventajosamente a escala industrial con costo relativamente bajo para dar un alto rendimiento de producto.

5 Este y otros objetos y ventajas del presente invento resultarán evidentes para los técnicos en la materia con consideración de la siguiente memoria y reivindicaciones.

10 De acuerdo con el presente invento se ha encontrado que se obtienen grandes cantidades de L-lisina convirtiendo la 5-(4-aminobutil)hidantoina en L-lisina por hidrólisis bioquímica donde la D-, L- o DL-5-(4-aminobutil)hidantoina (o sus derivados) es hecha reaccionar catálicamente en presencia de microorganismos que son capaces de escindir el anillo de hidantoina por hidrólisis o sus enzimas, o sustancias que las contienen, en un medio nutriente acuoso o un disolvente que tiene un pH de aproximadamente 6 a 11. Bajo condiciones óptimas, la L-lisina puede ser producida casi cuantitativamente con un rendimiento de aproximadamente 90 a 95% por este procedimiento cualquiera que sea la forma particular L-, D- o DL de la 5-(4-aminobutil)hidantoina empleada como material de partida.

15 El material de partida en el presente invento, 5-(aminobutil)-hidantoina, es un producto intermedio en el método de síntesis para preparar químicamente L-lisina utilizando furfural como material de partida. Los presentes inventores encontraron que la L-lisina se produce por la hidrólisis con escisión del anillo de hidantoina cuando las enzimas contenidas en las células de los microorganismos particulares reaccionan con 5-(4-aminobutil)-hidantoina bajo condiciones apropiadas. Se ha encontrado ade-



más que se producen altos rendimientos de L-lisina por este procedimiento con cualquiera de las formas L-, D- o DL- de la 5-(4-aminobutil)-hidantoina. El procedimiento del presente invento, tal como se describe aquí, ha sido desconocido hasta ahora en el campo de la microbiología química.

Es conocido en la técnica que en la hidrólisis química convencional se producen L-lisina, D-lisina y DL-lisina a partir de L-5-(4-aminobutil)-hidantoina, D-5-(4-aminobutil)hidantoina, y DL-5-(4-aminobutil)-hidantoina, respectivamente. De acuerdo con esto la resolución óptica de la DL-lisina y de la D-lisina después de la racemización ha sido necesaria con el fin de convertir toda la DL-5-(4-aminobutil)-hidantoina en L-lisina. A diferencia de esto, la hidrólisis bioquímica del presente invento es enteramente diferente de la hidrólisis química de la técnica anterior. En particular, la L-lisina es producida a partir del material de partida, forma L- o D- de 5-(4-aminobutil)-hidantoina en cualquier caso. Por esto, es innecesario que el presente procedimiento convertir D-lisina en L-lisina ya que la isomezación óptica de la D-5-(4-aminobutil)-hidantoina y la hidrólisis de escisión del anillo de hidantoina se verifican dentro del mismo medio de reacción y casi al mismo tiempo. Esto es evidentemente ventajoso para obtener un procedimiento que se pueda utilizar a una escala comercial.

Junto a la 5-(4-aminobutil)-hidantoina, cualquiera de los derivados de ésta que sean solubles en agua, por ejemplo, las sales inorgánicas de ésta, tales como el cloruro, nitrato, etc., las sales orgánicas de ésta ta-



les como el clorhidrato, el sulfato etc. o los ésteres de ésta tales como los ésteres de alcohol inferior (de metilo, de etilo, de propilo y de butilo) y, además que no inhiben la reacción de hidrolisis bioquímica, pueden ser empleados como material de partida en el procedimiento del presente invento.

Los microorganismos que se pueden emplear en el presente invento son aquellos que tienen la capacidad de escindir el anillo de hidantoína por hidrólisis, y la propiedad de convertir 5-(4-aminobutil)-hidantoína en L-lisina en una proporción mayor de 2 moles % cuando se efectúa un ensayo de selección durante 72 horas bajo las condiciones aquí descritas. Dicho ensayo de selección comprende mezclar las células del microorganismo viable (0,1-0,3 g reducidos en forma del material seco) con una solución acuosa de 0,5 % en peso de DL-5-(4-aminobutil)-hidantoína (30 ml) llevar a cabo la reacción de ésta a un pH de 6 a 11 y a una temperatura de 30 a 37°C 72 horas y estimar después cualitativamente la cantidad de L-lisina resultante o de la sal que está producida.

Bacterias, mohos, levaduras, actinomicetos y hongos imperfectos que pasan por el ensayo de selección aquí descritos, pueden ser empleados como el microorganismo en el procedimiento del presente invento. Dichos microorganismos están extensamente distribuidos. Generalmente, las bacterias proporcionan los mejores resultados.

Particularmente ventajosas en el presente invento son las siguientes familias que pertenecen a rendimiento en L-lisina a partir de 5-(4-aminobutil)-hidantoína Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, los



microorganismos que pasan el ensayo de selección antes mencionado pueden ser utilizados también en el presente invento, incluso sino pertenecen a las familias y órdenes aquí descritos.

5 Géneros representativos de bacterias que pertenecen a cada una de las familias anteriormente descritas incluyen los siguientes:

Manual of Determinative Bacteriology (1957). 7ª Edición

10 Pseudomonas, Xanthomonas, Aeromonas, Vibrio, Alcaligenes, Achromobacter, Escherichia, Aerobacter, Micrococcus, Brevibacterium, Corynebacterium, Microbacterium, Cellulomonas, Arthrobacter, Bacillus.

15 Ejemplos de mohos, levaduras, actinomicetos y hongos imperfectos que se pueden emplear como microorganismos en el presente invento incluyen los siguientes:

Illustrated Genera of Imperfect Barnett 2ª Edición
Burgess, (1960):

20 Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Mucor, Rhizopus, Verticillium, Alternaria y Helminthosporium, así como Rodder y otros, The Yeast, A Taxonomic Study, Amsterdam, Holanda del Norte:

25 Saccharomyces, Pichia, Hansenula, Debaryomyces y Lipomyces que pertenece a Endomycetaceae, y Cryptococcus, Torulopsis, Candida, Trichosporon y Rhodotorula que pertenece a Cryptococcaceae y The Actinomicetes, Waksman's Williams & Wilkins (1961): Streptomyces, Norcardia, Thermoactinomyces, Waksmania y Actinoplanes.

30



Las especies de microorganismos abajo enumeradas han resultado ser particularmente ventajosas en el presente invento. Además, se pueden emplear fácilmente cepas mutantes de éstos así como cepas análogas a éstos

5 Las cepas específicas incluyen:

- Aerobacter aerogenes K Y 30 52
- Arthrobacter flavescens K Y 3154
- Arthrobacter paraffineus K Y 4311 (ATCC 19065)
- 10 Arthrobacter roseoparaffineus K Y 4301 (ATCC 15584)
- Bacillus cereus K Y 3315
- Bacillus circulans K Y 3324 (ATCC 7049)
- Bacillus coagulans K Y 3325 (ATCC 9966)
- Bacillus licheniformes K Y 3332
- 15 Bacillus macerans K Y 3340 (NRRL-B-388)
- Bacillus polymyxa K Y 3350 (NRRL-694)
- Bacillus subtilis K Y 3363
- Brevibacterium helvolum K Y 3468
- Brevibacterium keto-glutamicum K Y 4305 (ATCC 15588)
- 20 Brevibacterium linens K Y 3471
- Cellulomonas cellasea K Y 3491 (ATCC 487)
- Cellulomonas flavigena K Y 3492 (ATCC 482)
- Cellulomonas gelida K Y 3494 (ATCC 488)
- Corynebacterium michiganense K Y 3533
- 25 Corynebacterium poinsettiae K Y 3539 (ATCC 9682)
- Micrococcus paraffinolyticus K Y 4306 (ATCC 15582)
- Micrococcus glutamicus (ATCC 13285)
- Pseudomonas fluorescens K Y 3954 (NRRL-B-6)
- Pseudomonas riboflavina K Y 3959
- 30 Vibrio percolans K Y 4171 (ATCC 15922)



Endomyces fibuliger K Y 5124

Este microorganismo ha sido reclasificado actualmente en Coryneform: Amino Acid, volumen 2, 42 (1.960):

5 Kloeckera corticis K Y 5203

Schizosaccharomyces octosporus K Y 5391

Saccharomyces pastorianus K Y 5460

Candida mycoderma K Y 5804

Aspergillus awamori K Y 3

10 Las enzimas necesarias para el procedimiento del presente invento se preparan cultivando los microorganismos de acuerdo con procedimientos convencionales. Dichos procedimientos incluyen llevar a cabo la operación de cultivo en un medio líquido nutritivo o utilizando un cultivo de superficie sólida, dependiendo de las exigencias y conveniencias particulares implicadas.

15 En cuanto a la composición del medio de cultivo, es apropiado cualquier medio de cultivo natural o sintético siempre que contenga los nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos empleados.

20 Dichos nutrientes son bien conocidos en la técnica e incluyen sustancias tales como un manantial de carbono, manantial de nitrógeno, compuestos inorgánicos y similares que son utilizados por la cepa empleada, en cantidades apropiadas. Así, como manantial de carbono se pueden mencionar, a título de ejemplos, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, trehalosa, celobiosa, rafinosa, arabita, mannita, sorbita, inosita, xilosa, arabinosa, hidrolizados de almidón, me-

25 lazas de deshechos y similares. Estas sustancias pueden

30



ser utilizadas solas o mezclas de dos o más. Como manantial de nitrógeno, se pueden utilizar diversas clases de compuestos o sales orgánicos o inorgánicos tales como amoníaco, sulfato de amonio, nitrato de amonio, carbonato de amonio etc., nitratos, urea, u otros compuestos que contienen nitrógeno, tales como peptona, hidrolizado de casena, extracto de carne, extracto de levadura, líquido de maceración de maíz, solubles de destilería, harina de pescado, residuos de soja desgrasado, crisalida, heces de fermentación y similares. Las sustancias que contienen nitrógeno pueden ser utilizadas también solas o en combinaciones de 2 o más. Además, puede ser necesario añadir el medio de cultivo nutrientes esenciales para el crecimiento de la cepa tales como aminoácidos por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico treonina, metionina etc., y/o vitaminas por ejemplo biotina, tiamina, cobalamina, etc. Compuestos inorgánicos que se pueden añadir al medio de cultivo incluyen fosfato de potasio y dihidrógeno, fosfato de potasio y monohidrógeno, sulfato de magnesio, carbonato de calcio, sulfato de manganeso, y similares.

El cultivo se lleva a cabo generalmente a una temperatura de aproximadamente 15 a 50°C y un pH de aproximadamente 4,0 a 9,0. Se emplean para esto condiciones aerobias, y el crecimiento de los microorganismos es algunas veces acelerado conduciendo el cultivo con agitación, por ejemplo por agitación aerobia o con agitación de un cultivo sumergido con la introducción de aire esterilizado en el mismo.

Es ventajoso aumentar apropiadamente la cantidad de



enzimas esenciales presentes añadiendo una pequeña cantidad de 5-(4-aminobutil)-hidantoina al medio de cultivo. Se puede añadir una cantidad parcial o la cantidad total de 5-(4-aminobutil)-hidantoina al medio de cultivo antes de comenzar la operación de cultivo. En dicho caso, el ciclo de cultivo y el ciclo de reacción tienen lugar en paralelo. Las enzimas esenciales para el procedimiento del presente invento pueden ser utilizadas en la forma de sustancias que resultan del cultivo de microorganismos, masas de células vivientes, las sustancias obtenidas por la molienda de masas de células, las sustancias obtenidas por la extracción de masas de células y similares. Sin embargo, generalmente, se obtiene la reacción más óptima utilizando el líquido de cultivo tal como está.

Ejemplo I: 10 ml de un medio de cultivo que contiene en 1% de glucosa, 0,2% de sulfato de amonio, 0,05% de K_2HPO_4 , 0,05% de KH_2PO_4 , 0,025% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3% de extracto de levadura y 0,3% de $CaCO_3$ contenidos en un tubo de ensayo de gran tamaño, son esterilizados y se añade a ellos D- o L-5-(4-aminobutil)-hidantoina para dar una concentración de ésta de 5 mg/ml. Diversos microorganismos, tal como se muestra en la tabla I, son inoculados en el medio de cultivo así preparado. La operación de cultivo se lleva a cabo con agitación aerobia a 30°C durante 96 horas. Los diversos rendimientos en L-lisina obtenidos en el líquido de cultivo están mostrados en la Tabla I.

21 JUL



TABLA I

<u>Microorganismos empleados</u>		<u>Rendimiento en L-Lisina a partir de 5-(4-aminobutil)-hidantoína</u>	
		<u>Forma D-</u>	<u>Forma L-</u>
5	<u>Aerobacter aerogenes</u> KY 3052	51%	51%
	<u>Arthrobacter flavescens</u> KY 3154	49%	49%
	<u>Bacillus cereus</u> KY 3315	49%	53%
	<u>Bacillus subtilis</u> KY 3363	28%	25%
10	<u>Cellulomonas cellasea</u> KY 3491 ATCC 487	53%	49%
	<u>Brevibacterium linens</u> KY 3471	56%	56%
	<u>Corynebacterium poinsettiae</u> KY 3539 ATCC 9682	49%	49%
	<u>Micrococcus paraffinolyticus</u> KY 4306 ATCC 15582	49%	49%
15	<u>Pseudomonas riboflavina</u> KY 3959	51%	51%
	<u>Vibrio percolans</u> KY 4171 ATCC 15922	49%	51%
	<u>Endomyces fibuliger</u> KY 5124	53%	53%
	<u>Candida mycoderma</u> KY 5804	56%	56%
20	<u>Aspergillus awamori</u> KY 3	56%	56%

Ejemplo II: 30 ml de un medio de cultivo que consiste en 0,5% de glucosa 1% de extracto de levadura 1% de peptona y 0,3% de cloruro de sodio son vertidos en un matraz cónico de 250 ml y son esterilizados a 110°C durante 10 minutos. Las masas de células de Pseudomonas fluorescens KY 3.954, (IRRL-B-6), que han sido cultivados en un plano inclinado de caldo de cultivo agar a 30°C durante 24 horas, son inoculados en dicho medio. Se añade además a esto, DL-5-(4-aminobutil)-hidantoína para dar una concentración de 0,1% en peso, La operación de cultivo se

24 JUL 1964

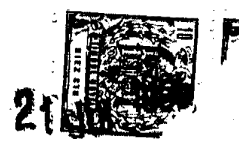


lleva a cabo entonces con agitación aerobia a 30°C durante 24 horas.

Las masas de células son separadas del líquido del cultivo al final de la operación de cultivo con una centrífuga y son lavados una vez con una solución de sal fisiológica, siendo utilizada esta última en una cantidad aproximadamente igual a 1/4 del líquido de cultivo. Se efectúa entonces una separación centrífuga y son recogidas las masas de células. 50 mg de los cuerpos de célula así obtenidos son añadidos a 5 ml de una solución tampón (1/15 M) de ácido fosfórico que contiene 50 mg de DL-5-(4-aminobutil)-hidantoina a un pH de 8. Después de 72 horas de reacción, se encuentra que se han producido en la solución 38,4 mg de L-lisina. Esto representa un rendimiento del 90% de la teoría.

Ejemplo III: Se lleva a cabo el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo II excepto que se emplea un microorganismo Bacillus Polymyxa 3,350 (NRRL-694). Como resultado se producen en la solución de reacción 37,0 mg de L-lisina.

Ejemplo IV: 40 ml de un medio de cultivo que contiene 2,5% de glucosa, 0,5% de cloruro de amonio, 0,05% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2% de L-Z-Amine (una marca registrada para una serie de hidrolizados de caseína) y 0,5% de CaCO_3 son vertidos en un matriz cónico de 250 ml y esterilizados. Después se añaden a esto 0,5% en peso de L-5-(4-aminobutil)-hidantoina. Micrococcus glutamicus n° 702 ATCC 13.286, que ha sido cultivado, por siembra en un plano inclinado de caldo de cultivo agar a 28°C durante 24 horas, es inoculado en dicho medio de culti-



21

vo. La operación de cultivo se lleva a cabo entonces con agitación aerobia a 30°C durante 72 horas.

Al final de la operación de cultivo se encuentra que se han producido en la solución 2,0 mg/ml de L-lisina.

5 Ejemplo V: 40 ml de un medio de cultivo que consiste en 2,5% de glucosa, 0,2% de cloruro de amonio, 0,05% de KH_2PO_4 , 0,05% de KH_2HPO_4 , 0,05% de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,2% de peptona y 0,5% de $CaCO_3$, son vertidos en un matraz cónico de 250 ml. Se añade a esto una cantidad de 0,5% en

10 peso de D-5-(4-aminobutil)-hidantoina. Micrococcus glutamicus nº 901 ATCC 13.287, que ha sido cultivado por siembra en un plano de cultivo. La operación de cultivo se lleva a cabo entonces con agitación aerobia a 30°C durante 72 horas.

15 Al final de la operación de cultivo se encuentra que se han producido en el líquido de cultivo 2,58 mg/ml de L-lisina.

Habiendo descrito así el invento, resultará evidente que el mismo puede ser variado de muchas maneras. Dichas variaciones no han de ser consideradas con una desviación del espíritu y alcance del invento, y todas estas

20 modificaciones están pensadas para ser incluidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en

25 Japón el 14 de Marzo de 1.966, bajo el número 15375/66 se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- N O T A -



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 siguientes:

5 1.- Un procedimiento para producir L-lisina que comprende añadir una sustancia seleccionada entre el grupo que consiste en D-, L- y DL-5-(4-aminobutil)-hidantoína y derivados reactivos de ésta que son solubles en agua, a un medio nutriente acuoso que contiene un microorganismo
10 capaz de escindir un anillo de hidantoína por hidrólisis, una enzima producida por dicho microorganismo o una sustancia que la incluye, y permitir que tenga lugar la reacción bajo condiciones aerobias a un pH de aproximadamente 6,0 a 11,0, con lo que se produce L-lisina, y recuperar la L-lisina así producida.
15

2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en que al menos una parte de dicha sustancia de hidantoína es añadida a dicho medio nutriente acuoso antes de la adición de dicho microorganismo a éste.

20 3.- El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha reacción se lleva a cabo a una temperatura entre 20 y 35°C.

4.- El procedimiento de la reivindicación 1 en que dicho microorganismo tiene la propiedad de convertir
25 5-(4-aminobutil)-hidantoína en L-lisina con un rendimiento mayor de 2 moles % cuando de 0,1 a 0,3 g de las células secas del microorganismo viable son hechos reaccionar con 30 ml de una solución acuosa de 0,5% en peso de DL-5-(4-aminobutil)-hidantoína a un pH entre 6,0 y 11,0 y
30 a una temperatura entre 30 y 37°C durante 72 horas.



5.- El procedimiento de la reivindicación 1, en que dichos derivados reactivos de dicha sustancia de hidantoína incluyen los ésteres de alcohol inferior y las sales de cloruro, nitrato, clorhidrato y sulfato de ésta.

5 6.- Un procedimiento para producir L-lisina que comprende añadir una sustancia seleccionada entre el grupo que consiste en D-, L- y DL-5-(4-aminobutil)-hidantoína y derivados reactivos de ésta, que son solubles en agua, a un medio nutriente acuoso que contiene un microorganismo, capaz de escindir un anillo de hidantoína por hidrólisis, cultivar la solución resultante bajo condiciones aerobias a un pH de aproximadamente 4,0 a 9,0 y a una temperatura de aproximadamente 15 a 50°C, separar y añadir las células de microorganismos resultantes a una solución que tiene un pH entre aproximadamente 6,0 y 11,0 y que contiene una sustancia seleccionada entre el grupo que consiste en D-, L- y DL-5-(4-aminobutil)-hidantoína y derivados reactivos de éstas que son solubles en agua, y permitir después que tenga lugar la reacción, con lo que se produce L-lisina, y recuperar la L-lisina así producida.

15 7.- El procedimiento de la reivindicación 6, en que dicho microorganismo tiene la propiedad de convertir 5-(4-aminobutil)hidantoína en L-lisina con un rendimiento mayor de 2 moles % cuando de 0,1 a 0,3 g de las células secas del microorganismo viable son hechos reaccionar con 30 ml de una solución acuosa de 0,5% en peso de DL-5-(4-aminobutil)-hidantoína a un pH entre 6,0 y 11,0 y a una temperatura entre 30 y 37°C durante 72 horas.

25 8.- El procedimiento de la reivindicación 7 en que dicha reacción se lleva a cabo a una temperatura entre 20°C

21 JUL 1966

y 35°C.

5 9.- El procedimiento de la reivindicación 8 en que dichos derivados reactivos de dicha sustancia de hidantoína incluyen los ésteres de alcohol inferior y las sales de cloruro, nitrato, clorhidrato y sulfato de la misma.

10.- Un procedimiento para producir L-lisina.

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

10 Esta Memoria consta de dieciseis hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 21 JUL 1966

P.A.

Alfredo de Elizaburu
Por Poder