

328928



MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud de
P A T E N T E D E I N V E N C I O N
formulada el 9 de julio de 1.966 con el número 328.928

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

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

" UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR L-LISINA "

Esta invención se refiere a un procedimiento para
producir L-lisina. Más particularmente, se refiere a un pro-
cedimiento para la producción de L-lisina por fermentación.
Aún más particularmente, la invención se refiere a un proce-
5 dimiento para la producción de L-lisina por fermentación con
microorganismos que tienen requerimiento particulares de nu-
trición.

La L-lisina, el ácido 2,6-diaminohexanoico, es un
aminoácido esencial muy conocido en la técnica. Se ha emplea-
10 do en el campo del enriquecimiento de alimentos, en el que -



la suplementación con lisina de los alimentos basados en los cereales mejora su calidad proteínica y da como resultado un mejor desarrollo y síntesis de los tejidos. Este compuesto se ha empleado también en medicina como sustancia nutriente.

5 Así pues, sería muy ventajoso disponer de un procedimiento para su producción que pueda llevarse a cabo económicamente en escala industrial, con materiales de partida baratos.

Uno de los objetos de la presente invención es - proporcionar un procedimiento perfeccionado para la producción de L-lisina, en el que se evitan algunas desventajas y deficiencias de los métodos de la técnica anterior.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir L-lisina por fermentación, que puede llevarse a cabo de una manera simple y eficaz.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento para producir L-lisina por fermentación, que da el producto con elevada pureza y buen rendimiento.

Otro objeto aún de la invención es proporcionar un procedimiento para producir L-lisina por fermentación, que puede llevarse a cabo ventajosamente en escala industrial a bajo coste y a partir de materiales iniciales baratos, para dar un alto rendimiento de producto.

Para los expertos en la técnica se harán evidentes estos y otros objetos y ventajas de la presente invención, por consideración de la siguiente Memoria descriptiva y de las reivindicaciones.

Según la presente invención, se ha comprobado que en el líquido de fermentación se producen cantidades notablemente grandes de L-lisina, si la fermentación o cultivo



se lleva a cabo con cepas de bacterias que pertenecen a los géneros Brevibacterium, Corynebacterium, Arthrobacter y Microbacterium, que tienen requerimientos de nutrición particulares. En particular, se ha comprobado que las cepas que
5 requieren treonina, metionina, arginina, histidina, leucina, isoleucina, fenilalanina, cistina o cisteína para su desarrollo son especialmente ventajosas en el procedimiento de la presente invención. Además, pueden emplearse también en la presente invención cepas apropiadas que tienen requerimientos
10 complejos de nutrición, es decir, cepas que requieren - para su desarrollo más de uno de los aminoácidos enumerados en la Memoria.

Las cepas que tienen los requerimientos de nutrición antes indicados pueden obtenerse por medio de un tratamiento mutacional de cepas madres que no tienen tal requerimiento de nutrición, por medio de una exposición a radiaciones, agentes químicos, o un tratamiento similar. Pueden obtenerse, por ejemplo, cepas mutantes que tienen los requerimientos de nutrición anteriormente mencionados, irradiando
15 Brevibacterium ammoniagenes, Corynebacterium rathayi, Arthrobacter globiformis ó Microbacterium flavum con radiación ultravioleta.
20

Es posible comprender hasta cierto punto que las cepas que requieren treonina, metionina o isoleucina para su crecimiento puedan acumular L-lisina en un medio de fermentación, cuando se tienen en cuenta las mutuas relaciones en
25 la biosíntesis de la lisina, treonina, metionina, isoleucina y leucina con Escherichia coli y otros microorganismos. No obstante, el mecanismo de tal acumulación no se ha puesto
30 en claro. Y tampoco está claro en absoluto, y es muy sor-



prendente e inesperado, el mecanismo por el cual se acumulan grandes cantidades de L-lisina por cepas que requieren arginina, histidina, cistina o cisteína para su desarrollo. Sin embargo, los autores de la presente invención han observado que las cepas que tienen los requerimientos de nutrición anteriormente mencionados acumulan generalmente L-lisina a pesar de las diferencias entre los géneros particulares empleados. Por tanto, se supone que hay una estrecha relación entre requerimientos de nutrición y la capacidad de la cepa particular para acumular L-lisina.

En cuanto a la composición del medio de cultivo, para el desarrollo y fermentación de los microorganismos puede emplearse o bien un medio de cultivo orgánico sintético o bien uno natural, siempre y cuando contenga los elementos nutricios esenciales para el crecimiento del microorganismo particular empleado. Tales elementos nutricios incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sustancias inorgánicas y similares, en cantidades apropiadas.

Como fuente de carbono, pueden emplearse en el medio de cultivo varios hidratos de carbono, tales como glucosa, glicerina, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, manitol, xilosa, galactosa, almidón, disolución de hidrolizado de almidón, melazas y materiales similares. Su concentración varía usualmente entre 2 y 15% en peso (reducido a glucosa) en el medio de cultivo. Pueden emplearse también varios ácidos orgánicos, tales como el ácido aspártico, ácido málico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, ácido pirúvico, ácido oxalacético, ácido glucónico, ácido alfa-ceto-glutárico y similares.

En cuanto a la fuente de nitrógeno, pueden emplear



se varios compuestos y sales orgánicos e inorgánicos, tales como el amoníaco y las sales de amonio, como por ejemplo el cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, carbonato de amonio, fosfato de amonio, acetato de amonio y similares, urea, sustancias orgánicas proteolíticas naturales tales como la peptona, los hidrolizados de caseína, el extracto de carne, extracto de levadura, el líquido de la maceración de maiz, la N-Z-amina (una marca comercial de una serie de hidrolizados de caseína), harina de pescado o sus productos digeridos, residuos de soja desgrasados, o sus productos digeridos o sus hidrolizados y similares, así como las sustancias orgánicas no proteolíticas, tales como el ácido aspártico, ácido glutámico, la treonina, metionina, etc. Es deseable emplear al menos una de las sustancias orgánicas proteolíticas anteriormente mencionadas, juntamente con un compuesto sintético que contiene nitrógeno, tal como la urea, las sales de amonio y similares.

Como sustancias inorgánicas pueden emplearse el fosfato de dihidrógeno y potasio, el fosfato de hidrógeno dipotásico, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, carbonato de calcio, y similares.

Los microorganismos empleados en el procedimiento de la presente invención requieren para su desarrollo las sustancias nutricias mencionadas anteriormente en la Memoria. Por lo tanto, la sustancia nutricia particular requerida ha de añadirse al medio de cultivo en cantidades apropiadas. No obstante, usualmente están contenidas como fuentes de nitrógeno en las sustancias orgánicas proteínicas anteriores. Por consiguiente, tales sustancias son suficientes

28 JUL



generalmente para proporcionar una cantidad apropiada de ta
les sustancias nutrientes. Sin embargo, las sustancias orgá
nicas proteínicas antes mencionadas no siempre se usan nece
sariamente en el medio de cultivo particular empleado, y -
5 puede necesitarse añadir al medio de cultivo el aminoácido
nutriente particular que se requiera, o una sustancia que -
le contiene.

La fermentación se lleva a cabo bajo condiciones
aerobias, por ejemplo por medio de una agitación aerobia del
10 cultivo, o por medio de la agitación de un cultivo sumergido
con introducción de aire en su interior, a una temperatura
de desde aproximadamente 24° hasta 37°C. El ajuste adecuado
del pH del medio de cultivo es extremadamente importante du
rante el cultivo en el procedimiento de fermentación de la
15 presente invención. El pH del medio de cultivo muestra ten
dencia a disminuir por debajo de 7,0 a medida que progresa
la fermentación, y por tanto es necesario ajustar el pH del
medio de cultivo, de modo que se mantenga en un intervalo -
de 5,1 a 8,5 durante el cultivo, con los agentes neutralizan
20 tes adecuados, para obtener una elevada producción de L-lisi
na. Los agentes neutralizantes que pueden emplearse con este
fin incluyen el amoníaco, los álcalis cáusticos tales como
el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio y similares,
el carbonato de amonio, carbonato de calcio, hidróxido de -
25 calcio, etc.

El cultivo se lleva a cabo generalmente durante -
un período de 2 a 5 días, con lo que se acumulan grandes ca n
tidades de L-lisina en el líquido de fermentación. La L-lisi
na se recupera a partir del medio de cultivo separando los
30 cuerpos celulares y empleando un tratamiento con resina cam

biadora de iones, como se explica en el Ejemplo I, después de la terminación del cultivo, o por otros métodos de tratamiento con resina cambiadora de iones que se emplean convencionalmente en la técnica, por tratamiento con ácido pícrico, por tratamiento con ácido bencenosulfónico, y por tratamientos similares.

5

Los siguientes ejemplos se dan simplemente como - ilustrativos de la presente invención, y no han de considerarse como limitativos. A no ser que se indique otra cosa, los tantos por ciento que se dan en los mismos son en peso.

10

Ejemplo I

Como bacteria-germen o bacteria de siembra se emplea Brevibacterium ammoniagenes N° 4948 ATCC 19350 (cepa - que necesita treonina). Esta cepa se inocula en 250 ml. de un medio de siembra que consta de 2% de glucosa, 1% de peptona, 1% de extracto de levadura y 0,2% de cloruro de sodio, y se incuba a 30°C durante 24 horas. La bacteria de siembra así obtenida se inocula en una proporción de 10% en volumen en un matraz cónico de 250 ml. que contiene 30 ml. del medio de fermentación siguiente:

15

20

- 7,5% de glucosa
- 1,5% de sulfato de amonio
- 0,05% de PO_4HK_2
- 0,05% de PO_4H_2K
- 0,025% de $SO_4Mg.7H_2O$
- 0,5% de N-Z-amino
- 30 microgramos/l de biotina
- 2% de CO_3Ca

25



El pH del medio de fermentación es de 7,0.

5 Se lleva a cabo una agitación aeróbica del cultivo durante cuatro días, a 30°C. Como resultado, se comprueba que se han acumulado en el líquido de cultivo 7,2 mg/ml. de L-lisina.

10 Dos litros del filtrado obtenido separando los cuerpos celulares del líquido de fermentación se hacen pasar a través de una resina cambiadora de iones débilmente básica (Amberlite IRC-50), cuyo pH se ha ajustado previamente a un valor de 7,0 con disolución tamponadora 0,5 M. La columna de resina se lava con agua y se eluye con agua amoniacal 0,15 N. Los líquidos de elución que contienen L-lisina se reúnen y se concentran. Después, el pH de la disolución concentrada se ajusta a la zona ácida (un pH de 4,0), y se
15 concentra otra vez. Como consecuencia se obtienen 10,5 g. de cristales crudos de 1-clorhidrato de L-lisina.

Ejemplo II

20 Se lleva a cabo un cultivo de la misma manera y bajo las mismas condiciones que las descritas en el Ejemplo I, salvo que el medio de fermentación contiene 7,5% de fructosa y 0,5% de extracto de carne en lugar de la glucosa y la N-Z-amine del Ejemplo I. Como resultado, se producen en el líquido de cultivo 6,1 mg/ml. de L-lisina.

Ejemplo III

25 Se lleva a cabo un cultivo como se ha explicado en el Ejemplo 1, excepto en que en la fermentación se emplean tubos de ensayo de gran tamaño que contienen, respectivamente, 10 ml del medio de fermentación. Las cantidad de L-lisina



acumuladas en el medio de cultivo, empleando varias cepas - de Brevibacterium ammoniagenes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

| | <u>Cepa empleada</u> | <u>Cantidad de L-lisina acumulada (mg/ml.)</u> |
|----|--|--|
| 5 | <u>Brevibacterium ammoniagenes</u> Nº 4948 ATCC 19350 (cepa que necesita treonina) | 6,5 |
| | <u>Brevibacterium ammoniagenes</u> Nº 5118 ATCC 19351 (cepa que necesita fenilalanina) | 4,2 |
| 10 | <u>Brevibacterium ammoniagenes</u> Nº 5130 ATCC 19352 (cepa que necesita histidina) | 3,1 |
| | <u>Brevibacterium ammoniagenes</u> Nº 5366 ATCC 19353 (cepa que requiere metionina) | 4,3 |
| 15 | <u>Brevibacterium ammoniagenes</u> Nº 5313 ATCC 19354 (cepa que necesita cisteína) | 2,1 |
| | <u>Brevibacterium ammoniagenes</u> Nº 5328 ATCC 19355 (cepa que requiere leucina) | 2,1 |
| | <u>Brevibacterium ammoniagenes</u> Nº 5134 ATCC 19356 (cepa que necesita isoleucina) | 1,5 |
| 20 | <u>Ejemplo IV</u> | |

Se lleva a cabo el mismo procedimiento de cultivo que el explicado en el Ejemplo I, pero, como microorganismos, se emplean las cepas de Corynebacterium rathayi, Arthrobacter globiformis y Microbacterium flavum que requieren treonina, metionina, arginina, histidina, leucina, isoleucina, fenilalanina, cistina o cisteína. En cada uno de los casos se acumulan en el líquido de cultivo cantidades de L-lisina que varían entre 1 y 10 mg/ml.

28 JUL.



Habiéndose descrito así la invención, es evidente que la misma pueda variarse de muchas maneras. Tales variaciones no han de considerarse como diferantes al espíritu y alcance de la invención, y en el alcance de las reivindicaciones siguientes se pretende incluir todas esas modificaciones.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Japón, con fecha 14 de marzo de 1.966, bajo el número 15376/66, 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:

1.- Un procedimiento para producir L-lisina, que comprende cultivar una cepa que requiere treonina, metionina, arginina, histidina, leucina, isoleucina, fenilalanina, cistina o cisteína, de un microorganismo que pertenece a un género seleccionado del grupo que consta de Brevibacterium, Corynebacterium, Arthrobacter y Microbacterium, en un medio acuoso nutriente que contiene una fuente de carbono y nitrógeno, bajo condiciones aerobias, y a un pH de desde aproximadamente 5,1 hasta 8,5.

2.- Un procedimiento según el punto 1, en el que

28 JUL



dicho cultivo se lleva a cabo a una temperatura de desde -
aproximadamente 24° hasta 37°C.

3.- Un procedimiento según el punto 1, en el que
dicha fuente de carbono es un hidrato de carbono.

5 4.- Un procedimiento según el punto 1, en el que
la L-lisina se recupera a partir del líquido de fermentación
por medio de un tratamiento con una resina cambiadora de io
nes.

10 5.- Un procedimiento según el punto 1, en el que
dicho microorganismo es Brevibacterium ammoniagenes.

6.- Un procedimiento según el punto 1, en el que
dicho microorganismo es Corynebacterium rathayi.

7.- Un procedimiento según el punto 1, en el que
dicho microorganismo es Arthrobacter globiformis.

15 8.- Un procedimiento según el punto 1, en el que
dicho microorganismo es Microbacterium flavum.

9.- Un procedimiento para producir L-lisina, que
comprende cultivar una cepa que requiere treonina, metioni
na, arginina, histidina, leucina, isoleucina, fenilalanina,
20 cistina o cisteína, de un microorganismo seleccionado del -
grupo que consta de Brevibacterium ammoniagenes, Corynebac-
terium rathayi, Arthrobacter globiformis y Microbacterium -
flavum, en un medio acuoso nutriente que contiene una fuente
de carbono y una fuente de nitrógeno, bajo condiciones aero
25 bias a un pH de desde aproximadamente 5,1 hasta 8,5 y a una
temperatura de desde aproximadamente 24° hasta 37°C, y recu
perar la L-lisina así producida a partir del líquido de fer
mentación, por medio de un tratamiento con una resina cambia
dora de iones.

30 10.- Un procedimiento para producir L-lisina.

28 JUL



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

Esta Memoria consta de doce hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

5

Madrid,

28 JUL 1966

P. A.

Albergo de Elizaburu
Por Fidei