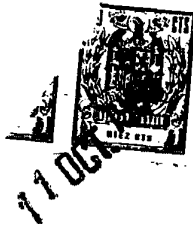


331087

P.- 32.985

Pos-8512 KYOWA



MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

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

formulada el día 10 de Septiembre de 1966, con el nº 331.087

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 fermentación. Todavía más particularmente, el invento se refiere a un procedimiento para la producción de L-lisina por fermentación con microorganismos en la presencia de hidrocarburos.

Los presentes inventores han encontrado anteriormente numerosas nuevas cepas que pertenecen a los generos Brevibacterium, Micrococcus, Arthrobacter y Corynebacterium que tie-



nen la capacidad de producir grandes cantidades de ácido
L-glutámico a partir de hidrocarburos como el principal
manantial de carbono en un proceso de fermentación. Dichos
microorganismos acumulan también ácido alfa-ceto-glutárico
5 en el medio de cultivo.

Se ha encontrado también que se pueden obtener diver-
sas cepas mutantes que tienen exigencias particulares de
nutrición, tratando estas bacterias de cepas matrices por
irradiación ultravioleta, con agentes químicos y simila-
10 res.

La L-lisina, ácido 2,6 diamino hexanoico, es un ami-
noácido bien conocido en la técnica. Ha sido utilizada en
el campo del enriquecimiento de alimentos, en el que la
suplementación de alimentos a base de trigo con lisina
15 mejora su calidad proteínica y da como resultado un creci-
miento y una síntesis de tejidos mejorados. Este compuesto
ha sido también utilizado en medicina como nutriente. Así
sería lo más ventajoso disponer de un procedimiento para
la producción del mismo que se pueda efectuar de manera
20 económica en una escala industrial.

Uno de los objetos del presente invento es crear
un método mejorado para la producción de L-lisina que su-
pera algunas de las desventajas y defectos de los métodos
de la técnica anterior.

25 Otro objeto del presente invento es crear un proce-
dimiento para producir L-lisina por fermentación que se
puede llevar a cabo de una manera eficaz y simple.

Un nuevo objeto del invento es crear un procedimien-
to para producir L-lisina por fermentación que proporciona
30 el producto con alta pureza y buenos rendimientos.



Todavía otro objeto más del presente invento es crear un procedimiento para producir L-lisina por fermentación que se puede llevar a cabo de manera ventajosa a escala industrial con bajo costo, para proporcionar un alto rendimiento en producto.

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

De acuerdo con el presente invento, se ha encontrado que se acumulan cantidades apreciablemente grandes de L-lisina en el líquido de fermentación si la fermentación o cultivo se lleva a cabo con cepas mutantes que requieren homoserina o treonina y metionina para su crecimiento en un medio de cultivo que contiene al menos un hidrocarburo.

Cepas mutantes de microorganismos que requieren homoserina o treonina y metionina para su crecimiento, tales como las de Micrococcus glutamicus y similares, son capaces de producir grandes cantidades de L-lisina a partir de carbohidratos. En el presente invento se ha encontrado que la relación entre la exigencia de nutrición y la acumulación de L-lisina a partir de hidrocarburos en un proceso de fermentación que utiliza las precedentes bacterias asimiladoras de hidrocarburos es casi similar a la indicada anteriormente con respecto a microorganismos que producen L-lisina a partir de carbohidratos.

Particularmente ventajosos en el presente invento son microorganismos que son capaces de producir grandes cantidades de L-lisina. Estos incluyen, por ejemplo, las cepas mutantes de Brevibacterium ketoglutamicum, Arthrobacter



paraffineus y Corynebacterium hydrocarbolastus que requieren homoserina para su crecimiento. Las descripciones taxonómicas de las cepas de origen o matrices a partir de las cuales se obtuvieron estos mutantes estan dadas en la solicitud de patente japonesa nº 470.883. Utilizando dichas cepas, los carbohidratos empleados en los procedimientos de fermentación conveccionales para la producción de L-lisina pueden ser sustituidos por hidrocarburos, que estan facilmente disponibles con bajo costo y en grandes cantidades. Ademas, la L-lisina puede ser separada más facilmente del líquido de fermentación después de completarse la fermentación.

Se puede emplear un medio de cultivo natural o sintetico para el crecimiento y fermentación de los microorganismos a condición de que contenga los nutrientes esenciales para el crecimiento del microorganismo particular empleado. En particular, el medio de cultivo deberá contener al menos un manantial de nitrógeno, una sal inorgánica y una pequeña cantidad de la sustancia requerida para nutrición del microorganismo particular, así como al menos un hidrocarburo como el manantial principal de carbono.

Como manantial de hidrocarburos a emplear en el cultivo de los microorganismos de acuerdo con el presente invento se prefieren a las n-parafinas que tienen de 10 a 30 átomos de carbono. Se puede utilizar una unica n-parafina, o una mezcla de más de una de estas n-parafinas, o una mezcla de una o más de una de estas n-parafinas con otro manantial de carbono, en el que la n-parafina es el constituyente principal. Parafinas normales dentro del margen de número de átomos de carbono antes mencionado incluyen



n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-hexadecano, n-heptadecano y n-octadecano y mezclas de estos.

Los otros detalles del cultivo son convencionales y bien conocidos para los técnicos en la materia. Por ejemplo otros manantiales de carbono que se pueden utilizar en cantidad secundaria incluyen acidos orgánicos por ejemplo acido acético o sus sales, carbohidratos por ejemplo, glucosa, hidrolizado de almidón, melazas etc. u otros manantiales convencionales de carbono. Sales inorgánicas que se pueden emplear incluyen fosfato de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, cloruro de potasio, sulfato ferroso, carbonato de calcio, etc. Manantiales convencionales de nitrógeno que se pueden emplear incluyen manantiales orgánicos de nitrógeno tales como liquido de maceración de maiz extracto de carne, extracto de levadura, peptona, harina de pescado y similares, así como manantiales inorgánicos de nitrógeno tales como sales de amonio, por ejemplo, sulfato de amonio, nitrato de amonio cloruro de amonio, carbonato de amonio y similares, y/o urea.

La n-parafina puede ser añadida al medio de fermentación en la cantidad de aproximadamente 1 % a 30 % en peso.

La fermentación se efectua bajo condiciones aerobias tales como agitación aerobia del cultivo o con agitación de un cultivo sumergido, a una temperatura desde aproximadamente 20^o a 40^o C y a un pH de aproximadamente 4,0 a 9,0.

Después de completarse el proceso de fermentación, la L-lisina es recuperada del liquido de fermentación por métodos convencionales tales como tratamientos con resinas de intercambio de iones, extracción con disolventes, centri-



fugación, cromatografía, o similares.

Los siguientes ejemplos están dados simplemente como ilustración del presente invento, y no han de ser considerados como limitativos. Salvo que se indique lo contrario, los porcentajes aquí indicados están en peso.

Ejemplo I.- La cepa que requiere homoserina (ATCC) de Brevibacterium ketoglutamicum No. 2439 ATCC 15587 es inoculada en 300 ml. de un medio de caldo de levadura contenido en un matraz cónico de 2 l. Este medio de cultivo de siembra contiene 1 % de extracto de levadura, 1 % de extracto de carne, 1 % de peptona y 0,2 % de NaCl. El cultivo del mismo se efectúa entonces con agitación aerobia a 200 rpm., a 30° C durante 24 horas.

El medio de siembra es inoculado en una cantidad de 10 % en volumen en 3 litros de un medio de fermentación contenido en un recipiente fermentador de 5 litros. El medio de fermentación consiste en 10 % (V/V) de una mezcla de volúmenes iguales de n-parafinas que tienen de 12 a 18 átomos de carbono (desde n-dodecano a n-octodecano) así como los siguientes componentes:

0,1 % KH_2PO_4
0,1 % K_2HPO_4
0,1 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,002 % $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0,02 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
100 γ /l de clorhidrato de tiamina
100 γ /ml de L-homoserina
2,0 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El pH del medio de fermentación es 6,5

El cultivo se lleva a cabo entonces bajo condiciones



aerobias a 30°C con aireación a la velocidad de 3 litros por minuto y con agitación a 600 r.p.m. durante 72 horas. Como resultado, se ha encontrado que se han acumulado 10 mg./ml. de L-lisina en el líquido de fermentación.

5 Entonces 2,5 litros del filtrado obtenido separando las masas de células por separación centrífuga, son hechos pasar a través de una resina de intercambio de iones débilmente básica (Amberlite IRC-50), habiendo sido ajustado previamente el pH del filtrado a 7,0 con solución tampon 0,5 M. La columna de resina es lavada con 10 agua y es eluida con amoníaco acuoso 0,15 N. Las fracciones que son positivas para la reacción con ninhidrina son reunidas, y la pequeña cantidad de amoníaco contenido en ellas es separada, por medio de aireación. El pH de la 15 solución así obtenida es ajustado a 2,0 con HCl 6 N y es concentrado hasta sequedad bajo presión reducida.

Como resultado de este tratamiento, se obtienen 20 gramos de cristales crudos de clorhidrato de L-lisina disolviendo la sustancia así obtenida en una pequeña cantidad de agua y añadiendo alcohol a esto. Se obtiene 1 g. de cristales crudos de clorhidrato de L-lisina añadiendo 20 eter a las aguas madres de los cristales.

Ejemplo II.- De acuerdo con las condiciones y operaciones descritas en el ejemplo I, la cepa que requiere 25 homoserina (ATCC) de Brevibacterium ketoglutamicum Nº 2439 ATCC 15587, La cepa que requiere homoserina (ATCC 21003) de Arthrobacter paraffineus Nº 2411 ATCC 15591, la cepa que requiere homoserina (ATCC) de Corynebacterium hydrocarboclastus Nº 2438 ATCC 15592, la cepa que requiere metio- 30 nina y treonina (ATCC 21004) de Brevibacterium ketogluta-



micum Nº 2439 ATCC 15587, la cepa que requiere metionina y treonina (ATCC) de Arthrobacter paraffineus Nº 2411 ATCC 15591 y la cepa que requiere metionina y treonina (ATCC) de Corynebacterium hydrocarboclastus Nº 2438 ATCC 5 15592 son inoculadas en 10 ml. de medios de cultivo de siembra de caldo de levadura contenidos, respectivamente, en tubos de ensayo de gran tamaño. Los cultivos de siembra son cultivados entonces con agitación a 30°C durante 24 horas.

10 Porciones de 10 por cien en volumen de los diversos medios de siembra son inoculados en porciones de 50 ml. del medio de fermentación descrito en el ejemplo I excepto las variaciones abajo indicadas, contenidos en 15 matraces de Sakaguchi de 500 ml. En el caso de los medios que contienen las cepas que requieren homoserina se añaden a los matraces que contienen los medios de fermentación 100 γ /ml. de L-homoserina y en el caso de las cepas que requieren metionina y treonina, 200 γ /ml. de DL-metionina y 100 γ /ml. de L-treonina. El cultivo se efectúa entonces con agitación aerobia de los cultivos a 110 revoluciones por minuto. 20

La cantidad de L-lisina acumulada en los diversos medios de fermentación está mostrada en la table I. La L-lisina es recuperada del líquido de fermentación después de completada la fermentación de acuerdo con la 25 descripción dada en el ejemplo I. La cantidad de cristales de clorhidrato de L-lisina recuperados está mostrada en la cuarta columna de la tabla I.

Ejemplo III.- La fermentación se efectúa de la 30 misma manera descrita en el ejemplo II con la utilización



de la cepa mutante que requiere homoserina y de la cepa que requiere metionina y treonina (ATCC) de Micrococcus paraffinolyticus ATCC 15582. Como resultado, se encuentra que se han acumulado 9,5 mg./ml. de L-lisina en el

5 líquido de fermentación después de 72 horas de cultivo.

Habiendo sido descrito el invento de esta manera, resultará evidente que el mismo puede ser hecho variar de muchas maneras. Dichas variaciones no han de ser consideradas como una desviación o apartamiento del espíritu

10 y alcance del invento y se considera que todas estas modificaciones están incluidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.



Tabla I

	Cepa ma- triz	Cepa em- pleada	Sustancia re- querida para nutrición	Cantidad de L-lisina acu- mulada (mg./ml.)	Cantidad de clorhi- drato de L-lisina recuperada de 500 ml. del medio de cultivo (gramos)
5					
	<u>Brevibac- terium</u>				
	<u>ketoglu- tamium</u>	ATCC ()	homose- rina	7,5	2,5
	No. 2439 ATCC 15587				
10					
	<u>Arthrobac- ter para- ffineus</u>	ATCC (21003)	*	10,0	4,1
	No. 2411 ATCC 15591				
	<u>Corynebac- terium hy- drocarbo- clastus</u>	ATCC ()	*	9,0	3,7
15	No. 2438 ATCC 15592				
	<u>Brevibac- terium ke- toglutami- cum</u>	ATCC (21004)	metionina y treonina	4,0	1,6
	No. 2439 ATCC 15587				
20					
	<u>Arthrobac- ter para- ffineus</u>	ATCC ()	*	3,5	1,5
	No. 2411 ATCC 15591				
	<u>Corynebac- terium hy- drocarbo- clastus</u>	ATCC ()	*	4,0	1,6
25	No. 2438 ATCC 15592				



La presente solicitud que corresponde a la presentada en Japón el 11 de Septiembre de 1.965 con el número 55.376/65 se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

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:

1a.- Un procedimiento para producir L-lisina que comprende cultivar un microorganismo capaz de producir L-lisina bajo condiciones aerobias en un medio nutriente acuoso que contiene al menos un hidrocarburo como el manantial principal de carbono, y recuperar la L-lisina así producida.

2a.- El procedimiento de la reivindicación 1, en que dicho hidrocarburo es una parafina normal que contiene de 10 a 30 átomos de carbono.

3a.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH de dicho medio es mantenido entre aproximadamente 4,0 y 9,0 y el cultivo se efectúa a una temperatura entre aproximadamente 20 y 40° C.

4a.- Un procedimiento para producir L-lisina que comprende cultivar un microorganismo capaz de producir L-lisina, siendo dicho microorganismo una cepa mutante que requiere homoserina o a la vez metionina y treonina para su crecimiento, bajo condiciones aerobias en un medio nutriente acuoso que contiene al menos un hidrocarburo



como el manantial principal de carbono, y recuperar la L-lisina así producida.

5 5^a.- El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho hidrocarburo es una parafina normal que contiene de 10 a 30 átomos de carbono.

6^a.- El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el pH de dicho medio es mantenido entre aproximadamente 4,0 y 9,0 y el cultivo se efectúa a una temperatura entre aproximadamente 20 y 40^a C.

10 7^a.- El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho microorganismo es una cepa mutante de Brevibacterium ketoglutamicum.

15 8^a.- El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho microorganismo es una cepa mutante de Arthrobacter paraffineus.

9^a.- El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho microorganismo es una cepa mutante de Corynebacterium hydrocarboclastus.

10^a.- Un procedimiento para producir L-lisina.

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

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

Madrid, 11 OCT. 1968

P. A.

Alberto de Ezabern
Por Fianza