

364661

P.- 41.006

Pos-16493 Kyowa

2 ABR. 1969

Memoria descriptiva



2 ABR. 1969

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

entidad / de nacionalidad japonesa

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. G.
CLASE C-12
SUBCLASE D

con domicilio en 4, Ohtemachi-1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japon

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR L-LISINA"
(CLASE INTERNACIONAL C12d C07c)

29.3.69

POOR QUALITY



Este 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 producir L-lisina por fermentación utilizando alcohol etílico como sustrato.

La L-lisina es un aminoácido extremadamente útil en calidad de aminoácido esencial. Procedimiento para producir L-lisina por fermentación han sido conocidos en la técnica anterior. Sin embargo, no ha habido enseñanzas ni sugerencias para producir L-lisina a partir de alcohol etílico (etanol) como sustrato. Dicho procedimiento sería máximamente ventajoso ya que el alcohol etílico se produce con bajo costo en la industria del petróleo y es fácil de manipular en un procedimiento de cultivo. Además, el alcohol etílico posee la ventaja de que es soluble en agua, a diferencia de sustancias tales como hidrocarburos que son insolubles en agua, y puede ser utilizado ampliamente por diversos microorganismos. Teniendo en cuenta estos factores, los presentes inventores han investigado un procedimiento para producir L-lisina por fermentación a partir de alcohol etílico en calidad de material de partida, la cual investigación ha conducido al presente invento.

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

Otro objeto del presente invento es crear un procedimiento para producir L-lisina por fermentación que



puede ser llevado a cabo de una manera eficaz y relativamente simple.

5 Un objeto adicional del invento es crear un procedimiento para producir L-lisina por fermentación que puede ser llevado a cabo ventajosamente a una escala industrial con bajo costo, para dar un alto rendimiento de producto.

Todavía un objeto adicional del invento es proporcionar L-lisina.

10 Este y otros objetos y ventajas del presente invento resultarán evidentes para los técnicos en la materia a partir de una consideración de la memoria y reivindicaciones siguientes.

15 Como resultado de examinar la producción de L-lisina por cultivo de diversos microorganismos en medios de cultivo que contienen alcohol etílico como sustrato, se ha encontrado, de acuerdo con el presente invento, que bacterias que pertenecen a los géneros Corynebacterium, Brevibacterium, Arthrobacter, Bacillus y Nocardia son capaces de producir L- lisina a partir de alcohol etílico con excelentes rendimientos. Correspondientemente, los microorganismos empleados en el presente invento son cepas productoras de L-lisina que pertenecen a estos géneros y que tienen la propiedad de asimilar alcohol etílico.

25 Son apropiados para el cultivo de las cepas empleadas en el presente invento un medio de cultivo sintético o un medio nutriente natural, siempre que contengan los nutrientes esenciales para el crecimiento de la cepa empleada. Dichos nutrientes son bien conocidos en la técnica e incluyen sustancias tal como un manantial de -

30



5 carbono, un manantial de nitrógeno, compuestos inorgánicos y similares, que son utilizados por el microorganismo empleado en cantidades apropiadas. Tal como se indica en la descripción anterior, se emplea alcohol etílico en el medio como fuente principal de carbono. Se pueden utilizar también en el medio otras fuentes de carbono e incluyen sustancias tales como, por ejemplo, carbohidratos tales como glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, almidón, hidrolizado de almidón, melazas, mannososa, glicerina, etc., 10 o cualquier otro manantial de carbono apropiado tal como ácidos orgánicos, por ejemplo ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, etc. Estas sustancias pueden ser utilizadas solas o en mezclas de dos o más.

15 Como manantial de nitrógeno, se pueden emplear diversas clases de sales orgánicas o inorgánicas o de compuestos inorgánicos u orgánicos, tales como urea, amoníaco líquido o sales de amonio, tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, acetato de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, etc., o sustancias naturales que contienen nitrógeno, tales como líquido de maceración de maíz, extracto de levadura, extracto de carne, peptona, harina de pescado, caldo, hidrolizados de caseína, ácido casamínico, productos solubles de 20 pescado, extracto de salvado de arroz, torta de soja desengrasada, hidrolizado de crisálida, o diversas sustancias de digestión de éstos. También, estas sustancias pueden ser utilizadas solas o en combinaciones de dos o más de ellas.

25 Compuestos inorgánicos que pueden ser añadidos al medio de cultivo incluyen sulfato de magnesio, fosfato 30



de sodio, dihidrogenofosfato de potasio, monohidrogenofosfato de potasio, sulfato de hierro, cloruro de manganeso, cloruro de calcio, cloruro de sodio, sulfato de zinc, sulfato de manganeso, carbonato de calcio, etc.

5 Si el microorganismo empleado en el procedimiento de fermentación del presente invento requiere un nutriente particular para su crecimiento, éste deberá ser añadido, desde luego, al medio nutriente, cuando no está ya contenido en él, por ejemplo, las sustancias orgánicas nitrogenadas presentes en el medio. También, se puede
10 añadir al medio otros factores de crecimiento, tales como aminoácidos, vitaminas tales como tiamina, cobalamina, etc., o biotina. Por lo tanto, se puede ver que la composición del medio nutriente utilizado en el presente invento es la misma que se utiliza generalmente para la pro-
15 ducción de aminoácidos por fermentación.

El alcohol etílico es añadido al medio de cultivo al comienzo de la operación de cultivo o durante el curso de la operación de cultivo, de una sola vez o de ma-
20 nera intermitente, en una cantidad que no inhibe la producción de L-lisina. Preferiblemente, la cantidad de alcohol etílico añadido al medio oscila entre 10 g/litro y 200 g/litro.

Las condiciones de cultivo utilizadas son las mismas que se emplean usualmente en fermentaciones de
25 aminoácidos. Así, la operación de cultivo se conduce bajo condiciones aerobias, tales como agitación aerobia del cultivo o con ventilación y agitación de un cultivo sumer-
30 gido, a una temperatura de, por ejemplo, aproximadamente 20 a 40°C y a un pH de, por ejemplo, aproximadamente 5,5



5 a 9,5. Los mejores resultados se obtienen manteniendo el pH aproximadamente neutro (7,0) durante la operación de cultivo. La operación de cultivo se conduce bajo estas condiciones hasta que se produce L-lisina en cantidades significativas en el líquido de cultivo resultante, lo cual necesita generalmente aproximadamente 30 a 150 horas.

10 Después de completarse la operación de cultivo, la L-lisina es recuperada a partir del líquido de fermentación por medios convencionales, tales como tratamiento con resina de intercambio de iones, extracción con disolventes, precipitación, adsorción, cromatografía, concentración y similares. Un método especialmente apropiado es el tratamiento con resina de intercambio de iones descrito en el Ejemplo 1 siguiente.

15 Los siguientes ejemplos están dados simplemente como ilustrativos del presente invento, y no han de ser considerados como limitativos. A menos que se indique otra cosa, los porcentajes en esta memoria y por toda la solicitud están en peso por litro de agua. Cepas de microorganismos ilustrativas empleadas ventajosamente en el presente invento están descritas en ellos.

20 Ejemplo 1.-

25 Corynebacterium glutamicum (Micrococcus glutamicus: publicación de patente japonesa 3698/57) ATCC 13.287, un mutante productor de L-lisina, es utilizado como el microorganismo de siembra. Este microorganismo es inoculado en un matraz cónico de 250 ml que contiene 20 ml de un medio de cultivo (pH 7,4) que tiene la siguiente composición:

30



	15 ml/L	alcohol etílico
	2,5 g/L	urea
	0,5 g/L	K_2HPO_4
	0,5 g/L	KH_2PO_4
5	0,25 g/L	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
	0,01 g/L	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$
	0,01 g/L	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$
	50 μ g/L	biotina
	10 g/L	NZ-Amine (marca comercial de un hidrolizado de <u>ca</u> seína y enzima)
10	0,02 g/L	rojo de fenol

La operación de cultivo se lleva a cabo acto seguido con agitación aerobia a 30°C durante 96 horas. Durante esta operación de cultivo, se añade al medio una mezcla de 3 partes de alcohol etílico y 1 parte de solución al 50% (en peso/volumen) de urea, 4 ml cada vez, en 4 veces diferentes, con una indicación de amarillo en la coloración del líquido de cultivo a causa del rojo de fenol. La concentración de L-lisina en el líquido de cultivo resultante después de completarse la operación de cultivo, es, de 8,4 mg/ml.

1,1 litros del filtrado obtenido retirando las células de microorganismo desde el líquido cultivado son hechos pasar a través de una resina de intercambio de aniones débilmente básica (Amberlite IRC-50) preparada previamente a pH 7,0 con solución tampón 0,5 M, y la columna de resina es lavada con agua. Las fracciones que contienen L-lisina son recogidas por elución con agua amoniacal 0,15 N, son concentradas bajo presión reducida, son ajus-



tadas a un pH ácido (4,0), y son concentradas adicionalmente. Como resultado, se obtienen 5,6 g de cristales de monoclórhidrato de L-lisina.

5 Ejemplo 2.- La cepa mutante productora de L-lisina, Brevibacterium ammoniagenes ATCC 19.350, se utiliza como el microorganismo de siembra. La operación de cultivo se conduce bajo las mismas condiciones y de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1, excepto que se añaden 5 mg/litro de tiamina al medio de fermentación del
10 Ejemplo 1. La concentración de L-lisina en el líquido cultivado después de completarse la fermentación es de 3,1 mg/ml.

Ejemplo 3.- El mutante productor de L-lisina, Bacillus megaterium KY 8110 (Bac-11) ATCC 21029, es utilizado como el microorganismo de siembra. Esta cepa es
15 inoculada dentro de un matraz cónico que contiene 20 ml de un medio de cultivo que contiene los siguientes componentes:

	15 ml/L	alcohol etílico
20	20 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,5 g/L	K ₂ HPO ₄
	0,5 g/L	KH ₂ PO ₄
	0,25 g/L	MgSO ₄ ·7H ₂ O
	0,01 g/L	FeSO ₄ ·7H ₂ O
25	0,01 g/L	MnSO ₄ ·4H ₂ O
	20 g/L	CaCO ₃
	15 µg/L	biotina
	10 g/L	NZ-Amine
	100 mg/L	ácido meso-diaminopimelico
30	0,02 g/L	rojo de fenol



La operación de cultivo se lleva a cabo con agitación aerobia a 30°C durante 96 horas. Durante la operación de cultivo, el pH del medio es mantenido sustancialmente neutro añadiendo una mezcla de 3 partes en volumen de alcohol etílico y 1 parte en volumen de agua amoniacal, 0,5 ml cada vez, según se requiere, con una indicación de amarillo en la coloración del rojo de fenol. La concentración de L-lisina en el líquido cultivado después de completarse la fermentación es de 2,3 mg/ml.

Ejemplo 4.- Cepas productoras de L-lisina de diversas bacterias, mostradas en la Tabla 1, son utilizadas como microorganismos de siembra. La operación de cultivo se conduce bajo las mismas condiciones y de la misma manera que se describe en el ejemplo 3, excepto que se utiliza un medio de cultivo preparado eliminando ácido meso-diaminopimélico desde el medio de fermentación del Ejemplo 1. Las cantidades de L-lisina acumuladas en el líquido de cultivo resultante después de completarse la fermentación están mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1

Cepas empleadas	Cantidad de L-lisina producida (mg/ml)
<u>Arthrobacter paraffineus</u> ATCC 21298	2,1
<u>Nocardia sp.</u> ATCC 21337	2,7

Habiendo sido descrito el invento de esta manera, será evidente que el mismo puede ser variado de muchas



2 ABR. 1969

maneras. Dichas variaciones no han de ser consideradas como una desviación desde el espíritu y alcance del invento, y se pretende que estén incluidas aquí todas las modificaciones que serán evidentes para un experto en la materia.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Japón el 15 de Marzo de 1.968, bajo el núm. 16458/68, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- REIVINDICACIONES -

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 un microorganismo productor de L-lisina capaz de asimilar alcohol etílico y que pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en Corynebacterium, Brevibacterium, Arthrobacter, Bacillus y Nocardia bajo condiciones aerobias, en un medio nutritivo acuoso que contiene alcohol etílico como el substrato principal que contiene carbono, y acumular L-lisina en el líquido de cultivo resultante.

29.3.69

2 ABR



2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en que la operación de cultivo se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20°C a 4 0°C y a un pH de aproximadamente 5,5 a 9,5.

5 3.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que el pH es mantenido a aproximadamente 7.

4.- El procedimiento de la reivindicación 1, en que se añaden al medio aproximadamente 10 g/litro a 200 g/litro de alcohol etílico.

10 5.- El procedimiento de la reivindicación 4, en que dicho alcohol etílico es añadido al medio en el comienzo de la operación de cultivo.

15 6.- El procedimiento de la reivindicación 4, en que dicho alcohol etílico es añadido al medio después del comienzo de la operación de cultivo.

20 7.- Un procedimiento para producir L-lisina que comprende cultivar un microorganismo productor de L-lisina capaz de asimilar alcohol etílico y que pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en Corynebacterium, Brevibacterium, Arthrobacter, Pseudomonas, Bacillus, Azotobacter y Nocardia bajo condiciones aerobias a una temperatura de aproximadamente 20 a 40°C y a un pH de aproximadamente 5,5 a 9,5 en un medio nutriente acuoso que contiene alcohol etílico como el principal
25 substrato que contiene carbono, acumular L-lisina en el líquido de cultivo resultante, y recuperar dicha L-lisina de aquél.

30 8.- El procedimiento de la reivindicación 7, en que dicho microorganismo es Corynebacterium glutamicum ATCC 13287.

29.3.69



9.- El procedimiento de la reivindicación 7, en que dicho microorganismo es Brevibacterium ammoniagenes ATCC 19.350.

5 10.- El procedimiento de la reivindicación 7, en que dicho microorganismo es Bacillus megaterium ATCC 21.029.

11.- El procedimiento de la reivindicación 7, en que dicho microorganismo es Arthrobacter paraffineus ATCC 21.298.

10 12.- El procedimiento de la reivindicación 7, en que dicho microorganismo es Nocardia sp ATCC 21.337.

13.- Un procedimiento para producir L-lisina".
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

15 La presente Memoria consta de doce hojas escritas a máquina por una sola cara.

- 2 ABR. 1969

Madrid,

P.A.


Alberto de Elizaburu
Per. 10/10/69

29.3.69

MGE/-