

415211



F.C. 10-XI-75

Int. Cl.: C12D // B23L, K; 107D

No 415.211

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un^a

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

RESIDENCIA: Ohtemachi Building, Ohtemachi Chiyoda-
ku, TOKYO, Japón

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION
DE L-TRIPTOFANO POR FERMENTACION"

Prioridad: Patente japonesa n.º 52176/72 del 27-5-72 y
" " japonesa n.º 114236/72 del 16-11-72

RJ.

- 3 415211



1 1971, Abstract of Lectures, pág. 153). La publicación de pa-
tente francesa nº 2.059.715 antes mencionada también indica
que la producción de L-triptófano por los microorganismos que
son resistentes al 5-metil-DL-triptófano puede ser aumentada
5 induciendo una necesidad de fenilalanina y/o tirosina en el mi-
croorganismo o induciendo resistencia a compuestos análogos
de la fenilalanina o de la tirosina. Sin embargo, aparte de los
ejemplos de trabajo de la patente, que se limitan a los micro-
organismos que presentan resistencia al 5-metil-DL-triptófano
y necesidades de fenilalanina o tirosina para su crecimiento,
10 no se da ninguna descripción de mutantes específicos ni de
procedimientos de obtención de los mutantes que presentan es-
ta resistencia a los compuestos análogos de la fenilalanina o
de la tirosina. Además, los rendimientos de L-triptófano me-
15 diante los mutantes de las publicaciones citadas son alrede-
dor de 500 mg/l cuando la fermentación se realiza en matraces.
Incluso cuando la fermentación se realiza a gran escala bajo
condiciones óptimas, el rendimiento es solamente de alrededor
de 1,9 g/l (Nihon Nogei Kagakukai, Annual Meeting para 1971,
20 Abstract of Lectures, pág. 153). Estos rendimientos son tan
bajos que es prácticamente imposible utilizar estos procesos
en escala industrial. Por consiguiente, es necesario un proce-
dimiento mejorado para la producción industrial de L-triptó-
fano. Con este objeto, estos inventores han descubierto el
25 procedimiento mejorado aquí descrito para la producción de
L-triptófano a una escala industrialmente factible.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención proporciona un procedimiento para la
30 producción de L-triptófano por fermentación de ciertas varie-

415211



1 dades mutantes de Corynebacterium glutamicum. Más específicamente, de acuerdo con esta invención, unas variedades mutantes de Corynebacterium glutamicum, que requieren fenilalanina y tirosina para su crecimiento y que son resistentes por lo
5 menos a un análogo del triptófano y por lo menos a un análogo de fenilalanina o de tirosina, se cultivan en un medio nutritivo para producir cantidades mayores, hasta ahora desconocidas, de L-triptófano extracelular.

10 El Corynebacterium glutamicum es una especie de microorganismos que pertenece al género Corynebacterium caracterizado generalmente por varillas lineales o ligeramente curvadas con segmentos irregularmente manchados, algunas veces gránulos. Frecuentemente, presentan hinchamientos en forma de bastón de golf. La división por saltadura produce disposiciones angulares y en empalizada de células. No presentan motilidad
15 con excepciones en los patógenos de las plantas. Las células Gram-positivas, pero algunas veces las células jóvenes y otras veces las células viejas, pierden la mancha fácilmente. Los gránulos son invariablemente Gram-positivos. Generalmente se producen bastantes especies aerobias pero también microaerofílicas o incluso anaerobias. Catalasa-positivas. Pueden o no licuar la gelatina. Pueden o no producir nitritos a partir de nitratos. Pueden o no fermentar los azúcares pero
20 raras veces, o incluso nunca, producen una gran acidez. Muchas especies oxidan a la glucosa completamente a CO₂ y H₂O sin producir gases visibles. El Corynebacterium glutamicum es un sinónimo del Micrococcus glutamicus descrito en la patente estadounidense nº 3.003.925.

25 Los microorganismos de esta invención son mutantes
30



1 (mutantes resistentes análogos) de variedades productoras de
 L-triptófano de Corynebacterium glutamicum. Las variedades
 presentan necesidades de fenilalanina y tirosina (incluidos
 los llamados mutantes de tipo "leadky") y son capaces de cre-
 5 cer como sus variedades de origen en un medio mínimo [consti-
 tituido por 1 % de glucosa, 0,1 % de $(NH_4)_2PO_4$, 0,02 % de
 KCl, 0,02 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 30 $\mu g/l$ de biotina, 10 mg/l de hi-
 drocloruro de vitamina B₁, 1 ml/l de una solución de sales de
 metales traza (solución acuosa conteniendo 88 mg de
 10 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 37 mg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 72 mg de
 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 970 mg de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 8,8 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y
 20 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ por litro) y 2 % de agar] mezclado con
 fenilalanina y tirosina.

15 Los mutantes también son capaces de crecer en dicho
 medio conteniendo por lo menos un análogo del triptófano,
 como 4-metiltriptófano, 5-metiltriptófano, 6-metiltriptófano,
 7-azatriptófano, 5-fluortriptófano, 6-fluortriptófano, hidro-
 xamato de triptófano, α -metiltriptófano y ácido indolacríli-
 20 co, junto con por lo menos un análogo de fenilalanina o un
 análogo de tirosina como 2-fluorfenilalanina, 3-fluorfenil-
 alanina, 4-fluorfenilalanina, 2-metilfenilalanina, 3-metil-
 fenilalanina, 4-metilfenilalanina, 2-hidroxifenilalanina,
 3-hidroxifenilalanina, 2-aminofenilalanina, 3-aminofenilalanina,
 4-aminofenilalanina, 2-nitrofenilalanina, 4-nitrofenil-
 25 alanina, β -2-tienilalanina, β -3-tienilalanina, 2-indolalanina,
 1-naftalenalanina, 2-naftalenalanina, 2-piridinalanina, 2-tia-
 zolalanina, 3-tiazolalanina, hidroxamato de fenilalanina,
 3-aminotirosina, 3-fluotirosina, 3-hidroxitirosina, 3-nitro-
 30 tirosina, 5-hidroxi-2-piridinalanina, hidroxamato de tirosi-



1 na, etc. Naturalmente, también pueden emplearse en esta inven-
ción mutantes con otras propiedades tales como necesidades nu-
tritivas distintas de las necesidades antes mencionadas,
otras resistencias a los productos químicos, etc.

5 En relación con la resistencia antes mencionada a los
análogos de tirosina o fenilalanina, hay que observar que al-
gunos de estos análogos son algunas veces de estructura simi-
lar. Por ejemplo, la 4-fluorfenilalanina puede ser considera-
10 da como un análogo de la tirosina así como un análogo de la
fenilalanina. Por consiguiente, debe entenderse que la resis-
tencia requerida puede ser a un análogo de la tirosina y de
la fenilalanina.

15 Para obtener microorganismos mutantes de acuerdo con
esta invención, pueden seguirse procedimientos corrientes de
inducción de mutaciones, tales como irradiación con rayos ul-
travioletas, rayos X, rayos γ Co_{60} , etc., o tratamiento con
productos químicos inductores de mutaciones o similares.

20 En esta invención, las variedades de Corynebacterium
glutamicum son preferiblemente mutadas por etapas a través de
varios tratamientos inductores de mutaciones, para obtener
mutantes que presentan necesidades de tirosina y fenilalanina
así como resistencia por lo menos a un análogo del triptófa-
no y por lo menos a un análogo de la fenilalanina o de la ti-
rosina. Naturalmente, son útiles en esta invención las varie-
25 dades que presentan una resistencia combinada a una multipli-
cidad de análogos.

30 Los microorganismos adecuados para esta invención son
seleccionados después de cada tratamiento inductor de muta-
ción mediante un procedimiento de selección simple que será
descrito con más detalle más adelante. Así, pueden obtenerse



1 mutantes con las características deseadas.

5 Los mutantes de las bacterias de Corynebacterium glu-
tamicum con necesidades de tirosina y fenilalanina y resis-
tencia a los análogos obtenidos mediante este método de se-
lección son después cultivados en un medio líquido que con-
tiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, mate-
rias inorgánicas y cantidades traza de otros nutrientes esen-
ciales para los mutantes. Los mutantes que presentan una gran
capacidad de producción de L-triptófano son entonces seleccio-
nados y utilizados para la producción de L-triptófano.

10 En cuanto al medio de fermentación empleado en este
procedimiento de cultivo de las variedades mutantes, puede
emplearse cualquier medio natural o sintético, siempre que
contenga una fuente adecuada de carbono, una fuente de nitró-
geno, materias inorgánicas y cantidades traza de nutrientes
necesarias para el mutante específico.

15 Puede utilizarse en el medio cualquier fuente de carbo-
no y de nitrógeno, siempre que puedan ser utilizadas por el
microorganismo. Como fuente de carbono, por ejemplo, pueden
20 utilizarse hidratos de carbono como glucosa, fructosa, saca-
rosa, maltosa, manosa, etc.; alcohol de azúcar como sorbitol,
manitol; glicerol; almidón; licor de hidrolizado de almidón;
melazas; etc. Además, también pueden emplearse diversos áci-
dos orgánicos como ácido pirúvico, ácido láctico, ácido acé-
tico, ácido fumárico, ácido glucónico, etc., y alcoholes in-
feriores como etanol, etc.

25 Como fuente de nitrógeno, son apropiadas las siguien-
tes sustancias: amoniaco; diversas sales amónicas orgánicas
e inorgánicas como cloruro amónico, sulfato amónico, carbona-
to amónico, acetato amónico, etc.; urea y otros productos
30

415211



1 nitrogenados; y materias orgánicas nitrogenadas como peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, licor de infusión de maíz, hidrolizado de caseína, harina de pescado o su producto digerido, hidrolizado de crisálida, etc.

5 Como materias inorgánicas, pueden emplearse el fosfato monopotásico dihidrógeno, fosfato dipotásico monohidrógeno, sulfato magnésico, cloruro sódico, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, carbonato cálcico, etc.

10 En cuanto a las vitaminas y aminoácidos necesarios para el desarrollo de los mutantes, naturalmente deben encontrarse en el medio. Sin embargo, no es necesario agregarlos independientemente al medio siempre que sean proporcionados al mismo junto con los otros componentes del medio antes descritos. Es decir, ciertos ingredientes naturales pueden
15 proporcionar adecuadamente los factores específicos promotores del crecimiento.

El cultivo se realiza en condiciones aerobias, por ejemplo por sacudidas o por agitación mediante aireación. La temperatura de cultivo adecuada es habitualmente de 20 a 40°C.
20 Es conveniente mantener el pH del medio próximo a la neutralidad durante toda la operación de cultivo con objeto de obtener un gran rendimiento, pero estas condiciones de temperatura y pH no son esenciales para la práctica de esta invención. El cultivo se realiza habitualmente durante 2 a 5 días, con
25 lo que se acumula en el medio una cantidad considerable de L-triptófano.

Una vez completado el cultivo, se separan las células y el L-triptófano se recupera del caldo de cultivo por cualquier método conocido tal como tratamiento con carbón activo,
30 tratamiento con resina cambiadora de ión, etc.



1

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5

De acuerdo con esta invención, ciertas variedades mutantes de Corynebacterium glutamicum se cultivan en un medio nutritivo para acumular L-triptófano en el líquido de cultivo. El L-triptófano es después aislado del líquido de cultivo.

10

Con objeto de obtener las variedades mutantes que son adecuadas para conseguir los fines de esta invención, las bacterias pertenecientes a la especie Corynebacterium glutamicum son artificialmente mutadas en variedades que requieren fenilalanina y tirosina. Estos mutantes son de nuevo mutados por medios artificiales. Los mutantes resultantes son después cultivados sobre un medio de agar mínimo mezclado con por lo menos un análogo del triptófano y por lo menos un análogo de fenilalanina o de tirosina, a una concentración no inferior a la que normalmente inhibiría el crecimiento de la variedad de origen. A partir de las colonias que han crecido en este medio, se aíslan las variedades deseadas. Por ejemplo, la derivación de mutantes de las bacterias que requieren fenilalanina y tirosina, Corynebacterium glutamicum KY 9456 ATCC 21854, está descrita más adelante.

15

20

25

La variedad (KY 9456, ATCC 21854) sufre inhibición del crecimiento por los análogos del triptófano y por los análogos de fenilalanina y de tirosina cuando se cultiva en un medio de agar mínimo en mezcla con fenilalanina y tirosina a las concentraciones indicadas en la Tabla I.

30

415211



1

TABLA I

	<u>Análogos</u>	<u>Concentración mínima para inhibir el crecimiento (µg/ml)</u>
	DL-4-metiltriptófano	500
5	DL-5-metiltriptófano	500
	DL-5-fluortriptófano	500
	DL-6-fluortriptófano	3000
	Hidroxamato de L-triptófano	500
	DL-4-fluorfenilalanina	25
10	DL-3-fluorfenilalanina	50
	DL-2-fluorfenilalanina	50
	DL-β-2-tienilalanina	600
	Hidroxamato de DL-fenilalanina	400
	L-3-aminotirosina	4000
15	Hidroxamato de DL-tirosina	600
	DL-4-aminofenilalanina	3000

Los valores de la Tabla I indican las concentraciones mínimas de inhibición del crecimiento de los análogos antes citados. Estas son determinadas como sigue. Se cultiva durante la noche en un agar inclinado de caldo la variedad Corynebacterium glutamicum KY 9456, ATCC 21854. Las células así obtenidas se suspenden en una solución isotónica de cloruro sódico y una parte de la suspensión resultante, conteniendo de 10^6 a 10^7 células, es extendida uniformemente sobre un medio de placa de agar mínimo suplementado con uno de los análogos antes citados en una placa Petri (85 mm de diámetro) y se cultivan a 30°C durante 3 días. El grado de inhibición es juzgado observando el crecimiento sobre el medio.

A la vista de la determinación de la concentración mínima de inhibición de la variedad original, las variedades

30

415211



1 resistentes a los análogos son seleccionadas dispersando las
células de otra variedad mutada de Corynebacterium glutamicum
KY 9456, ATCC 21854 sobre un medio de agar mínimo suplementa-
do con un análogo de triptófano y un análogo de fenilalanina
5 o un análogo de tirosina, a una concentración superior a la
concentración de inhibición del crecimiento, por ejemplo
500 µg/ml o más de DL-metiltriptófano, 500 µg/ml o más de
DL-5-metiltriptófano, 500 µg/ml o más de DL-5-fluortriptófa-
no, 3 mg/ml o más de DL-6-fluortriptófano, 500 µg/ml o más de
10 hidroxamato de L-triptófano, 25 µg/ml o más de DL-4-fluor-
fenilalanina, 50 µg/ml o más de DL-3-fluorfenilalanina,
50 µg/ml o más de DL-2-fluorfenilalanina, 600 µg/ml o más de
DL-β-2-tienilalanina, 400 µg/ml o más de hidroxamato de
DL-fenilalanina, 4 mg/ml o más de L-3-aminotirosina, 600 µg/
15 ml o más de hidroxamato de DL-tirosina, 3 mg/ml o más de
DL-4-aminofenilalanina, etc. Después de un periodo de incu-
bación adecuado, las células se aislan de las colonias que se
han podido formar en el medio. Después estas células son ade-
cuadamente cultivadas para desarrollar poblaciones microbia-
20 nas para fines industriales.

 Como medio de selección del mutante resistente a los
análogos, habitualmente se emplea un medio de agar sólido con-
teniendo los análogos, una fuente de carbono, una fuente de
25 nitrógeno, sales inorgánicas, tirosina, fenilalanina, biotina,
vitamina B₁ y cantidades traza de otros nutrientes necesarios
para el crecimiento de la bacteria original. Como nutrientes
traza, pueden emplearse sustancias naturales que normalmente
contienen los nutrientes.

 Las variedades mutantes preferidas específicas de
30 Corynebacterium glutamicum obtenidas mediante el proceso de

415211



1 selección antes mencionado han sido depositadas en la American
Type Culture Collection, Rockville, Maryland y están a la dis-
posición del público. Estas variedades han recibido los núme-
ros de accesoión ATCC 21842 a ATCC 21851.

5 Las bacterias mutantes de Corynebacterium glutamicum
de esta invención pueden producir L-triptófano con rendimien-
tos mucho más altos que otras bacterias productoras de L-trip-
tófano de la variedad Corynebacterium glutamicum empleadas en
los procedimientos conocidos. Específicamente, la comparación
10 entre las variedades mutantes de esta invención y la variedad
de la publicación de la patente japonesa nº 14.395/63 (varie-
dad que necesita tirosina y fenilalanina de Corynebacterium
glutamicum) y la variedad de la patente estadounidense
15 nº 3.594.279 (variedad que requiere histidina de Corynebacte-
rium glutamicum) revela, como se demuestra en el siguiente
Ejemplo 1, que las bacterias de esta invención producen
L-triptófano con un rendimiento aproximadamente de 15 a 20 ve-
ces mayor que el de los controles. La publicación de patente
francesa nº 2.059.715 indica que el rendimiento de L-triptófa-
20 no mediante Corynebacterium aceto glutamicum AJ-3293 (con ne-
cesidades de fenilalanina, necesidades de tirosina y resis-
tencia al 5-metiltriptófano) es de 0,186 mg/ml y el rendimien-
to de L-triptófano producido por Micrococcus glutamicus
AJ-3295 (con resistencia al 5-metiltriptófano) es de 0,0235
25 mg/ml. En Nihon Nogeí Kagakukai, Annual Meeting para 1971,
Abstract of Lectures (pág. 153) se indica que el rendimiento
de L-triptófano por Brevibacterium flavum 12-555 (con necesi-
dades de fenilalanina, necesidades de tirosina y resistencia
al 5-metiltriptófano) es de 1,9 g/l cuando la fermentación se
30 realiza a gran escala bajo condiciones óptimas. Por el con-

415211



1 trario, la bacteria de Corynebacterium glutamicum de esta in-
 vención con necesidades de fenilalanina y tirosina y resister
 5 cia por lo menos a un análogo del triptófano y por lo menos a
 un miembro seleccionado entre el grupo formado por análogos
 de tirosina y análogos de fenilalanina, puede producir L-trip-
 tófano con rendimientos inesperadamente más altos que los de
 las bacterias de la técnica anterior. Es decir, esta inven-
 ción puede constituir un procedimiento industrial excelente
 para la producción de L-triptófano.

10 La práctica de ciertas realizaciones específicas de
 esta invención es ilustrada mediante los siguientes ejemplos
 representativos.

EJEMPLO 1

15 En este ejemplo, se utiliza un mutante productor de
 L-triptófano de Corynebacterium glutamicum con necesidades de
 tirosina y fenilalanina y resistencia al 5-metiltriptófano,
 al 6-fluortriptófano y a la 4-fluorfenilalanina, es decir,
 el Corynebacterium glutamicum Trp-1, ATCC 21842. El mutante
 se cultiva en un medio de siembra que contiene 2 % de glucosa,
 20 1 % de peptona, 1 % de extracto de levadura y 0,3 % de NaCl,
 a 30°C durante 24 horas. Se inocula 1 ml del cultivo de siem-
 bra resultante en 10 ml de un medio de fermentación con la
 siguiente composición, en un Erlenmeyer de 250 ml:

25	glucosa	10 %
	KH ₂ PO ₄	0,05 %
	K ₂ HPO ₄	0,05 %
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,025 %
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 %
30	NZ-amina	0,5 %

415211



1 Biotina 30 µg/l
CaCO₃ 2 %
pH 7,2

5 El cultivo se realiza a 30°C durante 4 días con sacudidas, con lo que se produce L-triptófano con un rendimiento de 3,6 mg/ml.

10 Se centrifugan 2 litros del caldo de cultivo resultante de la fermentación para separar las células microbianas y el carbonato cálcico y el líquido que sobrenada resultante se pasa a través de un lecho de una resina cambiadora de catión fuertemente ácida, Diaion SK-104 (forma H⁺) (manufacturada por Mitsubishi Kasei Kogyo K.K., Japón) para adsorber el L-triptófano. Después de lavar con agua, la resina se somete a elución con amoníaco acuoso 0,5 N y después el eluato resultante se concentra para obtener cristales crudos de L-triptófano. Los cristales crudos se disuelven en una pequeña cantidad de etanol acuoso al 50 %, caliente. La solución resultante se decolora con carbón activo y se enfría, recristalizándose 3,5 g de L-triptófano.

20 Cuando la variedad de origen de dicho mutante, es decir Corynebacterium glutamicum KY 9456, ATCC 21854, con necesidades de tirosina y fenilalanina y Corynebacterium glutamicum KY 9104, ATCC 21334, con necesidades de histidina (descrita en la patente estadounidense 3.594.279) se cultivan bajo las mismas condiciones, los rendimientos de L-triptófano son 0,2 mg/ml y 0,5 mg/ml, respectivamente.

EJEMPLO 2

25 En este ejemplo se utilizan mutantes productores de L-triptófano que pertenecen a la variedad Corynebacterium
30

415211



1 glutamicum con las propiedades indicadas en la siguiente Ta-
 bla. Estas variedades son cultivadas respectivamente en el
 medio de siembra descrito en el Ejemplo 1, durante 24 horas.
 Se transfiere 1 ml de cada uno de los cultivos de siembra así
 5 preparados a unos matraces Erlenmeyer de 250 ml que contienen
 10 ml de un medio de fermentación formado por:

melazas de azúcar negro de caña

(como glucosa)	10	%
KH_2PO_4	0,05	%
10 K_2HPO_4	0,05	%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,025	%
$(NH_4)_2SO_4$	2	%
Licor de infusión de maíz	1	%
$CaCO_3$	2	%
13 pH 7,2		

El cultivo se realiza a 30°C durante 4 días con sacudi-
 das. Los resultados se encuentran en la Tabla II.

TABLA II

20	Variedad de <u>C. glutamicum</u>	Propiedad (★)	Cantidad de L-trip- tófano formada (mg/ ml)
	Trp-2 (ATCC 21843)	phe ⁻ , tir ⁻ , 5MT ^r , 6FT ^r , 4AP ^r	3,4
	Trp-3 (ATCC 21844)	phe ⁻ , tir ⁻ , 5MT ^r , 6FT ^r , Tirhx ^r	3,2
25	Trp-4 (ATCC 21845)	phe ⁻ , tir ⁻ , 4MT ^r , 6FT ^r , Phehx ^r	3,3
	Trp-5 (ATCC 21846)	phe ⁻ , tir ⁻ , 4MT ^r , 6FT ^r , 3AT ^r	3,7
30	Trp-6 (ATCC 21847)	phe ⁻ , tir ⁻ , 5MT ^r , 6FT ^r , 4AP ^r , 4FP ^r	7,0

415211



1

TABLA II (continuación)

Variedad de <i>C. glutamicum</i>	Propiedad (★)	Cantidad de L-triptófano formada (mg/ml)
5 Trp-7 (ATCC 21848)	phe ⁻ , tir ⁻ , Trphx ^r , 6FT ^r , 4AP ^r , 3FP ^r	6,2
Trp-8 (ATCC 21849)	phe ⁻ , tir ⁻ , 6FT ^r , 4AP ^r , 2FP ^r	6,0
10 Trp-9 (ATCC 21850) (FERM-P nº 1674)	phe ⁻ , tir ⁻ , 5MT ^r , 6FT ^r , 4AP ^r , 4FP ^r , Tirhx ^r	10,0
Trp-10 (ATCC 21851) (FERM-P nº 1675)	phe ⁻ , tir ⁻ , 4MT ^r , 6FT ^r , 4AP ^r , 4FP ^r , Tirhx ^r , Pehx ^r	11,5

15

- ★
- phe⁻ : requiere fenilalanina
 - tir⁻ : requiere tirosina
 - 5MT^r : resistencia al 5-metiltriptófano
 - 6FT^r : resistencia al 6-fluortriptófano
 - 4MT^r : resistencia al 4-metiltriptófano
 - 20
Trphx^r : resistencia al hidroxamato de triptófano
 - 4AP^r : resistencia a la 4-aminofenilalanina
 - Tirhx^r : resistencia al hidroxamato de tirosina
 - Pehx^r : resistencia al hidroxamato de fenilalanina
 - 3AT^r : resistencia a la 3-aminotirosina
 - 25
4FP^r : resistencia a la 4-fluorfenilalanina
 - 3FP^r : resistencia a la 3-fluorfenilalanina
 - 2FP^r : resistencia a la 2-fluorfenilalanina.

EJEMPLO 3

30

En este ejemplo se cultivan durante 24 horas Corynebacterium glutamicum Trp-10, ATCC 21851, en un medio de cul-

415211



1978

1 tivo de siembra que contiene 7 % de melazas de azúcar negro
 de caña (como glucosa), 0,3 % de licor de infusión de maíz,
 0,1 % de KH_2PO_4 , 0,1 % de K_2HPO_4 , 0,05 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y
 0,9 % del producto descompuesto de la torta de soja (obteni-
 5 do por descomposición de una torta de soja con ácido sulfúri-
 co 6 N y neutralización del producto descompuesto con amonia-
 co acuoso; expresado como torta de soja). Después se inoculan
 300 ml del cultivo de siembra en 3 litros de un medio de fer-
 mentación con la siguiente composición, contenido en un fer-
 10 mentador vibratorio de 5 litros.

Melazas de azúcar negra de caña

(como glucosa)	15	%
----------------	----	---

Licor de infusión de maíz	0,1	%
---------------------------	-----	---

KH_2PO_4	0,1	%
--------------------------	-----	---

15 K_2HPO_4	0,1	%
-----------------------------	-----	---

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05	%
---	------	---

Licor descompuesto de torta de

soja (como torta de soja)	0,9	%
---------------------------	-----	---

pH 7,2.

20 El cultivo se realiza a 30°C a un caudal de aireación
 de 3 l/minuto, agitando a 600 rpm durante 72 horas. Como re-
 sultado se producen 16,8 mg/ml de L-triptófano.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita
 deberá recaer sobre las siguientes:

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de L-triptó-
 fano por fermentación, que consiste en cultivar una variedad
 mutante de Corynebacterium glutamicum que requiere fenilalani-
 na y tirosina para su crecimiento y que es resistente por lo
 menos a un análogo de triptófano y por lo menos a un compues-

Handwritten signature/initials
 30

415211



1 to del grupo formado por análogos de fenilalanina y análogos
de tirosina, en un medio nutritivo acuoso que contiene fuen-
tes de carbono, nitrógeno, nutrientes inorgánicos y los fac-
tores de crecimiento requeridos; acumular L-triptófano en el
5 líquido de cultivo resultante y recuperar dicho L-triptófano.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde
dicha variedad mutante está seleccionada entre el grupo for-
mado por Corynebacterium glutamicum ATCC 21842, ATCC 21843,
ATCC 21844, ATCC 21845, ATCC 21846, ATCC 21847, ATCC 21848,
10 ATCC 21849, ATCC 21850 y ATCC 21851.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde
el cultivo se realiza a una temperatura de unos 20 a 40°C y
a un pH próximo a la neutralidad.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde
15 dicho L-triptófano se recupera mediante un tratamiento con
una resina cambiadora de ión.

5. Se reivindica por último como objeto sobre el que
ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN
PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE L-TRIPTOFANO POR FER-
20 MENTACION".

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la -
presente Memoria descriptiva que consta de dieciocho pagi-
nas mecanografiadas.

Madrid, 25 de Mayo de 1.973
BERNARDO UNGRIA

P. E.

25

30