



417.467

PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España,
sus territorios y plazas de soberanía, a
favor de:

KANEGAFUCHI CHEMICAL INDUSTRIES CO., LTD.

entidad japonesa, domiciliada en No. 3,
Nakanoshima 3-Chome, Kita-Ku, Osaka-Shi,
Osaka, Japón, relativa a:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE L-LI
SINA POR FERMENTACION"

=====

Inventores: Kiyoshi Watanabe, Tutomu Tanaka,
Tamotsu Hirakawa, Mamoru Sasaki,
Koji Obayashi e Hideaki Kinoshita.

Prioridades: Solicitudes de patente en Japón
nos. 77978/1972 y 77979/1972, ambas
de fecha 2 agosto 1972.



MEMORIA DESCRIPTIVA

Antecedentes de la Invención

1. Campo de la Invención

Esta invención se refiere a un procedimiento para producir L-lisina a partir de hidrocarburos por fermentación, utilizando un microorganismo. Más particularmente, esta invención se refiere a un procedimiento para producir L-lisina que comprende cultivar aeróbiamente un microorganismo productor de L-lisina, que tiene una alta resistencia a la L-valina, L-treonina o análogos aminoácidos de L-valina o L-treonina elegidos de los mutantes pertenecientes al género Pseudomonas y al género Achromobacter, en un medio de cultivo que contiene un hidrocarburo como fuente principal de carbono, hasta que se acumula una cantidad substancial de L-lisina en el medio de cultivo, y recuperar la L-lisina así acumulada del caldo de cultivo. - - - - -

2. Descripción de la Técnica Anterior

Es bien conocido que la L-lisina es uno de los aminoácidos esenciales por su importancia y la demanda de producción económica de L-lisina ha aumentado constantemente, particularmente desde el punto de vista del uso en complementos o



aditivos de cereales como alimentos principales para el ser humano. - - - - -

5. Se han propuesto varios procedimientos para producir L-lisina por fermentación y, en la literatura, se han descrito algunos procesos que utilizan hidrocarburos económicos como fuentes de carbono (por ejemplo, patentes británicas 1.184.530, 1.186.989 y 1.241.901, etc.). Sin embargo, estos procesos bien conocidos son desventajosos puesto que el rendimiento de la deseada L-lisina es bajo y por ello no se han establecido aún procesos que sean ventajosos en la producción industrial de L-lisina. - - - - -

10.

Es también conocido que algunos microorganismos pertenecientes al género Pseudomonas (patente francesa 2.041.650) o al género Achromobacter [Agr. Biol. Chem. 27 (11), pp. 773-783 (1963)] producen L-lisina a partir de hidrocarburos. Sin embargo, es muy difícil utilizar estos microorganismos conocidos en la producción industrial de L-lisina dado que la cantidad acumulada de L-lisina es extremadamente baja, por ejemplo del orden de 0,3 a 1,6 g/l. - - - - -

15.

20. Además, es conocido que la L-lisina puede producirse utilizando un microorganismo que sea resistente a la treonina, al ácido alfa-amino-beta-hidroxicinámico, a la norleucina, al ácido alfa-aminobutírico o similares (patente alemana 2.034.406), pero este proceso utiliza uno de los microorganismos que requieren homoserina (género Brevibacterium, género Corynebacterium, género Arthrobacter, género Microbacterium y género Nocardia) e hidratos de carbono como fuentes de carbono.-

25.



Resumen de la Invención

5. Como resultado de extensos estudios sobre el aislamiento de varios microorganismos que tienen una gran capacidad para utilizar hidrocarburos del suelo, seguidos por la selección de los microorganismos aislados, los inventores de la presente hallaron inesperadamente que puede acumularse una cantidad importante de L-lisina en el caldo de cultivo sometiendo las bacterias pertenecientes al género Pseudomonas y al género Achromobacter a un tratamiento mutacional, aislando 10. el mutante así obtenido, es decir la cepa resistente a la L-valina, L-treonina, análogos de L-valina o análogos de L-treonina y cultivando aeróbiamente la cepa aislada en un medio de cultivo que contiene un hidrocarburo como fuente principal de carbono hasta que se acumula una cantidad substancial de L-lisina en el caldo de cultivo. - - - - - 15.

Como se ha descrito anteriormente, es conocido que algunas cepas pertenecientes al género Pseudomonas y al género Achromobacter producen una pequeña cantidad de L-lisina. Contrariamente a la técnica anterior, según la presente invención se aísla una cepa que es capaz de producir L-lisina con 20. un alto rendimiento sobre la base de hallar, por ejemplo, una correlación entre la sensibilidad a la L-valina y la productividad de L-lisina, y la cepa así aislada resulta mucho mejor por lo que se refiere a la productividad de L-lisina. - - - -

25. Esto es, los inventores de la presente hallaron que cuando se cultivan Pseudomonas brevis utilizando etanol como



querir nutriente alguno como factor de crecimiento. - - - - -

Los microorganismos utilizados en la presente invención son aislados, de forma nueva, a partir del suelo, por los inventores de la presente y, por comparación de sus propiedades microbiológicas según los criterios dados en el Birgey's Manual of Determinative Bacteriology, 7ª edición, ninguno de los microorganismos utilizados en la presente invención se corresponde con los microorganismos bien conocidos. Así, los microorganismos utilizados en la presente invención se consideran cepas nuevas y se designan como Pseudomonas brevis Nº 22 (ATCC 21940) y Achromonacter coagulans Nº 42 (ATCC 21934) y se hallan depositados ahora en la American Type Culture Collection bajo los números indicados anteriormente. - - - - -

Las propiedades microbiológicas de los Pseudomonas brevis y de los Achromobacter coagulans son como sigue: - - -

Pseudomonas brevis

Achromobacter coagulans

I. Observación Microscópica

20.	cortas barras que tienen extremos redondos; tamaño: 0,7 - 1,0 x 1,5 - 2,0 μ	cortas barras que tienen extremos redondos; tamaño: 0,8 - 1,0 x 1,5 - 3,0 μ
	sin movimiento	sin movimiento
	sin formación de esporas	sin formación de esporas
25.	mancha resistente a los ácidos: negativa	mancha resistente a los ácidos: negativa
	Mancha Gram: negativa	Mancha Gram: negativa



II. Características de Cultivo

- (1) Crecimiento en placa Nutriente de Agar (33°C, 3 días)
- | | |
|---|--|
| colonia redonda de 1,5
2,0 mm; margen completo | colonia redonda; margen
completo |
| superficie blanca grisá-
cea, brillante y lisa | superficie blanca lechosa,
brillante y lisa |
- (2) Crecimiento en Medio Nutriente Inclinado de Agar
- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| lineal
blanca grisácea | lineal
blanca lechosa |
| superficie brillante
y lisa | superficie brillante y
lisa |
- (3) Crecimiento en Caldo Nutriente
- | | |
|---|--|
| uniformemente turbido;
precipitado formado | a veces membrana delgada
sobre la superficie; a ve-
ces crecimiento granular;
precipitado formado |
|---|--|
- (4) Cultivo en Gelatina Nutriente
- | | |
|---|---------------------------|
| sin licuación
pigmento pardo soluble | licuación |
| crecimiento en super-
ficie | crecimiento en superficie |
- (5) Leche Litmus
- | | |
|-------------|------------------------------------|
| ácida | de débilmente alcalina a
neutra |
| coagulación | coagulación y decoloración |

III. Propiedades Fisiológicas

- (1) Reducción Nitrato (medio sintético)
- | | |
|----------|----------|
| positiva | positiva |
|----------|----------|
- (2) Reacción VP
- | | |
|----------|----------|
| negativa | negativa |
|----------|----------|
- (3) Producción de Indol
- | | |
|----------|----------|
| negativa | negativa |
|----------|----------|



5. (4) Producción de Sulfuro de Hidrógeno
de negativa a débilmente positiva débilmente positiva
- (5) Hidrólisis de Almidón
negativa negativa
- (6) Utilización de Acido Cítrico
positiva positiva
- (7) Ureasa
positiva negativa
10. (8) Catalasa
positiva positiva
- (9) Producción de Acido a partir de Azúcares
producido de xilosa, glucosa, manosa y galactosa en 10 días; producido de lactosa en 30 días; producido sólo ligeramente de arabinosa y fructosa; no producido de maltosa, sucrosa, trehalosa, sorbitol, manitol, inositol, glicerol ni almidón no producido de arabinosa, fructosa, xilosa, glucosa, manosa, lactosa, maltosa, sucrosa, trehalosa, sorbitol, manitol, inositol, glicerol ni galactosa
15. 20.
- (10) Utilización de Fuentes de Carbono
crecimiento en n-parafina C₁₀ - C₂₀ crecimiento en n-parafina C₁₀ - C₂₀
25. crecimiento en ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, etanol y propanol crecimiento en ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico y etanol
- (11) Requerimientos de Nutriente
ninguno ninguno
30. (12) Temperatura Optima de Crecimiento
33°C 33°C



(13) Valores de pH de Crecimiento

5,5 - 9,0

5,5 - 9,0

(14) Aeróbios (oxígeno)

Aeróbios (oxígeno)

IV. Fuente de Aislamiento

5.

suelo

suelo

Según la presente invención, la L-lisina puede producirse ventajosamente por aislamiento de la cepa resistente a los aminoácidos o análogos descrita anteriormente después de tratamiento mutacional de microorganismos del género

10.

Pseudomonas o del género Achromobacter y cultivando la cepa así aislada en un medio de cultivo que contiene un hidrocarburo como fuente de carbono. Pueden utilizarse dos o más aminoácidos o análogos de aminoácido para producir una cepa que sea resistente al compuesto amino utilizado. Además, es también posible efectuar repetidamente los tratamientos mutacionales utilizando dos o más aminoácidos o análogos de los mismos, alternadamente. - - - - -

15.

El tratamiento mutacional puede realizarse por medio de los tratamientos químicos o físicos convencionales empleados comunmente en la producción de mutantes, por ejemplo utilizando los agentes mutagénicos bien conocidos, tales como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, o el tratamiento mutacional físico tal como irradiación con rayos ultravioletas, rayos radioactivos u otros procesos. - - - - -

20.

25.

Un proceso típico para producir una cepa resistente a la L-valina comprende cultivar un mutante obtenido por me-



5. dio de un tratamiento usual de mutación a partir de una cepa del género Pseudomonas o Achromobacter en un medio de cultivo mínimo que contiene L-valina y etanol (preferentemente 0,5 a 1,0% en peso de etanol basado en el peso total del medio) como fuente de carbono durante un período de 3 a 5 días para obtener un cultivo enriquecido con cepa resistente a la L-valina. Una suspensión de células así preparada, que se ha diluido previamente con una solución fisiológica salina a una concentración adecuada de células, se esparce entonces sobre un
10. medio mínimo, una placa de agar, que contiene L-valina o ácido alfa-aminobutírico a una concentración superior a 0,5 mg/l (utilizando de 0,5 a 1,0% de etanol como fuente de carbono) a lo que sigue el cultivo. De las colonias producidas después de un cultivo de 3 a 5 días, se cosechan colonias relativamente grandes. Alternativamente, es también posible sustituir la
15. L-valina utilizada anteriormente por los distintos análogos o la L-treonina descritos anteriormente a una concentración superior a 0,5 mg/ml para el cultivo de enriquecimiento. Es también posible cultivar la cepa tratada mutacionalmente por surgado directo en un medio mínimo, una placa de agar que contiene el aminoácido o los análogos de este aminoácido anteriores. Estas cepas resultaron tener frecuentemente una mayor resistencia a la L-valina. - - - - -
- 20.

25. Es, de manera general, importante aumentar gradualmente la resistencia a la L-valina del mutante por medio de someterlo repetidamente a los tratamientos mutacionales anteriores. En la producción de una cepa resistente es, de manera general, necesario predeterminar las condiciones óptimas de



5. cultivo a fin de impartir al microorganismo la mayor sensibilidad a los aminoácidos o a los análogos de aminoácidos para el tratamiento mutacional. Para este fin, la selección de una fuente de carbono a utilizar en el medio de cultivo y la combinación de varios aminoácidos o análogos de aminoácidos (dos o más agentes) debe investigarse cuidadosamente. A este efecto, la fuente preferible de carbono para la cepa resistente a la L-valina resulta ser el etanol. - - - - -

10. Al realizar la producción de L-lisina según la presente invención, se cultiva aeróbiamente una cepa resistente a la L-valina por medio de la bien conocida técnica de cultivo en un medio de cultivo que contiene un hidrocarburo como fuente principal de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y otros aditivos. - - - - -

15. Los hidrocarburos que pueden utilizarse preferentemente en el medio de cultivo para la producción de lisina según esta invención son n-parafinas que contienen de 10 a 20 átomos y, preferentemente, de 13 a 18 átomos de carbono, o el queroseno. - - - - -

20. Las fuentes de nitrógeno que pueden utilizarse en el medio de cultivo incluyen sales amónicas orgánicas e inorgánicas tales como sulfato amónico, nitrato amónico, cloruro amónico, acetato amónico, citrato amónico, succinato amónico y similares, urea y amoníaco. - - - - -

25. Las sales inorgánicas utilizadas en la presente invención incluyen fosfato potásico, sulfato magnésico, sulfato



- 1

manganésico, sulfato de zinc, sulfato de cobre, sulfato ferroso, carbonato cálcico y similares y se añaden hasta la concentración comunmente empleada. - - - - -

5. Además, pueden utilizarse eficazmente, en el medio de cultivo, agentes de tensioactivos, por ejemplo mono- o trioleato de polioxietilensorbitan (Tween 80 ó 85, fabricado por Atlas Powder Co., U.S.A.), en una cantidad de aproximadamente de 0,02 a 0,5% en peso basado en la cantidad total del medio de cultivo. - - - - -

10. El valor de pH del medio de cultivo se mantiene preferentemente dentro de la gama de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, preferentemente 6,5 a 8,0, durante todo el período de cultivo. El cultivo se realiza usualmente a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 40°C, y preferentemente, de 30 a 35°C. - - - - -

15. Es necesario realizar el cultivo bajo condiciones aerobias, por ejemplo por agitación con aireación y/o por cultivo con sacudidas. - - - - -

20. Al completarse el cultivo, las células microbianas resultantes se eliminan del caldo de cultivo por medio de procesos bien conocidos tales como filtración o centrifugación. La eliminación de las células microbianas puede realizarse fácilmente por calentamiento del caldo de cultivo, por ejemplo a una temperatura de 70 a 95°C durante un período de 10 a 30 minutos, y por eliminación de las células microbianas, aunque el calentamiento no es esencial. La L-lisina deseada puede obtenerse. - - - - -

25. La L-lisina deseada puede obtenerse.



se del filtrado o del sobrenadante en forma de hidrocioruro de L-lisina según procesos bien conocidos, utilizando una resina de intercambio iónico tal como Amberlite IRC-50, Amberlite IR-120 (obtenibles de Rohm and Haas Co.) y similares. - - -

- 5. Alternativamente, puede obtenerse un polvo enriquecido en L-lisina por extracción del caldo de cultivo o un filtrado (o sobrenadante) obtenido del caldo de cultivo con un disolvente tal como n-hexano para extraer todo el hidrocarburo residual utilizado como fuente de carbono, concentrando el caldo resultante bajo presión reducida con o sin eliminación de las células microbianas por filtración y secando finalmente el concentrado resultante por secado en tambor, secado por atomización y similares. - - - - -
- 10.

- 15. La presente invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos pero no deben considerarse limitativos del alcance de esta invención. - - - - -

Ejemplo 1

- 20. Se trataron Pseudomonas brevis Nº 22 (ATCC 21940) con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina a lo que siguió el cultivo en un medio que contenía L-valina o ácido DL-alfa-amino-n-butírico a una concentración superior a 0,5 mg/ml. Repitiendo los tratamientos mutacionales y aumentando la concentración de L-valina o de ácido DL-alfa-amino-n-butírico, se aislaron las cepas resistentes a la L-valina Nº 73 y Nº 56.
- 25. a partir de placas de agar mínimas que contenían L-valina o



ácido DI-alfa-amino-n-butírico. - - - - -

5. Cada una de las cepas N^o. 22 (ATCC 21940), N^o 73 y N^o 56 (ATCC 21941) de Pseudomonas brevis se cultivó en un medio inclinado de caldo a una temperatura de 33°C durante la noche. Se inoculó una cantidad recogida con un bucle de platino de cada uno de los cultivos en un medio de cultivo para la producción de L-lisina que tenía la composición que se indica posteriormente y luego se cultivó con sacudidas a una temperatura de 33°C durante 7 días. - - - - -

10. Después de acabado el cultivo, la cantidad de L-lisina acumulada se determinó cuantitativamente por el método convencional. Los resultados observados en el ensayo de sensibilidad a la L-valina para la cepa antecesora Pseudomonas brevis N^o. 22 (ATCC 21940) y para los mutantes Pseudomonas brevis n^o 73 y Pseudomonas brevis n^o 56 (ATCC 21941) y la cantidad acumulada de L-lisina en cada caso se indican en la siguiente Tabla 1. - - - - -

20. Como resulta evidente de los resultados indicados en la Tabla 1, se halló que el aumento de la resistencia a la L-valina origina un notable aumento de la productividad de L-lisina. - - - - -

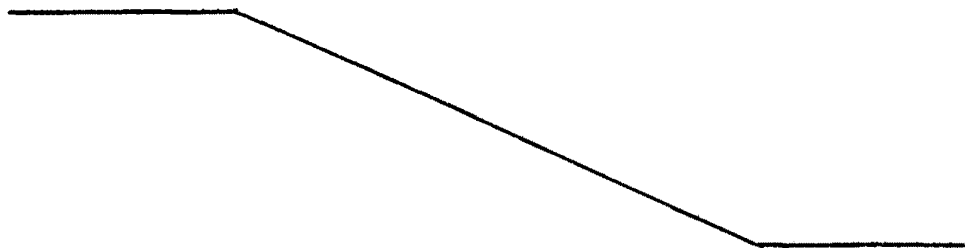




Tabla 1

		Crecimiento ¹⁾					
		Cepa A ²⁾		Cepa B ²⁾		Cepa C ²⁾	
		18	48	18	48	18	48
Ensayo 3) de Resistencia a la Valina	L-Valina	gamma/ml					
		0	+	+	+	+	+
		20	-	+	±	+	+
		50	-	+	-	+	+
		100	-	+	-	+	+
		200	-	-	-	+	+
		500	-	-	-	-	±
		1000	-	-	-	-	-
		2000	-	-	-	-	-
		5000	-	-	-	-	-
	10000	-	-	-	-	-	
Resistencia a la L-Valina		100 gamma/ml		200 gamma/ml		5000 gamma/ml	

Cantidad de L-Lisina
(Hidrocloruro) Acumula
da en el Medio Des
pués de un Cultivo
de 7 Días (g/l)⁴⁾

0.6

8.4

25.0

Nota:

- (1) Crecimiento: + ... Crecimiento
± ... Crecimiento ligero
- ... Sin crecimiento

- (2) Cepa A: Pseudomonas brevis N^o. 22 (ATCC 21940)
Cepa B: Pseudomonas brevis N^o. 73
Cepa C: Pseudomonas brevis N^o. 56 (ATCC 21941)

- (3) Ensayo de Resistencia a la L-Valina:
(Medio)



	Acido fosfórico al 75%	12 ml
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6 g
	NaCl	1 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
5.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,002 g
	KOH	14 g
10.	agua pura	1.000 ml
	pH	7,0

15. Se vertieron porciones de 10 ml del medio anterior en grandes tubos de ensayo y se esterilizaron. A cada uno de los tubos se le añadió 0,1 ml de etanol al 60% como fuente de carbono a una concentración de etanol de aproximadamente 0,6%. Cada medio se inoculó con una suspensión de cada cepa (que había sido cultivada durante 24 horas en un medio inclinado) en una cantidad tal que la concentración de la cepa en el medio era de $10^6 - 10^7$ células/ml y luego se cultivó con sacudidas a una temperatura de 33°C . La resistencia a la L-valina se definió como la concentración máxima de L-valina a la que la cepa podía crecer. - - - - -

(4) Medio para la Producción de Lisina:

25.	n-parafina ($\text{C}_{11}-\text{C}_{18}$)	10% (p/v)
	K_2HPO_4	0,1%
	KH_2PO_4	0,1%



	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,002%
	ZnSO ₄ ·4H ₂ O	0,002%
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,01%
5.	Tween 85 [•]	0,1%
	CaCO ₃ ^{••}	3,0%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0%
	pH	7,0

• Fabricado por Atlas Powder Co., U.S.A.

10. Se vertieron porciones de 30 ml del medio anterior en frascos de sacudidas de 500 ml y luego se esterilizaron a 120°C durante 15 minutos.

•• Se añadió carbonato cálcico al medio después de esterilizado separadamente.

15. Ejemplo 2

Se trató *Achromobacter coagulans* N^o. 42 (ATCC 21934) con un agente mutagénico, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, para obtener *Achromobacter coagulans* N^o. 36 (ATCC 21935) que es resistente a la DL-norvalina. La cepa resultante se cultivó entonces en un medio inclinado de caldo durante una noche. Se inoculó entonces una cantidad recogida con un bucle de platino del caldo en un medio de fermentación que tenía la composición que se indica posteriormente y se cultivó con sacudidas a una temperatura de 33°C durante 7 días. La determinación cuantitativa de la L-lisina indicó que se acumulaba hidrocloreuro de L-lisina en el medio en una cantidad de 4,8 g/l para *Achromobacter coagulans* N^o. 36 (ATCC 21935) mientras que se halló que la cantidad de hidrocloreuro de L-lisina acumulada por la



cepa antecesora, Achromobacter coagulans N^o. 42 (ATCC 21934)
era de 0,5 g/l:

Medio para la Fermentación de Lisina

	n-parafina (C ₁₁ -C ₁₈)	10% (p/v)
5.	(NH ₄) ₂ SO ₄	3%
	KH ₂ PO ₄	0,1%
	K ₂ HPO ₄	0,1%
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,004%
10.	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,002%
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,002%
	Tween 85 *	0,1%
	CaCO ₃ **	3,0%
	pH	7,0

15. * Fabricado por Atlas Powder Co., U.S.A.
Se vertió una porción de 30 ml del medio anterior en un frasco de sacudidas de 500 ml y se esterilizó a una temperatura de 120°C durante 15 minutos.

20. ** Se añadió CaCO₃ al medio después de esterilizado separadamente.

Ejemplo 3

25. Se obtuvieron Achromobacter coagulans N^o. 17 y Achromobacter coagulans N^o. 49 (ATCC 21936) que son una cepa resistente al alfa-AB (alfa-AB: ácido DL-alfa-amino-n-butírico) por tratamiento mutacional con N-metil-N'-ni



tro-N-nitrosoguanidina a partir de Achromobacter coagulans N^o. 42 (ATCC 21934) y Achromobacter coagulans N^o. 36 (ATCC 21935) que es una cepa resistente a la norvalina, respectivamente. Estas cepas así obtenidas se cultivaron entonces con

5. sacudidas en el medio para la fermentación de lisina como se ha descrito en el Ejemplo 2 a una temperatura de 33°C durante 7 días. La cantidad de hidrocloreuro de L-lisina acumulada resultó ser de 3,2 g/l para Achromobacter coagulans N^o. 17 y 10,4 g/l para Achromobacter coagulans N^o. 49 (ATCC 21936),

10. mientras que la cantidad del hidrocloreuro de L-lisina acumulada para el A. coagulans N^o. 42 (ATCC 21934) y Achromobacter coagulans N^o. 36 (ATCC 21935) resultó ser de 0,4 g/l y de 4,2 g/l, respectivamente. - - - - -

15. Los anteriores resultados indican que la resistencia a la norvalina y al ácido DL-alfa-amino-n-butírico puede aumentarse utilizando estos compuestos alternadamente, de modo que puede aumentarse gradualmente la productividad de lisina de estos microorganismos. - - - - -

Ejemplo 4

20. Una cepa resistente a la valina, la Pseudomonas brevis N^o. 56 (ATCC 21941) que había sido obtenida de Pseudomonas brevis N^o. 22 se cultivó en un medio inclinado de agar en caldo a temperatura de 33°C durante una noche y luego se

25. inculó en un frasco de sacudidas de 2 l que contenía 600 ml del medio de cultivo de siembra esterilizado previamente y que tenía la composición que luego se indica, a lo que siguió un cultivo con sacudidas a una temperatura de 33°C durante 24



horas:

Medio de Cultivo de Siembra:

	ácido fosfórico al 75%	12 ml
	(NH ₄) ₂ SO ₄	6 g
5.	NaCl	1 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,1 g
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,03 g
10.	MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,002 g
	KOH	14 g
	agua de grifo	1.000 ml
	n-parafina (C ₁₁ -C ₁₈)	7 ml

15. Se inculó una porción de 600 ml del anterior cultivo de siembra en un fermentador de jarra que contenía 20 l de un medio esterilizado de fermentación que tenía la composición que se indica posteriormente y el cultivo inoculado se cultivó a una temperatura de 35°C por agitación a un régimen de 800 rpm con aireación con un caudal de 27 l/min, - - - - -

20.

Medio de Fermentación:

	n-parafina (C ₁₁ -C ₁₈)	10% (p/v)
	K ₂ HPO	0,1%
	KH ₂ PO ₄	0,1%
25.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,002%
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001%



	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,25%
	Tween 85 *	0,05%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0%
	CaCO ₃	1,0%
5.	pH	7,0

Durante el cultivo, el medio se ajustó a un pH de 6 a 8 con una solución acuosa de amoníaco. La cantidad de hidrócloruro de L-lisina producida en el medio después de un cultivo de 90 horas resultó ser de 40,5 g/l (rendimiento: aproximadamente 40% en la n-parafina). Las células microbianas se eliminaron por centrifugación y la L-lisina producida se adsorbió sobre una resina de intercambio iónico de la manera usual. Después de elución por medio de amoníaco, el eluato se concentró y se añadieron al mismo ácido clorhídrico y entonces un alcohol para obtener cristales que pesaban 35,3 g que contenían hidrocloreuro de L-lisina con una pureza superior al 98% de 1 litro del caldo de cultivo. - - - - -

Ejemplo 5

Un medio de agar en caldo vertido en una botella Houle y luego esterilizado se inoculó con Achromobacter coagulans N°. 49 (ATCC 21936) que se había cultivado en un medio inclinado. Después de que el microorganismo inoculado se hubo cultivado a una temperatura de 33°C durante la noche, el cultivo se suspendió en 300 ml de una solución fisiológica salina esterilizada. Se inocularon 600 ml de la suspensión así preparada en un fermentador de jarra de 30 l que contenía 15 l de



un medio con la misma composición que el descrito en el Ejemplo 2 y se cultivó a una temperatura de 35°C con agitación a una velocidad de 500 rpm bajo aireación con un caudal de 27 l/min. El valor de pH del cultivo durante la etapa de cultivo se ajustó hasta casi la neutralidad con una solución acuosa de amoníaco o ácido clorhídrico. La cantidad de hidrocloreuro de L-lisina acumulada después de un cultivo de 80 horas alcanzó 13,4 g/l. - - - - -

Se centrifugó, de la manera usual, 1 l del caldo de cultivo para eliminar las células microbianas y se adsorbió L-lisina en una resina de intercambio iónico (Amberlite ICR-50) y luego se eluyó con una solución acuosa de amoníaco. El eluato se concentró y se añadieron ácido clorhídrico y entonces un alcohol para obtener 10,2 g de cristales de hidrocloreuro de L-lisina. - - - - -

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - - - -

R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- Procedimiento para la producción de L-lisina por fermentación, caracterizado porque comprende cultivar aerobiamente una cepa mutante productora de L-lisina de un microorganismo perteneciente al género Pseudomonas o Achromobacter en un medio de cultivo que contiene un hidrocarburo como fuente principal de carbono hasta que se acumula una cantidad subs



tancial de L-lisina en el medio de cultivo y recuperar la L-lisina así acumulada del caldo de cultivo, siendo dicha cepa mutante resistente a por lo menos un aminoácido o análogo del mismo elegido del grupo compuesto por L-valina, ácido alfa-aminobutírico, norvalina, beta-hidroxinorvalina, ácido alfa-amino-beta-clorobutírico y L-treonina. - - - - -

5.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho microorganismo es una cepa mutante de Pseudomonas brevis ATCC 21940 ó Achromobacter coagulans ATCC 21934. - - - - -

10.

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicha cepa mutante es Pseudomonas brevis ATCC 21941. - - - - -

15.

4.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicha cepa mutante es Achromobacter coagulans ATCC 21935 ó ATCC 21936. - - - - -

20.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho aminoácido o análogo del mismo se utiliza solo o en combinación con por lo menos otro aminoácido y análogo del mismo. - - - - -

25.

6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la cepa mutante productora de L-lisina se produce a partir de un microorganismo perteneciente al género Pseudomonas o Achromobacter sometiendo dicho microorganismo a tratamientos mutacionales en dos o más etapas utilizando un



aminoácido o análogo del mismo diferente en cada etapa. - - -

7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque se utiliza etanol como fuente de carbono en el medio para los tratamientos mutacionales. - - - - -

5. 8.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho cultivo se realiza a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 40°C y a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9. - - - - -

10. 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho pH se mantiene prevalentemente con la adición de iones amonio. - - - - -

10.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho hidrocarburo es queroseno o n-parafina con 10 a 20 átomos de carbono. - - - - -

15. 11.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho cultivo se conduce en presencia de un agente tensioactivo. - - - - -

20. 12.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho agente tensioactivo es mono-oleato de polioxietilensorbitán o trioleato de polioxietilensorbitán. - - - - -

13.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha recuperación de L-lisina se realiza

10
E-1 AGO-1973

después de calentar el caldo de cultivo a una temperatura de 70 a 95°C. - - - - -

5. 14.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha recuperación de L-lisina se realiza extrayendo el caldo de cultivo con un disolvente orgánico para eliminar el hidrocarburo residual del caldo de cultivo, concentrando el caldo resultante de cultivo, filtrando el concentrado resultante y secando el filtrado para obtener un polvo que contiene L-lisina. - - - - -

10. 15.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE L-LISINA POR FERMENTACION". - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de veinticinco hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

MADRID, - 1 AGO. 1973
P. A. M. CURELL SUÑOL
Por Poder
Firmado: J. Carboner

Carboner

mts.