



441306

memoria descriptiva

Int. Cl.: C12D 13/06

CLASE DE REGISTRO

Una Patente de Invención, por veinte años en España.

NOMBRE Y NACIONALIDAD DEL SOLICITANTE

INGENIERIA QUIMICA TARRAGONA, S.A.
- sociedad española -

441306

RESIDENCIA Y DOMICILIO

TARRAGONA.
Apartado, nº 294.

OBJETO

"Procedimiento para producir un concentrado de la L-Lisina por biosíntesis microbiana".

INVENTOR

D. Julio César Aragón Hernández, nacionalidad cubana.

26 AGO 1975

1

5

10

15

20

25

30

Este invento se refiere a un procedimiento para producir un concentrado de aminoácidos. Más particularmente se refiere a un procedimiento para la producción de un concentrado de L-lisina, por biosíntesis microbiana. Todavía más particularmente, el invento se refiere a un procedimiento mediante el cual se produce un concentrado de L-lisina gracias a la actividad biosintética de determinados microorganismos.

La lisina es un aminoácido indispensables "es estricto" pues la misma no puede ser fabricada en el organismo a partir de otros aminoácidos. La lisina no puede ser reemplazada por ninguno de sus análogos químicos. Su forma isómera D no es utilizable por el organismo. La L-lisina al encontrarse en cantidades reducidas en los cereales limita la utilización por los organismos vivos de la proteína de estos vegetales, por esta razón es ampliamente empleada en la formulación de piensos compuestos. Se ha comprobado que mediante la adición de pequeñas cantidades de L-lisina al pienso se pueden lograr notables incrementos de peso en el engorde de animales. Por esta razón, sería de gran utilidad disponer de un procedimiento económico para la producción industrial de L-lisina.

Uno de los objetos del presente invento es crear un procedimiento mejorado para la producción de un concentrado de L-lisina que supera algunas de las desventajas de los métodos anteriormente empleados.

Otro objeto de la presente invención, es crear un



1 procedimiento para producir un concentrado de L-lisina median
te la actividad biosintética de determinados microorganismos,
que se puede llevar a cabo de una forma simple y económica.

5 Otro objeto de la presente invención, es crear un -
procedimiento para producir un concentrado de L-lisina que pue
de realizarse convenientemente a escala industrial a costos -
relativamente más bajos que los metodos anteriormente emplea--
dos, permitiendo el empleo de materias primas que por ser sub
10 productos industriales, son relativamente baratos.

Aun otro nuevo objeto de esta invención es proporcio
nar un procedimiento para la producción de un concentrado de
L-lisina que permite obtener un producto con alto valor nutri
15 tivo y con buenos rendimientos.

Los objetos y ventajas de la presente invención re--
sultarán evidentes para los técnicos en la materia, después -
de la consideración de la siguiente memoria y reivindicacio
nes.
20

De acuerdo con la presente invención, se ha encon--
trado que la actividad metabólica de determinados mutantes de
bacterias, permite la acumulación en un medio de cultivo li--
quido de grandes cantidades de L-lisina,
25

Los mutantes de bacterias antes indicados, se pue--
den obtener exponiendo células vegetativas de bacterias perte
necientes a los generos Bacillus, Alcaligenes, azotobacter, -
Corynebacterium y Brevibacterium, a la acción de la luz ultra
30 violeta, de rayos gamma o rayos X, o bien poniendo dichas ce



1 lulas en contacto con una solución de n-metil-n-nitro-N-nitro
soguanidina, o ácido nitroso, sulfato de dietilo. etc.

5 El procedimiento descrito en la presente memoria per-
mite producir un concentrado de L-lisina para piensos con ele-
vados rendimientos y en forma directa a partir de fuentes ba-
ratas de carbohidratos y nitrógeno.

10 El medio de cultivo empleado en la producción del -
concentrado de L-lisina, esta compuesto de una fuente de car-
bono asimilable, una fuente de nitrógeno y pequeñas cantida-
des de otros nutrientes. Como fuentes de carbono se puede em-
cualquier
15 emplear/fuente barata de carbohidratos, tales como residuos ri-
cos en almidón, melaza, etc. Como fuente de nitrógeno inorga-
nico, se puede emplear sulfato de amonio, cloruro de amonio,
urea, amoniaco, etc. Como fuente de nitrógeno amínico, es con-
veniente emplear hidrolizados de proteínas vegetales o anima-
les.

20 Las reacciones de biosíntesis de L-lisina requieren
la presencia de oxígeno en el medio de cultivo, por lo cual,
la producción del concentrado de L-lisina se lleva a cabo en
condiciones aerobias. El oxígeno necesario para las reaccio-
nes de biosíntesis de L-lisina se suministra mediante el bor-
25 boteo de aire en el interior del medio de cultivo. Para lo-
grar una elevada velocidad de transferencia de oxígeno del -
aire al medio de cultivo, se provee el recipiente donde se
producen las reacciones de crecimiento microbiano y biosínte

30



1 sis de Lisina, con un mecanismo adecuado de agitación. La tem
peratura de las reacciones de biosíntesis de Lisina se mantie-
nen en un rango comprendido entre 25 y 37°C. Los rendimientos
5 más altos de Lisina se consiguen cuando el pH se controla auto-
máticamente en un valor fijo entre 6,5 y 8,0. El control de -
pH se logra por medio de la adición de álcali o ácido cuando
el valor del pH del medio se desvia del valor deseado.

10 Cuando se alcanza una concentración entre 2 y 4% de
Lisina en el medio de cultivo, se da por terminada la fermen-
tación. El medio fermentado, que contiene entre un 2 y un 4%
de L-lisina se concentra mediante evaporación al vacío y pos-
teriormente se somete a una operación de secado hasta obtener
15 el concentrado de L-lisina. Este concentrado es un polvo que
contiene entre un 20 y un 40% de L-lisina, un 8-10% de azuca-
res, así como pequeñas cantidades de otros aminoácidos, vita-
minas, biomasa celular sales minerales, etc.

20 Los siguientes ejemplos se dan simplemente como -
ilustraciones de la presente invención y no han de considerarse
se como limitativos. Salvo que se indique lo contrario los -
tantos por cientos indicados en los ejemplos están en peso:

EJEMPLO I

25 La mutante es una bacteria perteneciente al género
Corynebacterium, fue inoculada en 250 ml. del siguiente medio
de inoculación: Glucosa 2%, Peptona 1%, Extracto de carne 0,5%
Cloruro de Sodio 0,25%. Este medio se inoculó a 28°C por espa-
30 cio de 16-18 horas con agitación. Los 250 ml. de inóculo se -

26 AGO



- 5 -

1 utilizaron para inocular los reactores que contenian 8 litros
de medio de producción con la composición siguiente: Melaza -
de caña 20%, Hidrolizado de proteínas 14%, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 3%. Las
5 reacciones de biosíntesis se efectuaron en un reactor con agi-
tación aireación bajo las condiciones siguientes: volumen de
trabajo 8 litros, agitación mediante una turbina de 6 paletas
planas, aireación 4 Litros/minuto, velocidad de agitación 700
r.p.m. La temperatura en el reactor se mantuvo en 30°C por me-
10 dio de un control automático. También se controlaron automati-
camente el pH y la espuma producida. El pH se mantuvo a un -
valor constante entre 6,5 y 8,0 mediante la adición de NaOH 0
 SO_4H_2 5N. Se encontro que al cabo de 68 horas se habia acumu-
15 lado en el medio de cultivo 43,04 mg/ml de L-lisina.

Un litro del medio fermentado se concentra en un eva-
porador rotatorio al vacio tipo rotovapor. El producto concen-
trado por evaporación es secado en una estufa al vacio hasta
20 obtener un producto con la siguiente composición: L-lisina -
40,8%, Azucares 8%, otros aminoácidos 10%, humedad 5%, siendo
el resto biomasa celular, cenizas, proteínas, vitaminas, etc.

EJEMPLO II

25 Se lleva cabo de la misma manera y bajo las mismas -
condiciones que en el ejemplo I, salvo que el medio de produc-
ción contiene 20% de melaza de remolacha, 10 ng/lt. de Bioti-
na, 3% de Sulfato de Amonio, 14% de Hidrolizado de proteínas.
Al cabo de 86 horas se habia acumulado en el medio de cultivo

30



1 30.1 mg/ml. de L-lisina.

EJEMPLO III

5 Se realizó de la misma manera y bajo idénticas condiciones al ejemplo I, salvo que al medio de producción se le añadió 0,02% de Metionina y se utilizó como microorganismo catalizador una mutante de una bacteria perteneciente al género Brevibacterium. Al cabo de 86 horas de fermentación se había acumulado en el medio de cultivo 40 mg/ml. de L-lisina.

10 Hablando descrito así la invención, resultará evidente que el mismo puede ser variado de muchas maneras. Dichas desviaciones no han de ser consideradas como diferentes al espíritu y alcance de la invención y se pretende que todas estas modificaciones esten incluidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

15 La presente solicitud se acoge a los beneficios del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

20 La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

25 1.- Procedimiento para producir un concentrado de la L-lisina por biosíntesis microbiana, caracterizado porque se dispone un medio de cultivo en el que existen una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno y pequeñas cantidades de otros nutrientes, verificándose las reacciones de biosíntesis en condiciones aerobias a una temperatura comprendida entre 25 y 37°C, y con un pH controlado automáticamente, de modo que su valor ni sea inferior a 6,5, ni supe-

30



1 rior a 8; como agentes catalizadores de la biosíntesis se
utilizan microorganismos que son mutantes obtenidos por ex-
posición a la luz ultravioleta, de bacterias pertenecien-
tes a los géneros Bencillus, Alcaligenes, Azotobacter,
5 Corynebacterium y Brevibacterium; concentrándose la l-lisi-
na y las otras sustancias biológicamente activas produci-
das por biosíntesis mediante simples operaciones de evapo-
ración y secado.

10 2.- Procedimiento, según la reivindicación
primera, caracterizado porque la fuente de carbono está
constituida por subproductos de bajo costo, tales como me-
laza, desechos de almidón, etc.

15 3.- Procedimiento, según la reivindicación
primera, caracterizado porque la fuente de nitrógeno amíni-
co está constituida por hidrolizados de harinas vegetales
y animales de bajo costo.

20 4.- Procedimiento, según la primera reivindi-
cación, caracterizado porque la concentración se efectúa
mediante evaporación al vacío, cuando en el medio de culti-
vo se ha alcanzado entre un 2 y un 4% de lisina, sometién-
dolo posteriormente a una operación de secado hasta obte-
ner un concentrado en forma de un polvo que contiene entre
25 un 20 y un 40% de lisina, un 8 a un 10% de azúcares y pe-
queñas cantidades de otros aminoácidos, vitaminas, bioma-
sa celular, sales minerales, etc.

30 5.- "Procedimiento para producir un concentra-
do de la l-lisina por biosíntesis microbiana".

26



- 8 -

1

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, la cual consta de ocho hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

5

Madrid, a

26 SEP 1975

10

CARLOS ROCA
P. E.

Edo. Fed. ...

15

20

25

30