

441307



memoria descriptiva

Int. Cl. C.12.D.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 -
RESIDENCIA Y DOMICILIO	TARRAGONA. Apartado, nº 294.
<input type="checkbox"/> OBJETO	"Procedimiento para la producción a escala industrial de L-lisina".
INVENTOR	D. Julio César Aragón Hernández, nacionalidad cubana.

307

26 AGO 1973

- 1 -

1 Este invento se refiere a un procedimiento para pro-
ducir L-lisina por biosíntesis microbiana. Más particularmen-
te el invento se refiere a un procedimiento mejorado para la
5 producción de L-lisina por medio de la acción de un doble mu-
tante auxotrofo de bacterias pertenecientes a los generos Ar-
throbactes, Microbacterium, Corynebacterium, Bacterium y Mi-
crococcus. Todavía más particularmente el invento se refiere
a un metodo para evitar la reversión del mutante auxotrofo
10 productor de L-lisina a un estado prototrofico.

La L-lisina es un aminoácido esencial, ampliamente
empleado en la alimentación animal y humana. La lisina no pue-
de ser fabricada en el organismo a partir de otros aminoácidos,
15 ni puede ser reemplazada por ninguno de sus analogos químicos.
Este aminoácido es deficitario en las proteínas de los cerea-
les, incrementando su adición al valor biológico de estos.

Este aminoácido puede ser obtenido por varios meto-
dos: por ejemplo puede ser obtenido por fermentación mediante
20 la acción de mutantes auxotrofos de microorganismos que tie-
nen requerimientos especiales de nutrición. Dichos microorga-
nismos requieren treonina, metionina, isoleucina, leucina o
homoserina para su crecimiento. Se ha encontrado que estos mu-
25 tantes auxotrofos productores de L-lisina, tienden a revestir
a una forma normal prototrofica. La tendencia de estos microor-
ganismos a cambiar de un estado auxotrofo a uno prototrofico
afecta negativamente la producción de Lisina, debido al creci-

30

26 AGO



- 2 -

1 miento más rápido del mutante revertido no productor de Lisi
na. Esto es especialmente adverso en una planta de fermenta-
ción continua. Así pues, sería muy ventajoso disponer de un
5 procedimiento que evite la reversión del mutante.

Uno de los objetos de la presente invención es - -
crear un procedimiento mejorado para la producción de L-lisi
na que supera algunas de las desventajas de los métodos ante-
riormente empleados.

10 Otro objeto de la presente invención es crear un -
procedimiento para producir L-lisina mediante la actividad -
biosintética de determinados microorganismos, que se puede -
llevar a cabo de una manera simple y económica.

15 Aun otro nuevo objeto de esta invención es propor-
cionar un método para la producción de L-lisina mediante un
microorganismo que además de no revertir a la forma prototro
fica, es capaz de producir L-lisina en cantidades mayores y
con mejores rendimientos que en los procedimientos anterior--
20 mente descritos.

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

De acuerdo con la presente invención, se ha encon-
trado que por medio de un doble mutante de un microorganismo
productor de L-lisina se puede incrementar y estabilizar la

30 ac

26



- 3 -

1 acumulaci3n de Lisina en el medio de cultivo. El doble mutan-
te auxotrofo, antes mencionado, se puede obtener por exposi-
ci3n a la luz ultravioleta, rayos gamma o n-metil-n-nitroso-
5 guanidina de una capa que requiere homoserina y seleccionar
un nuevo mutante que requiere ademias de la homoserina, leuci-
na o alternativamente treonina, metionina y leucina. Este -
procedimiento de obtensi3n de mutantes auxotrofos es bien co-
nocado de los expertos en la materia y es comunmente emplea-
10 do en la obtenci3n y aislamiento de mutantes de bacterias.

El procedimiento objeto de la presente invenci3n -
es un metodo pr3ctico y econ3mico de producir L-lisina a es-
cala industrial con elevados rendimientos y bajo costo.

15 El medio de cultivo empleado en la producci3n de -
la L-lisina, esta compuesto de una fuente de carbono, una -
fuente de nitrogeno, y pequeas cantidades de los aminoaci-
dos requeridos por el doble mutante. Como fuente de carbono
se puede emplear uno o m3s hidratos de carbono, algunos aci-
20 dos 3rganicos tales como el 'acido ac3tico, acido gluc3nico,
etc., parafinas lineales o etanol. Como fuente de nitr3geno
inorg3nico se puede emplear sales de amonio, urea, amoniaco,
etc. Los amino3cidos requeridos por el doble mutante pueden
25 ser suministrados en su forma b3sica libre, como sales de -
los 3cidos o como hidrolizados o extractos de proteinas. Ade-
mas de estos compuestos, el medio de cultivo debe contener -
pequeas cantidades de sales minerales y vitaminas.

30



1 El cultivo del mencionado doble mutante que requiere
re homoserina y leucina; teronina, metionina y leucina o treonina,
5 homocisteina y leucina, debe ser llevado a cabo en condiciones
aerobicas, puesto que las reacciones de biosíntesis de
L-lisina requieren la presencia de oxigeno en el medio. Para lograr
la adecuada velocidad de transferencia de oxigeno al medio de cultivo,
se provee al fermentador donde se producen las reacciones de crecimiento
microbiano y biosíntesis de Lisina,
10 con un mecanismo adecuado de aireación y agitación. La temperatura
del fermentador se mantiene en un rango comprendido entre 24 y 37°C.
El pH del medio de cultivo se controla automáticamente a un valor
comprendido entre 5'1 y 8'5. En estas condiciones se producen al cabo
15 de unos 3 días como mínimo 20 mg/ml. de L-lisina.

La L-lisina contenida en el medio fermentado se puede recuperar,
por uno de los procedimientos usuales, mediante resinas de intercambio
20 iónico, después de separar las células por centrifugación.

Los siguientes ejemplos se dan simplemente como ilustrativos de la
presente invención y no han de considerarse como limitativos. Salvo que
se indique lo contrario, los tantos por ciento indicados en los ejemplos
25 están en peso:

EJEMPLO I

Una doble mutante de una bacteria perteneciente al género Brevibacterium,
que requiere metionina, treonina y leucina, fue transferida de una
30 cuña de agar a 250 ml. de medio



1 de inoculación, que tenia la siguiente composición, Peptona -
1%, Extracto de Carne 0'5%, ClNa 0'25%, Glucosa 2%, agua has-
ta 100. Este medio, después de inoculado fue incubado en un -
5 agitador giratorio a 28°C. por espacio de 16-18 horas. Estos
250 ml. de medio de inoculación fueron empleados para inocu--
lar un fermentador que contenia 8 litros de un medio con la -
siguiente composición: Sacarosa 160 gr/lt., PO_4H_2K 1'5 gr/lt,
10 PO_4HK_2 0'5 gr/lt, $SO_4(NH_4)_2$ 40 gr/lt, SO_4Mg 0'5 gr/lt, SO_4MN
0'02 gr/lt, SO_4Fe 0'62 gr/lt, Biotina 30 mg/lt, Metionina 120
mg/lt, Treonina 300 mg/lt, Leucina 500 mg/lt, Cistina 100 mg/
lt. El fermentador estaba dotado de los equipos necesarios pa
ra lograr una eficiente agitación y aireación, control de pH,
15 control de nivel y temperatura. Las condiciones de operación
en el fermentador fueron: aireación 4 litros/minuto, agita--
ción 700 r.p.m. La temperatura en el fermentador se mantuvo
en 30°C. por medio de un control automatico. El pH se mantu-
vo a un valor constante entre 6'5 y 8'0 mediante la adición -
20 de amoniaco, Al cabo de 68 horas de fermentación se habían -
acumulado en el medio de fermentación 40 mg/ml. de L-lisina.

CIEN mililitros del medio fermentado fueron centri-
fugados para eliminar las celulas bacterianas y se le ajusto
25 el pH a 7'0. Este medio fue hecho pasar a traves de una colum
na de vid-rio de 30 mm de diametro por 240 mm de longitud -
que había sido rellenaada con resina intercambiadora de iones
debilmente cationica, AMBERLITE IRC-50 de la firma Rohm & Haas,

30



26 AGO 1973

- 6 -

1 a una velocidad de 1 gota cada 5 segundos. Cuando la columna
había dejado de absorber Lisina se detuvo el flujo de medio
y se lavo con agua destilada. Posteriormente se eluyo la li-
5 sina absorbida con solución 0'15N de hidroxido amónico. Des-
pués de eliminar el amoniaco del liquido eluido se ajusto el
pH a 2'0 y se evaporó a sequedad. El producto seco fue disuel-
to en una pequeña cantidad de agua destilada. A esta solución
se le añadió etanol y se dejó reposar para que cristalizara
10 el monoclórhidrato de L-lisina. Los cristales así obtenidos
fueron separados por centrifugación y secado. A las aguas ma-
dres de la cristalización se les añadió eter etílico para ob-
tener cristales de L-lisina diclorhidrato. De esta forma se
15 obtuvieron 340 mg de L-lisina monoclórhidrato y diclorhidra-
to.

EJEMPLO II

Se lleva a cabo de la misma manera y bajo las mis-
20 mas condiciones que en el ejemplo I, salvo que el medio de -
producción contenía 0,20% de metionina. Al cabo de 86 horas
se habían acumulado en el medio decultivo 41,82 mg/ml. de L-
lisina. Cincuenta mililitros de este medio fueron pasados a
traves de una columna de intercambio iónico de la misma mane-
25 ra y bajo las mismas condiciones que en el ejemplo I obte- -
niendose finalmente 158 mg de L-lisina mono y diclorhidrato.

EJEMPLO III

Se realizo de la misma manera y bajo idénticas con-
30

26 AGO 1973



- 7 -

1 diciones al ejemplo I, salvo que el microorganismo usado fue
un mutante doble perteneciente, al genero Corynebacterium. Al
cabo de 54 horas de fermentación se habían acumulado en el me
dio de cultivo 40 mg/ml. de L-lisina.

5

EJEMPLO IV

Se realizo de la misma manera y bajo identicas con-
diciones al ejemplo I salvo que el microorganismo empleado -
fue un ~~doble~~ mutante, que requiere metionina, treonina y leuci
na, perteneciente al genero Corynebacterium y se utilizo como
10 fuente de carbono 20% de melaza de remolacha. Al cabo de 75 -
horas de ferementación se habían acumulado en el medio de cul-
tivo 35 mg/ml. de L-lisina.

15

EJEMPLO V

Se realizo de la misma manera y bajo identicas con-
diciones al ejemplo I salvo que se empleo como fuente de ni--
trogeno aminico hidrolizado de caseina. Al cabo de 71 horas -
de fermentación se habían acumulado en el medio de cultivo 38
20 mg/ml de L-lisina.

Habiendo descrito así la invención, resultara eviden
te que la misma puede ser variada de muchas maneras. Dichas -
desviaciones no han de ser consideradas como diferentes al es
25 piritu y alcance de la invención y se pretende que todas es--
tas -modificaciones esten incluidas dentro del alcance de las
siguientes reivindicaciones.

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



1

N O T A

La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

5

10

15

20

1.- Procedimiento para la producción a escala industrial de L-lisina, caracterizado porque en la obtención de un microorganismo productor de L-lisina, con deficiencia múltiple de aminoácidos, que no revierte el estado prototrófico y que acumula mayores cantidades de lisina que la bacteria original, se dispone un medio de cultivo en el que existe una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, pequeñas cantidades de aminoácidos y pequeñas cantidades de sales minerales y vitaminas; requiriendo el cultivo del mencionado doble mutante homoserina y leucina; o treonina, metionina y leucina o treonina, homocisteína y leucina, y debiendo ser llevado a cabo en condiciones aeróbicas; la temperatura del fermentador se mantiene entre 24 y 37°C y el PH del medio de cultivo se controla de modo que siempre esté comprendido entre 5,1 y 8,5; la lisina del líquido de fermentación se recupera por medio de una resina de intercambio iónico y cristalización.

25

2.- Procedimiento, según la reivindicación primera, caracterizado porque el microorganismo productor de L-lisina es un doble mutante auxotrofo de una bacteria perteneciente a los géneros Micrococcus, Brevibacterium, Corynebacterium, Microbacterium o Arthrobacter.

3.- Procedimiento según la reivindicación pri-



1 mera, caracterizado porque la fuente de carbono está consti-
tituida por uno o varios hidratos de carbono tales como
glucosa, sacarosa, fructosa, almidón, melaza, desechos agrí-
colas ricos en carbohidratos; ácidos orgánicos tales como
5 ácido acético, ácido málico, ácido láctico, etc.: glicerina;
etanol; parafinas lineales, etc.

4.- Procedimiento, según la reivindicación primera, caracterizado porque la fuente de nitrógeno inorgánico
10 está constituida por una sal de amonio, urea, nitratos, nitritos, etc.

5.- Procedimiento, según la reivindicación primera, caracterizado porque la fuente de nitrógeno amínico
15 está constituida por un hidrolizado o extracto de proteínas tales como la peptona, el hidrolizado de caseína, hidrolizado de harina de carne, extracto de levaduras, hidrolizado de harina de pescado, hidrolizado de desechos de maderos, residuos de soja desgrasados o sus productos hidrolizados o digeridos, así como aminoácidos en su forma básica libre o como sales de la forma ácida.
20

6.- Procedimiento, según la reivindicación primera, caracterizado porque para lograr la adecuada velocidad de transferencia de oxígeno al medio de cultivo, se pre-
25 ve al fermentador de un mecanismo adecuado de aireación y agitación.

7.- "Procedimiento para la producción a escala industrial de L-lisina".
30

26 SEP 1976

-10 -

1
5
10
15
20
25

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

Madrid, a

26 SEP 1976

CARLOS ROED
E. P.
Fco. J. Pedro

[Handwritten signature]