

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

| | | |
|---------|-----------------------|---------|
| (19) ES | (11) NUMERO | (10) A3 |
| (21) | 448113 | |
| (22) | FECHA DE PRESENTACION | |
| | 20 MAY 1976 | |

PATENTE DE INTRODUCCION

| | |
|--------------------------|----------------------------------|
| (47) FECHA DE PUBLICIDAD | (51) CLASIFICACION INTERNACIONAL |
| | C 12 D |

| |
|---|
| (54) TITULO DE LA INVENCIÓN |
| Procedimiento para producir L-lisina por fermentación. |
| (58) PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION |
| Patente Norteamericana 3.687.810. |

| |
|---|
| (71) SOLICITANTE (S) |
| INGENIERIA QUIMICA TARRAGONA, S.A. |
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE |
| TARRAGONA. Polígono Industrial Francolí, 30. |
| (72) INVENTOR (ES) |
| |
| (73) TITULAR (ES) |
| INGENIERIA QUIMICA TARRAGONA, S.A. |
| (74) REPRESENTANTE |
| D. Carlos ROEB UNGEHEUER. |

1 El presente invento se refiere a un procedimiento
para producir L-Lisina por fermentación usando una raza pro-
ductora de L-Lisina de *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacte-*
5 *rium flavum* capaz de resistir a los antibióticos, tales como
penicilina, bacitracina, cicloserina, gramicidina, polimixina
y nistatina.

Se ha informado en la publicación de patente ja-
ponesa núm. 6.499/1961 que razas mutantes microbianas, perte-
necientes al género de *Micrococcus*, *Bacillus*, *Escherichia* y
10 *Aerobacter*, etc., pueden usarse como microorganismos capaces
de producir L-Lisina por fermentación y que requieren (1) homo-
serina, (2) treonina y metionina, (3) treonina y cistationi-
na, (4) treonina y homocisteina y/o homoserina y leucina para
su crecimiento. En adición, razas mutantes microbianas, requi-
15 riendo treonina, pertenecientes al género de *Brevibacterium* se
han descrito en la patente francesa núm. 1.533.688.

Sin embargo, las productividades de L-Lisina de
estas cepas conocidas no son suficientes para producción co-
mercial. Además, cuando se usa material de sacarina cruda, es
20 decir, melazas, como principal fuente, no se obtiene un rendi-
miento constante, reproducible de L-lisina sobre azúcar. Los
rendimientos dependen del lugar y de las condiciones de las
melazas, cuya producción es bastante indeseable desde el pun-
to de vista de mantener la adición constante controlada.

25 Un objeto de la presente patente es procurar un
procedimiento mejorado para producir L-lisina por fermenta-
ción, que puede realizarse en escala comercial con alto rendi-
miento sobre el azúcar y mejorar reproductibilidad en un medio
30 de cultivo.

1 Después de realizar extensos estudios para la
mejora de razas, los inventores de la presente patente han
descubierto que la producción de L-lisina puede incrementar-
se grandemente cuando se imparten varias propiedades resis-
5 tentes a los antibióticos a las razas conocidas productoras
de L-lisina, por lo que las dificultades, que se encuentran
por el uso de melazas de fermentación pueden ser eliminadas.

 La presente patente, basada en tal descubrimien-
to, se dirige a procurar un procedimiento para producir L-
10 lisina, que comprende las etapas de cultivar una raza mutan-
te productora de L-lisina, capaz de resistir a los antibió-
ticos en un medio nutriente y recuperar del mismo la L-lisi-
na acumulada.

 La publicación de patente japonesa nº 4.398/1966
15 describe un procedimiento usando una raza resistente a los
antibióticos para fermentación ácido glutámica. En este pro-
cedimiento se añade al medio de cultivo un antibiótico co-
rrespondiente a la raza usada resistente, por lo que el cre-
cimiento de las razas contaminadas, que no tengan resisten-
20 cia a los antibióticos, puede ser inhibida para estabilizar
la fermentación ácido glutámica.

 En contraste, es posible realizar ventajosamen-
te fermentación de L-lisina de acuerdo con la presente pa-
25 tente con rendimientos mejorados si las dificultades conven-
cionales procedentes del uso de melazas aún cuando no se aña-
den antibióticos al medio de cultivo.

 Razas mutantes productoras de L-lisina, capaces
de resistir a los antibióticos, que pueden usarse a los fi-
30

1 nes de la presente patente, pueden obtenerse de varias mane-
ras convencionales y el grado de resistencia de los mutantes
puede variar con la concentración de tratamiento de antibió-
tico. Un método preferido se cita como ejemplo en lo que si-
5 gue. Una raza, que tiene una excelente habilidad para produ-
cir L-lisina, se selecciona entre las razas conocidas produc-
toras de L-lisina. la raza es tratada por un método convencio-
nal inductor de mutación tal como tratamiento con rayos ultra-
violeta, rayos X, nitrito de sodio y N-metil-M'-nitro-N-nitro-
10 soguanidina, etc.

Las razas obtenidas se cultivan en un conocido
medio tamizador, conteniendo antibióticos a una concentración
adecuada (por ejemplo, medio de caldo de agar y medio de agar
mínimo) por lo que la raza, que es resistente a los antibió-
15 ticos añadidos, puede recuperarse selectivamente. En este ca-
so es posible obtener una raza, que es resistencia a mas de
dos tipos de antibióticos por cultivo de los mutantes en un
medio conteniendo mas de dos tipos de antibióticos o culti-
vando las razas obtenidas en un medio tamizador conteniendo
20 otros antibióticos. Además es posible obtener razas, que mues-
tran una mas alta resistencia a los antibióticos, selecciona-
do razas de baja resistencia a los antibióticos y sometiéndos-
las a repetidos tratamientos inductores de mutación realiza-
dos de manera similar a la arriba descrita.

25 Antibióticos capaces de conferir la resisten-
cia a los antibióticos de razas de acuerdo con la presente
patente, pueden citarse como ejemplo por penicilina, bacitra-
cina, cicloserina, granicidina, polimixina y nistatina, etc.,

1 cuya resistencia a los antibióticos es capaz de inhibir la sín-
tesis de paredes celulares de función desordenadora de membra-
nas de células. Concentraciones normales del antibiótico en
5 el medio tamizador alcanzan desde 0,5 a 1.000 γ /ml, preferen-
tamente de 1 a 200 γ /ml.

Ejemplos de razas resistentes a los antibióti-
cos, obtenidas de acuerdo con la presente patente y el grado
de su resistencia a los antibióticos comparado con sus razas
emparentadas, se muestran en la tabla 1. Estas razas han sido
10 depositadas en la American Type Culture Collection antes de
la presentación de esta solicitud en una base no restringida.

B. Razas resistentes a polixina.

| Raza | A | B | | |
|---|--------------|-----|------|------|
| | | C | D | |
| 15 Corynebacterium glutamicum, M-901-No. 2347- | Polimixina B | 0 | 0,00 | 0,51 |
| TA52 (ATCC 21516). | idem | 0,4 | 0,00 | 0,32 |
| 20 Raza pariente Corynebacterium glutamicum, N-901-No. 2347- | Polimixina B | 0 | 0,00 | 0,34 |
| (ATCC 21253) | idem | 0,4 | 0,00 | 0,00 |

25 Nota: A = antibióticos añadidos y su cantidad
(μ /ml); B = cantidad de células microbianas en el caldo (den-
sidad óptica); C = 0 hora; D = después de 7 horas.

T A B L A 1

A. Razas resistentes a la penicilina.

30

30 25 20 15 10 5 1

| Raza | B | | | | |
|---|----------------------|----------|--------------|--------------|---|
| | A | C | D | E | F |
| Corynebacterium glutamicum, M-901-No. 2347-TA18 (ATCC 21513). | Penicillin G idem | 0 0.4 | 0.00 0.00 | 1.09 0.13 | |
| Corynebacterium glutamicum, M-901-No. 2347-TA26(ATCC 21514). | Penicillin G idem | 0 0.4 | 0.00 0.00 | 1.30 1.16 | |
| Corynebacterium glutamicum, M-901-No. 2347-TA27 (ATCC 21515). | Penicillin G idem | 0 0 | 0.00 0.00 | 0.99 0.14 | |
| Raza pariente, Corynebacte- rium glutamicum, M-901-No. 2347 (ATCC 21253). | Penicillin G idem | 0 0.4 | 0.00 0.00 | 1.32 0.01 | |
| Brevibacterium flavum, S-5- P.27 (ATCC 21517). | Penicillin G idem | 0 0.2 | 0.0 0.0 | 1.5 0.5 | |
| Raza pariente, Brevibacte- rium flavum S-5 (ATCC 21127). | Penicillin G idem | 0 0.2 | 0.0 0.0 | 1.3 0.0 | |
| Brevibacterium flavum, ST-12 P.25 (ATCC 21518). | Penicillin G idem | 0 0.2 | 0.0 0.0 | 1.6 1.1 | |
| Raza pariente, Brevibacte- rium flavum ST-12 ATCC (21128) | Penicillin G idem | 0 0.2 | 0.0 0.0 | 1.2 0.0 | |

1
5
1

1 Nota: A = antibióticos añadidos y su cantidad
(μ /ml); B = cantidad de células microbianas en caldo (den-
sidad óptica); C = justo después de adición; D = después de
12 horas; E = después de 17 horas; F = después de 34 horas.

5 Nota, 1.- Composición de medio: Glucosa 4 g/dl;
pectona 2 g/dl; extracto de carne 0,5 g/dl; urea 0,5 g/dl;
KH₂PO₄ 0,5 g/dl; K₂HPO₄ 0,05 g/dl; sulfato de magnesio 0,05
g/dl y biotina 5 γ /dl.

10 Nota 2.- Condición de cultivo: 8 pl. de medio se
vierte en un tubo de ensayo en forma de L. Después de esterili-
zación se añade 1 ml. de agua (como área de control) o solu-
ción conteniendo antibióticos, teniendo una concentración de
10 veces la descrita en la tabla arriba indicada, a la que se
15 inocula 1 ml. de suspensión celular conteniendo 10⁶ células/
ml. El cultivo se realiza sacudiendo a una temperatura de 28^o
C.

Nota 3.- OD: medido a 660 m μ .

20 La condición media de composición y cultivo para
realizar el procedimiento según la presente patente son esen-
cialmente iguales a los de los demás métodos conocidos. Las
fuentes de carbono preferidas incluyen, por ejemplo, varios
hidratos de carbono y ácidos orgánicos, tales como glucosa,
sucrosa, hidrolizado del almidón, melaza y ácido acético, etc.
25 En particular el presente invento puede ser realizado vanta-
josamente usando melaza. Fuentes preferentes de nitrógeno in-
cluyen, por ejemplo, compuestos orgánicos e inorgánicos de ni-
trógeno, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, ace-
tato de amonio y urea, etc. Puede citarse como ejemplos de
30 fuentes inorgánicas preferidas las sales inorgánicas, tales

1 como fosfato de dihidrógeno de potasio, fosfato de monohidró-
geno de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso,
sulfato ferroso y carbonato de calcio, etc. Como nutrientes
orgánicos, pueden citarse nutrientes orgánicos naturales, ta-
5 les como vitamina, amino ácidos, bases de ácido nucléico, li-
cor base de maíz, extracto de carne, extracto de levadura, pec-
tona, hidrolizado de soja y un hidrolizado microbiano de cé-
lulas, etc., que pueden usarse con preferencia.

El cultivo se realiza en condiciones aeróbicas a
10 una temperatura de alrededor de 24-37°C con un pH de alrede-
dor de 5-8,5. Generalmente se prefiere añadir la fuente de car-
bono sobre el así llamado método de alimentación. La L-lisina
es acumulada en el medio de cultivo usualmente después de 2-5
días.

15 Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran
el objeto de la presente patente.

Ejemplo 1

20 20 ml. de un medio, teniendo una composición de
glucosa (4 g/dl), KH_2PO_4 (0,05 g/dl), K_2HPO_4 (0,15 g/dl) urea
(0,3 g/dl), sulfato de magnesio (0,05 g/dl) peptona (2 g/dl),
extracto de carne (0,5 g/dl) y biotina (5 μ /dl) se colocó en
un matraz Erlenmeyer de 250 ml. al que se inoculó *Corynebac-*
terium Glutamicum M-901-No. 2347-TA18 (ATCC 21513) que es una
25 raza mutante, resistente a la penicilina y se cultivó sacu-
diendo a una temperatura de 28°C durante 24 horas para preparar
un cultivo de simiente. La fermentación se realizó de tal ma-
nera que 10 ml. de un medio teniendo una composición de me-
lazas (15 g/dl) (como glucosa), sulfato de magnesio (0,03
30 g/dl), NH_2PO_4 (0,07 g/dl), urea (0,3 g/dl), hidrolizado ácido

1 de proteína de soya (2 g/dl) y carbonato de calcio (3 g/dl),
se colocó en un matraz de 250 cm³ de Erlenmeyer y se esterili-
zó, en que se inoculó 0,5 ml del arriba descrito cultivo de
simiente. El cultivo se realizó a una temperatura de 28°C du-
5 rante 110 horas sacudiendo con el uso de un agitador rotati-
vo. La cantidad de L-lisina en el licor de fermentación fue
de 53,2 mg/ml lo que corresponde a un rendimiento de 35,5% del
azúcar consumida. (La cantidad de L-lisina obtenida cuando se
realizó el cultivo usando la raza pariente *Corynebacterium*
10 *glutamicum* M-901-No. 2347 (ATCC 21253) de una manera similar
a la arriba descrita, fue de 43,9 mg/ml).

Ejemplos 2 y 3

El cultivo se realizó usando las razas mostradas
on la tabla 2 de una manera similar a la descrita en el ejem-
15 plo 1. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 2

| Ejemplo número | Raza usada | A (mg/ml) | B (porciento) |
|----------------|--|-----------|---------------|
| 20 2 | <i>Corynebacterium glutamicum</i> , M-901-No. 2347-TA26 (ATCC 21514). ¹ | 50.3 | 33.5 |
| 3 | <i>Corynebacterium glutamicum</i> , M-901-No. 2347-TA52 (ATCC 21516). ² | 49.2 | 32.8 |
| Control | <i>Corynebacterium glutamicum</i> , M-901-No. 2347-(ATCC 21253). | 43.3 | 28.9 |

25 1.- Raza mutante resistente a la penicilina.
2.- Raza mutante resistente a polimixina.
Nota.- A = cantidad si la L-lisina se produce en
caldo; B = rendimiento sobre azúcar.

30

1

Ejemplos 4 y 5

5

Las razas mostradas en la tabla 3 fueron cultivadas de una manera similar a la del ejemplo 1 usando melaza A, producidas en las Islas Filipinas, (azúcar-55,5%; ceniza-5, 12%) y melazas B producidas en las Islas Filipinas (azúcar-56,3%; ceniza-8,72%) como material de melaza, respectivamente para dar los resultados mostrados en la tabla 3.

Tabla 3

10

| Ejemplo No. | Raza usada | A | | B | |
|-------------|--|------|------|------|------|
| | | C | D | C | D |
| 4 | Corynebacterium glutamicum, M-901-No. 2347-TA26 (ATCC 21514). ¹ | 49.3 | 32.8 | 48.1 | 32.0 |
| 5 | Corynebacterium glutamicum, M-901-No. 2347-TA52 (ATCC 21516). ² | 47.8 | 31.8 | 45.6 | 30.4 |
| 15 | Control Corynebacterium glutamicum, M-901-No. 2347-(ATCC 21253). | 41.4 | 27.5 | 33.7 | 22.4 |

20

1. Raza mutante resistente a la penicilina.

2. Raza mutante resistente a polimixina.

Nota.- A = melazas A; B = melazas B; C = cantidad de L-lisina producida (mg/ml); D = rendimiento sobre azúcar (tanto por ciento).

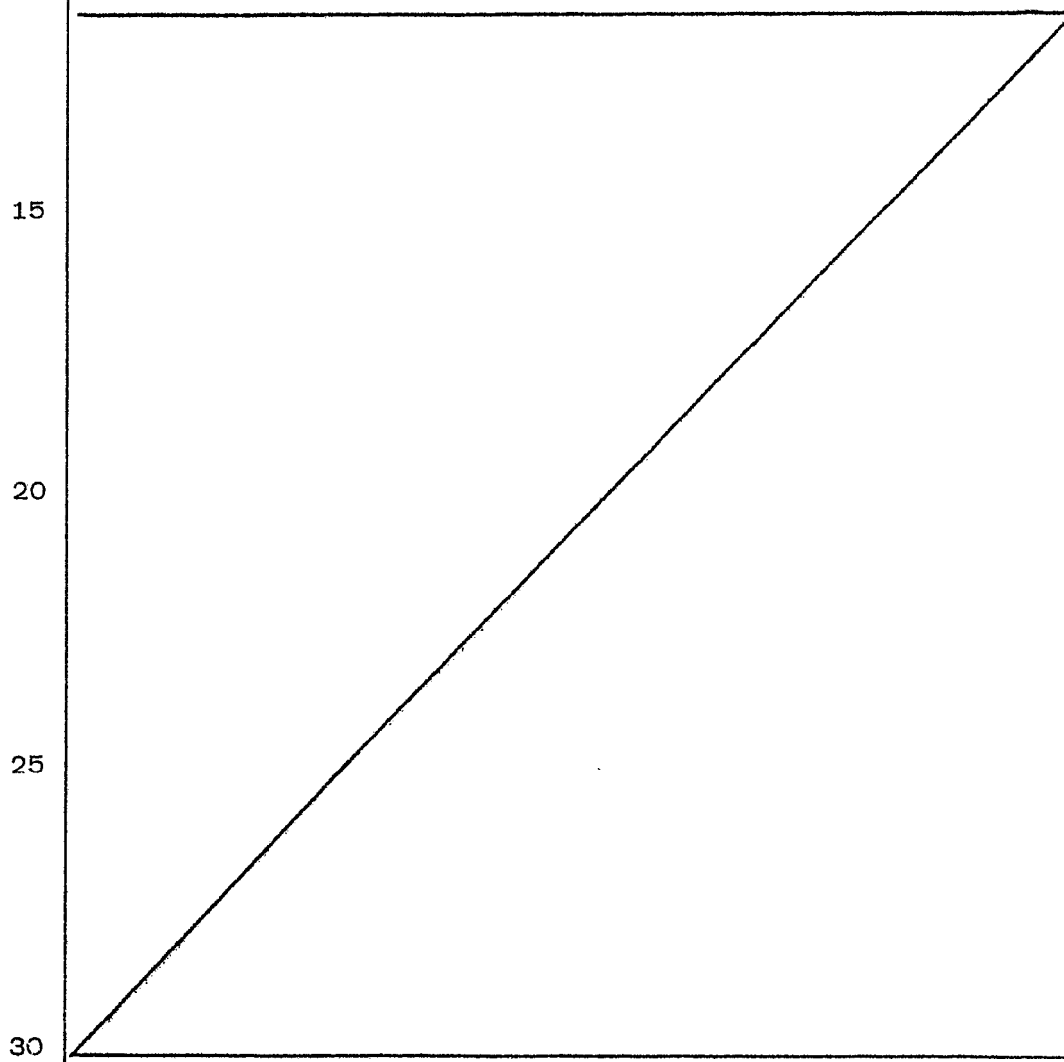
25

Ejemplo 6

10 ml. de un medio, teniendo una composición de glucosa (15 g/dl), sulfato de amonio (4,0 g/dl), KH_2PO_4 (0,1 g/dl), sulfato de magnesio (0,04 g/dl), sulfato ferroso (0,001 g/dl), sulfato de manganeso (0,6 mg/dl), biotina (300 /l.), hidrocloreuro de tiamina (200 /l), Mielki (0,2 g/dl), carbonato de calcio (5 g/dl), L-treolina (600 /ml) y DL-metionina

30

1 (200 γ /ml) se colocaron en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml
y se esterilizaron, a lo que se inoculó 0,5 ml. de un culti-
vo de simiente de *Brevibacterium flavum* ST-12 (ATCC 21128)
que es una raza mutante resistente a la penicilina. El culti-
5 vo se realizó a una temperatura de 28°C durante 110 horas sa-
cudiendo. la cantidad de L-lisina fue de 36,1 mg/ml y el ren-
dimiento de azúcar fue de 24,1%. (Cuando se usó la raza pa-
riente *Brevibacterium flavum* ST-12 (ATCC 21128) de una mane-
ra similar a la arriba descrita, se obtuvieron 30,5 mg/ml de
10 L-lisina, y el rendimiento sobre azúcar fue de 20,3%).



N O T A

La presente patente de introducción, comprende las siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento para producir L-lisina por fermentación, caracterizado porque comprende el cultivar una raza mutante productora de L-lisina derivada de una raza pariente seleccionada del grupo consistente en *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacterium flavum*, capaz de resistir a los antibióticos en un medio nutriente, separando y recuperando de ello la L-lisina acumulada.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la raza mutante es cultivada en presencia de un antibiótico seleccionado del grupo consistente en penicilina, bacitracina, cicloserina, gramicidina, polimixina y nistatina.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la raza mutante se selecciona del grupo consistente en *Corynebacterium* de las razas teniendo números ATCC 21513, 21514, 21515 y 21516 respectivamente.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la raza mutante seleccionada del grupo consistente en razas de *Brevibacterium* teniendo números ATCC 21517 y 21518, respectivamente.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la L-lisina es producida bajo las condiciones del cultivo aeróbico, a temperatura de 24-37° C y a un pH 5-8,5.

6.- Procedimiento según la reivindicación 1, ca-

1 racterizado porque la raza mutante es seleccionada cultivan-
do en un medio tamizador conteniendo 0,5-1.000 γ /ml. de anti-
biótico.

5 7.- "Procedimiento para producir L-lisina por fer-
mentación".

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

Madrid, a

10

20 MAY 1976

CARLOS TORRES
E. P.
M. P. de la Memoria

15

20

25

30