



**INPI**  
INSTITUTO  
NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL  
Assinado  
Digitalmente

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

## CARTA PATENTE Nº PI 0512761-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** PI 0512761-0

**(22) Data do Depósito:** 05/07/2005

**(43) Data da Publicação do Pedido:** 12/01/2006

**(51) Classificação Internacional:** C12P 13/08

**(30) Prioridade Unionista:** KR 10-2004-0051945 de 05/07/2004

**(54) Título:** MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE L-LISINA A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA

**(73) Titular:** CJ CHEILJEDANG CORP.. Endereço: CJ Bldg., 500, Namdaemunno 5-ga, Jung-gu, Seoul 100-802, REPÚBLICA DA CORÉIA(KR)

**(72) Inventor:** JAE-WON LEE; BYUNG-HAN LEE; HYUN-CHUL SHIN; DEUG-HOI KIM; YOUNG-SEUP HEO; HAI-CHANG SUH

**Prazo de Validade:** 10 (dez) anos contados a partir de 03/04/2018, observadas as condições legais

**Expedida em:** 03/04/2018

Assinado digitalmente por:

**Júlio César Castelo Branco Reis Moreira**  
Diretor de Patente

15 de Novembro

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

de 1889

“MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE L-LISINA A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA”

Campo da invenção

[0001] A presente invenção refere-se a um método para a fermentação de L-lisina usando *Corynebacterium glutamicum* como microorganismo para a fermentação e hidrolisado ácido de ração de soja como fonte de nitrogênio orgânico, caracterizado pelo fato de o pH do hidrolisado ácido de ração de soja ser ajustado a um nível predeterminado quando preparando o meio de cultura de maneira a melhorar a produtividade na fermentação da L-lisina.

Antecedentes da invenção

[0002] A L-lisina é uma espécie de amino ácido essencial e é usada como aditivo para rações animais, aditivo para alimentos e material farmacêutico. Particularmente, a L-lisina apresentou um mercado como aditivo de rações animais de uma quantidade de até cerca de 700.000 toneladas em 2004. Daí, entende-se que a L-lisina seja um produto biotecnológico em macro-escala. A L-lisina como aditivo para rações animais tem apresentado um aumento de demanda de 8~10% ao ano até a presente data. Ademais, uma vez que a China está experimentando um crescimento rápido na economia e a restrição crescente aos excrementos tornando-se cada vez mais rigorosa, espera-se que o mercado da L-lisina experimente uma expansão rápida. Daí, seria necessário melhorar o poder competitivo internacional dos produtos da L-lisina através de pesquisa e desenvolvimento técnicos de processos de fermentação e cepas usadas para tanto.

[0003] Atualmente, a L-lisina é produzida industrialmente através de um método de fermentação direta usando uma fonte

de carbono, uma fonte de nitrogênio, e minerais como materiais para um meio de cultura. Dentre os elementos constitutivos do meio de cultura, fontes de nitrogênio (por exemplo, extrato de levedura, peptona, licor de infusão de milho, e hidrolisado de ração de soja) têm sido estudadas intensamente para suas espécies e tratamento de maneira a reduzir custos. Adicionalmente, é conhecido que existe bastante espaço para aprimoramentos futuros de fontes de nitrogênio.

[0004] Por outro lado, a ração de soja é referida como sub-produto barato remanescente da recuperação de óleo de soja da soja. Tal ração de soja é usada em um meio de cultura após ser hidrolisada com uma protease ou um ácido tal como ácido clorídrico ou ácido sulfúrico. Existem dois tipos de processos para tal hidrólise ácida.

[0005] A patente coreana publicada nº 1996-0017840 divulga o uso de hidrolisados de ração de soja obtidos tratando a ração de soja com uma protease. Métodos para a hidrólise ácida de ração de soja também são conhecidos. Um exemplo de tais métodos inclui as etapas de: adicionar um ácido à ração de soja, submeter a mistura a uma reação a altas temperaturas de 110-120°C durante um longo tempo de 20-24 h; resfriar a mistura reagente; e prover o produto resultante como um material para um meio de cultura após a retirada por filtração dos sólidos.

[0006] O método mencionado acima para a hidrólise de ração de soja usando uma enzima é um processo relativamente estável. Entretanto, existe uma limitação significativa ao uso prático para a produção industrial da L-lisina. Por exemplo, a maioria das plantas de fermentação industrial usa

um esterilizador contínuo para esterilizar o meio de cultura e necessita de uma pluralidade de tubulações para realizar as etapas essenciais. Entretanto, o hidrolisado de ração de soja obtido através de uma enzima contém muitas espécies de peptídeos ou sólidos de proteínas não hidrolisados, que poderão conduzir à deposição de escamas, causando assim um problema sério.

[0007] Por outro lado, apesar de o método de hidrólise ácida acima exigir equipamentos resistentes a ácidos devido ao tratamento com ácido sulfúrico ou ácido clorídrico, ele assegura a estabilidade do processo em virtude da hidrólise completa da ração de soja. daí, uma parte das companhias produtoras de amino ácidos, incluindo a Ajinomoto Co. usa um tal hidrolisado ácido de ração de soja.

#### Problema técnico

[0008] Conseqüentemente, a presente invenção foi desenvolvida para solucionar os problemas acima mencionados ocorrentes na técnica anterior. É um objetivo da presente invenção prover um método para preparar L-lisina a partir de *Corynebacterium glutamicum* ou *E. coli* produzindo L-lisina e hidrolisado ácido de ração de soja de maneira a obter uma produtividade de fermentação mais alta.

[0009] Após termos estudado sobre as vantagens do hidrolisado ácido de ração de soja, descobrimos que é possível melhorar a produtividade de fermentação ajustando o pH do hidrolisado de ração de soja pré-formado até um nível predeterminado, quando o meio de cultura é preparado, de maneira tal que um microorganismo utilize os produtos de hidrólise de ração de soja, outros nutrientes e minerais de maneira mais eficiente. Esta é uma nova solução técnica que

jamais fora conhecida na técnica anterior.

#### Solução técnica

[0010] de acordo com um aspecto da presente invenção, é provido um método para melhorar a produtividade de fermentação de L-lisina pelo *Corynebacterium glutamicum* produzindo L-lisina e hidrolisado de ração de soja. De acordo com um outro aspecto da presente invenção, é provido um método para produzir L-lisina a partir de um produto cultivado obtido pelo método acima para aumentar a produtividade de fermentação.

[0011] Daqui por diante, características e vantagens da presente invenção serão explicadas em mais detalhe com referência aos seguintes exemplos.

#### Efeitos vantajosos

[0012] Conforme descrita acima, a presente invenção refere-se a um método para a fermentação de L-lisina usando hidrolisado ácido de ração de soja como fonte orgânica de nitrogênio. De acordo com a presente invenção, é possível aumentar o nível de fermentação e a produção em açúcar de L-lisina em pelo menos 8% e pelo menos 7%, respectivamente, ajustando o pH do hidrolisado de ração de soja a pH 2-4 quando preparando o meio de cultura, comparativamente com outros valores de pH.

#### Descrição dos desenhos

[0013] A figura 1 ilustra um processo para preparar hidrolisado ácido de ração de soja; e

[0014] A figura 2 é um gráfico mostrando o efeito do pH no hidrolisado de ração de soja na fermentação da L-lisina.

#### Melhor modo

EXEMPLO 1: Preparação de hidrolisado ácido de ração de soja

[0015] Uma solução de ração de soja com uma concentração de 10-20% (p/v) foi preparada dissolvendo ração de soja não gordurosa tendo um teor total de nitrogênio de 8% ou mais e um teor de proteína não purificada de 50% ou mais em água de processo a 40-50°C como solvente. A solução de ração de soja foi tratada com ácido sulfúrico ajustado para uma concentração final de 20-30%, e então a mistura foi adicionalmente tratada termicamente por aquecimento a 110-120°C durante 5-10 minutos. Em seguida, a solução de ração de soja termicamente tratada, tratada por ácido sulfúrico, foi resfriada até 50-60°C e filtrada com uma tela filtrante tendo um tamanho de malha 150~200. O filtrado resultante foi usado como material para meio de cultura no seguinte ensaio de fermentação (vide figura 1).

[0016] Aqui, a concentração de L-lisina foi medida por HPLC (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho), e a contagem de células no meio de cultura foi determinada por separação centrífuga a 3.000 rpm durante 15 minutos. Caso necessário, o número equivalente foi quantitativamente determinado pelo método de Bertrand.

#### Modo para a invenção

#### EXEMPLO 2: Comparação da produtividade de fermentação da L-lisina dependendo do pH do hidrolisado ácido de ração de soja

[0017] O hidrolisado ácido de ração de soja do exemplo 1 foi submetido a cultura de sementes (frasco) em uma incubadora vibradora com microorganismos produtores de L-lisina, que é uma cepa depositada pela requerente com número de acesso KFCC 11043, e foi submetida a cultura de sementes em um pequeno tanque de fermentação de 5 L. Em seguida, foi realizado um ensaio de fermentação em um tanque de

fermentação de 30 L. O ensaio seguinte foi realizado segundo uma maneira de batelada de alimentação, onde açúcar e aditivos adicionais foram adicionados durante a cultura.

1) Meio para cultura de sementes: componentes e condições (Frasco)

[0018] Açúcar 50 g/L, peptona 10 g/L, extrato de levedura 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L, uréia 5 g/L e biotina 50  $\mu\text{g/L}$  (pH 7 antes da esterilização) foram incubados a 220 rpm durante 20~25 horas a 30~32°C.

2) Meio para cultura de sementes: componentes e condições (Tanque de fermentação de 5 L)

[0019] Açúcar 70 g/L, extrato de levedura 5 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L, biotina 300  $\mu\text{g/L}$ , tiamina. HCl 1.000  $\mu\text{g/L}$ , amida de niacina 2.000  $\mu\text{g/L}$ , ácido pantotênico 500  $\mu\text{g/L}$ , e agente antiespumante 3 mL/L foram incubados a 30~32°C a um pH de 7,0~7,3 (ajustado com amônia gasosa) com uma velocidade de agitação de 450~600 rpm e uma taxa de aeração de 0,5~1 vvm (volume de ar/volume do meio/minuto) durante 20~25 horas.

3) Ensaio do meio de fermentação: componentes e condições (Tanque de fermentação de 30 L)

[0020] Açúcar 165 g/L, melaço (como açúcar redutor) 165 g/L, hidrolisado ácido de ração de soja 30 g/L (preparado com diferentes valores de pH com solução de NaOH),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  50 mg/L, biotina 300  $\mu\text{g/L}$ , tiamina. HCl 1.000  $\mu\text{g/L}$ , amida de niacina 2.000  $\mu\text{g/L}$ , ácido pantotênico 500  $\mu\text{g/L}$ , e agente antiespumante 3 mL/L foram incubados a 30~33°C a um pH de 7,0~7,3 (ajustado com amônia gasosa) com uma velocidade de agitação de 450~600 rpm e uma taxa de aeração

de 0,5~1 vvm.

[0021] O hidrolizado ácido de ração de soja foi preparado com diferentes valores de pH conforme mostrado na tabela 1 a seguir, e então usado como material para um meio de cultura sob as condições descritas acima.

[0022] Como resultado, quando o pH do hidrolizado de ração de soja foi ajustado para pH 2~4, foi possível aumentar o nível de fermentação e produzido em açúcar de L-lisina de pelo menos 8% e pelo menos 7%, respectivamente, conforme comparado com métodos convencionais realizados sob um pH ajustado e 7,0 ou outros valores (vide figura 2).

Tabela 1

Efeito do pH do hidrolizado ácido de ração de soja na fermentação

pH hidrolizado ácido de ração de soja	Nível de fermentação (g/L)	Rendimento de fermentação (%)	Tempo de fermentação (h)	Observações
0 (pH não ajustado)	155	47,0	65	O hidrolizado ácido foi preparado com diferentes valores de pH por solução de NaOH e então esterilizado
1,0	159	49,0	65	
2,0	168	52,0	62	
3,0	172	52,5	63	
4,0	169	52,0	64	
5,0	157	49,0	63	
7,0	155	46,5	65	

Aplicabilidade industrial

[0023] Conforme descrita acima, a presente invenção é muito útil para a indústria de alimentos, uma vez que ajustando o pH do hidrolizado ácido de ração de soja a pH 2~4 torna-se possível aumentar o nível de fermentação e rendimento em açúcar de L-lisina de pelo menos 8% e pelo menos 7%, respectivamente, conforme comparado com outros valores de pH.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de L-lisina a partir da fermentação de um meio de cultura, em um pH de 7,0~7,3 ajustado por amônia gasosa usando *Corynebacterium glutamicum* CJ31-0210 (KFCC11043) e hidrolisado ácido de ração de soja como fonte orgânica de nitrogênio, dito método sendo caracterizado pelo fato de ajustar o pH do hidrolisado ácido de ração de soja para um pH de 2~4 quando do preparo do meio de cultura seguido por esterilização.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o hidrolisado ácido da ração de soja ser preparado pela adição de ácido sulfúrico ajustado a uma concentração final de 20~30% (p/v) para a solução de ração de soja usando a água de processo a 40~50°C como solvente para a ração de soja não-gordurosa para uma concentração de 10-20% (p/v), seguido pelo aquecimento do hidrolisado ácido de ração de soja a 110~120°C por 5~10 minutos, e filtragem do hidrolisado ácido de ração de soja resfriada a 50~60°C.

1/2

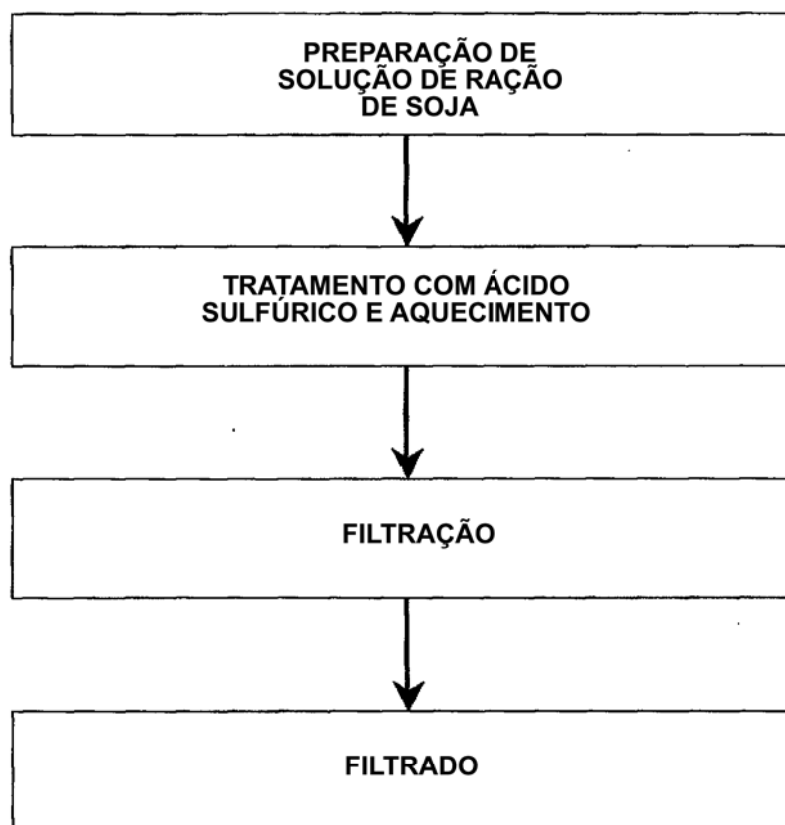


FIG.1

O EFEITO DO AJUSTE DE PH DO HIDROLISADO  
ÁCIDO DE RAÇÃO DE SOJA NA FERMENTAÇÃO DA L-LISINA

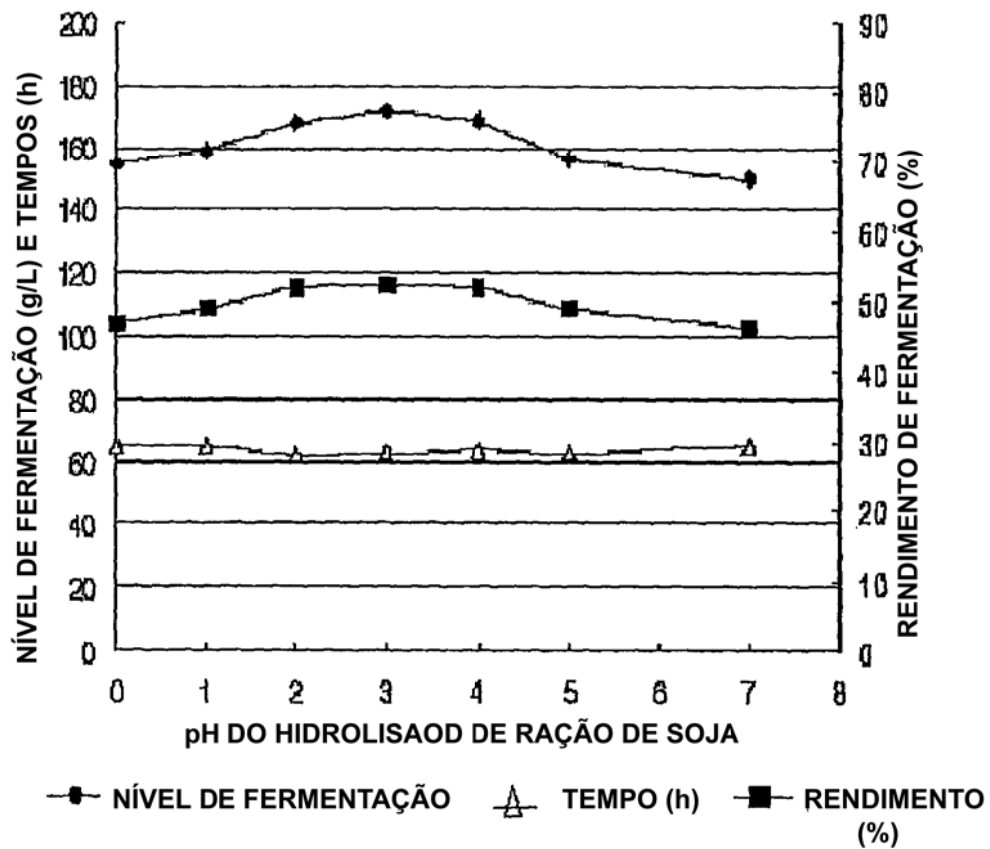


FIG.2