



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 N.º de publicación: **ES 2 073 357**

21 Número de solicitud: 9301641

51 Int. Cl.⁶: C12M 1/36

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **21.07.93**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.95**

Fecha de concesión: **29.01.96**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.96**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:
01.03.96

73 Titular/es: **Universidad de Sevilla
Vicerrectorado de Investigación
C/ San Fernando, 4
41004 Sevilla, ES**

72 Inventor/es: **Martín Force, Enrique y
Benítez Fernandez, Tahía**

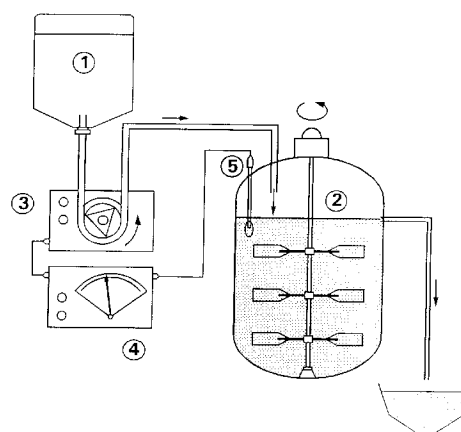
74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento para la selección de levaduras superproductoras de aminoácidos.**

57 Resumen:

Procedimiento para la selección de levaduras superproductoras de aminoácidos en cultivo continuo controlado por pH, aplicable en la industria alimentaria para producir biomasa con alto contenido en aminoácidos como suplemento nutricional animal y humano, caracterizado porque la entrada de medio desde el tanque de alimentación (1) hasta el tanque de cultivo (2) está regulada por una bomba peristáltica (3) conectada al pH-metro (4) que mide la acidez del medio de cultivo. El tanque de alimentación contiene altas concentraciones de un análogo tóxico del aminoácido que se desea superproducir. La entrada de medio fresco en el tanque de cultivo provoca el envenenamiento de la población de levaduras, excepto aquellas que superproduzcan el aminoácido en cuestión, que serán las que crezcan. Al crecer bajarán el pH provocando una nueva entrada de medio con mayores concentraciones del tóxico (y por lo tanto de producción de aminoácidos), hasta que se alcance la concentración máxima que las levaduras puedan tolerar.

Figura 1



ES 2 073 357 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Título

Procedimiento para la selección de levaduras superproductoras de aminoácidos.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la selección de levaduras superproductoras de determinados aminoácidos en cultivo continuo controlado por pH. El procedimiento se puede utilizar para la producción de biomasa, a partir de cepas industriales de levaduras, con elevado contenido en determinados aminoácidos, por ejemplo, aquéllos en los cuales son deficitarias las dietas de alimentación animal y/o humana, a modo de suplemento nutricional.

Estado de la técnica

La regulación de la biosíntesis de aminoácidos se ha estudiado utilizando análogos tóxicos para la selección de mutantes con alteraciones en la ruta de biosíntesis (Arfin y Gantt, 1983). Uno de los usos prácticos del empleo de análogos tóxicos es que los mutantes resistentes suelen ser superproductores del análogo natural (Alix, 1982). Se han aislado mutantes de levaduras en cultivos discontinuos que son resistentes al análogo tóxico hidroxinorvalina y producen entre 15 y 30 veces más treonina que la cepa silvestre (Ramos *et al.*, 1991). La mutación se asoció a la presencia de una de las enzimas en la ruta de biosíntesis de treonina, la aspartato kinasa, insensible a represión por treonina. Cuando el gen que codifica esta enzima se introdujo en una cepa silvestre, por ingeniería genética, los transformantes producían entre 3 y 4 veces más treonina que la cepa silvestre (Martín-Rendon *et al.* 1993).

Sin embargo, debido a numerosos efectos inespecíficos producidos por el análogo tóxico, la mayoría de los mutantes y transformantes resistentes al tóxico aislados crecen peor que la cepa silvestre y expresan muchos efectos negativos: baja viabilidad, sensibilidad a temperatura, etc. (Ramos *et al.*, 1991; Martín-Rendon *et al.*, 1993). La selección de mutantes capaces de resistir las mayores concentraciones de análogos tóxicos, superproduciendo las mayores concentraciones de aminoácidos posibles, acumulando numerosas mutaciones y al mismo tiempo creciendo a velocidades similares e incluso mayores que las del tipo silvestre es extremadamente difícil. El aislamiento de tales mutantes requiere necesariamente técnicas de selección en cultivo continuo y durante periodos muy largos, para que el organismo acumule aquellas mutaciones que le permitan simultáneamente superproducir aminoácidos y crecer a la máxima velocidad.

Descripción de la invención

El nuevo procedimiento se basa, fundamentalmente, en la utilización de un quimiostato como turbidostato controlado por pH para la selección de cepas de levaduras superproductoras de aminoácidos, y en general para seleccionar cepas cuya velocidad de formación de producto sea máxima, siendo los productos función de la velocidad de crecimiento, y siempre que exista un análogo tóxico que permita seleccionar sólo aquella fracción de la población que no se envenena por superproducción del correspondiente

compuesto fisiológico.

En el quimiostato convencional existe un tanque de alimentación con medio nutritivo que, a través de una bomba peristáltica regulada por el investigador, pasará al correspondiente tanque de cultivo. Simultáneamente y de forma continuada, por gravedad irán pasando medio de cultivo y células a un tercer tanque de desecho.

Cuando la entrada de nutrientes es muy lenta o cuando está presente algún compuesto tóxico, las células del cultivo crecen muy lentamente, bien porque agotan rápidamente los nutrientes, de modo que el crecimiento es muy lento (ya que la velocidad a la que las células crecen y se dividen está limitada por la falta de nutrientes), o bien porque una fracción importante de la población está muriendo debido a la presencia del compuesto tóxico. Si la velocidad de formación de un producto depende de la tasa de crecimiento, dicho producto, por ejemplo aminoácidos, se formará muy lentamente, ya sea porque toda la población viva ve frenado su crecimiento por el nutriente limitante, o porque la presencia del tóxico hace que sólo una fracción pequeña de la población, la que resiste al tóxico por superproducción del análogo fisiológico, esté produciendo el compuesto de interés. En casos límites esta producción puede ser cero.

El quimiostato tradicional tiene un pH-metro que regula el pH del medio con dos bombas peristálticas que añaden sosa o ácido cuando el pH está por debajo o por encima de ciertos límites marcados por el investigador. La regulación del pH se hace necesaria porque las levaduras, al crecer, tienden a acidificar el medio, y una acidez excesiva podría hacer que el cultivo dejara de crecer aún conteniendo nutrientes en exceso.

Esta acidificación del medio, por otra parte, puede ser aprovechada para la selección de levaduras superproductoras de aminoácidos. El tanque de alimentación (1) que aporta los nutrientes está suplementado con dosis altísimas de un análogo tóxico del aminoácido que interesa superproducir. La llegada de nutrientes desde el tanque de alimentación hasta el medio de cultivo (2) donde se encuentran las levaduras se hace a través de una bomba peristáltica (3) conectada al pH-metro (4), de manera que no funciona automáticamente de forma continua sino que se conecta y desconecta selectivamente, dependiendo del pH del medio donde están creciendo las levaduras y que es medido por el pH-metro a través de una sonda (5). La medida del pH-metro a su vez depende de si las células están o no creciendo. La velocidad de entrada de nutrientes, y por lo tanto del tóxico, viene regulada por la velocidad de crecimiento de las células. Si, por ejemplo, se regula la bomba de manera que se conecta a pH por debajo de 5 y se desconecta a pH superior a 5.2, si las células están creciendo acidificarán el medio a una velocidad proporcional a la velocidad de crecimiento. Supongamos que hay entrada de medio de manera que el pH del cultivo sube por encima de 5.2: la bomba entonces se desconecta y deja de entrar medio. La entrada de medio con tóxico matará a la mayoría de la población, y la fracción de células que sobrevivan por superproducción del aminoácido fisiológico será la que crecerá aunque

tardarán en bajar el pH.

Cuando el pH baje por debajo de 5, la bomba volverá a conectarse y a añadir medio, aumentando la concentración del tóxico en el tanque de cultivo donde se encuentran las células. Este incremento conducirá a un aumento de la tasa de muerte, excepto en aquellas células que superproduzcan suficiente cantidad del aminoácido fisiológico como para contrarrestar el efecto del tóxico. Nuevos ciclos de crecimiento y acidificación irán aumentando progresivamente la concentración del tóxico en el tanque de cultivo y seleccionando aquellas células que más aminoácido produzcan, hasta alcanzar la máxima superproducción posible para el aminoácido en cuestión.

Las ventajas de este procedimiento son las siguientes:

1. Permiten obtener superproductores de un aminoácido en particular, en función del análogo tóxico que se utilice.
2. La velocidad de entrada del tóxico viene regulada por la propia velocidad de crecimiento del cultivo, al estar regulada dicha entrada por la velocidad de acidificación.
3. Al mismo tiempo, la concentración del tóxico permite la selección de sólo aquella fracción de la población resistente por superproducción del aminoácido fisiológico.
4. A lo largo del tiempo, el aumento de la concentración del tóxico permite el aislamiento de cepas cada vez más superproductoras.
5. Al autorregularse la entrada de medio por la capacidad de crecer de las células, el proceso permite aislar las cepas capaces de máxima superproducción, creciendo además a la máxima velocidad.

Caso práctico: obtención de cepas de levaduras superproductoras de metionina y treonina

Como caso práctico de utilidad del procedimiento, que debe entenderse no tiene carácter limitativo de la invención, se describe la aplicación del quimiostato controlado por pH y los análogos tóxicos presentes en el tanque de alimentación para el aislamiento de cepas superproductoras de metionina y treonina.

Un cultivo continuo controlado por pH se utilizó para seleccionar aquellas levaduras que eran más tolerantes a etionina, análogo tóxico

de la metionina, y a hidroxinorvalina, análogo tóxico de la treonina. Estas levaduras tolerantes eran superproductoras de los correspondientes aminoácidos metionina y treonina. El tanque de alimentación se llenó con medio mínimo de levaduras (SD) y prolina como fuente de nitrógeno, y se suplementó con etionina hasta 10 mM, o con hidroxinorvalina hasta 5mM. El tanque de cultivo se inoculó en ambos casos con 15 ml de un cultivo en fase estacionaria ($5 \cdot 10^8$ células/ml) de una cepa industrial de levadura, utilizable para suplemento nutricional animal y humano. Al crecer, las células acidificaron el medio, provocando la conexión de la bomba peristáltica al bajar el pH y dando lugar al paso de medio desde el tanque de alimentación al de cultivo. Cada vez que esta operación se repetía y pasaba medio, aumentaba la concentración del tóxico etionina o hidroxinorvalina en el tanque de cultivo. La velocidad de entrada del medio venía controlada por la velocidad de acidificación del cultivo, que a su vez dependía de la capacidad de resistencia de las células al análogo tóxico del medio, es decir, de la capacidad de superproducir el aminoácido fisiológico. Aquellas células poco resistentes al análogo tóxico, no superproductoras e incapaces de crecer, van quedando eliminadas del medio de cultivo, mientras que las más resistentes y superproductoras crecen más rápidamente, y van enriqueciendo el cultivo. A lo largo de todo el procedimiento, el medio de cultivo varía desde no tener análogo tóxico, etionina o hidroxinorvalina, hasta tener la concentración máxima que las cepas más resistentes son capaces de tolerar, puesto que mientras haya células capaces de crecer habrá acidificación y, por lo tanto, entrada de medio con análogo tóxico. Cuando las células más resistentes ya no crecen y consecuentemente no acidifican, no hay más entrada de medio porque la bomba no se conecta, con lo que se ha conseguido seleccionar, de entre una gran población de levaduras, aquellas células más resistentes a los análogos tóxicos, que crecen más rápidamente y superproducen aminoácidos.

Por este procedimiento se han seleccionado dos cepas, una denominada S. C MBI, y otra denominada S.C. MB2, capaces de producir 160 veces más metionina y 40 veces más treonina, respectivamente, que la cepa de partida. Estas cepas han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo, estando el Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla en posesión de los correspondientes certificados de viabilidad.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la selección de levaduras superproductoras de aminoácidos en cultivo continuo controlado por pH, aplicable para la producción de biomasa con alto contenido en aminoácidos como suplemento nutricional animal y humano, **caracterizado** porque la entrada de medio desde el tanque de alimentación hasta el tanque de cultivo está regulada por una bomba peristáltica conectada al pH-metro que mide la acidez del medio de cultivo. El tanque de alimentación contiene altas concentraciones de un análogo tóxico del aminoácido que se desea superproducir, de forma que la entrada de medio fresco en el tanque de cultivo provoca el envenenamiento de la población de células, excepto aquéllas que produzcan el aminoácido en cuestión, que serán

las que crezcan, lo cual provocará una acidificación del medio, bajada de pH, puesta en funcionamiento de la bomba peristáltica y nueva entrada de medio con tóxico, y así sucesivamente, hasta que se alcance la concentración máxima que las levaduras puedan tolerar.

2. Procedimiento para la selección de levaduras, según reivindicación 1^a, que permite obtener cepas superproductoras de un aminoácido en particular, en función del análogo tóxico que se utilice.

3. Procedimiento para la selección de levaduras, según reivindicaciones 1^a y 2^a, en el que la velocidad de entrada del tóxico viene regulada por la propia velocidad de crecimiento del cultivo, lo cual permite aislar aquellas cepas que, además de ser capaces de la máxima superproducción, lo hacen creciendo a la máxima velocidad.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

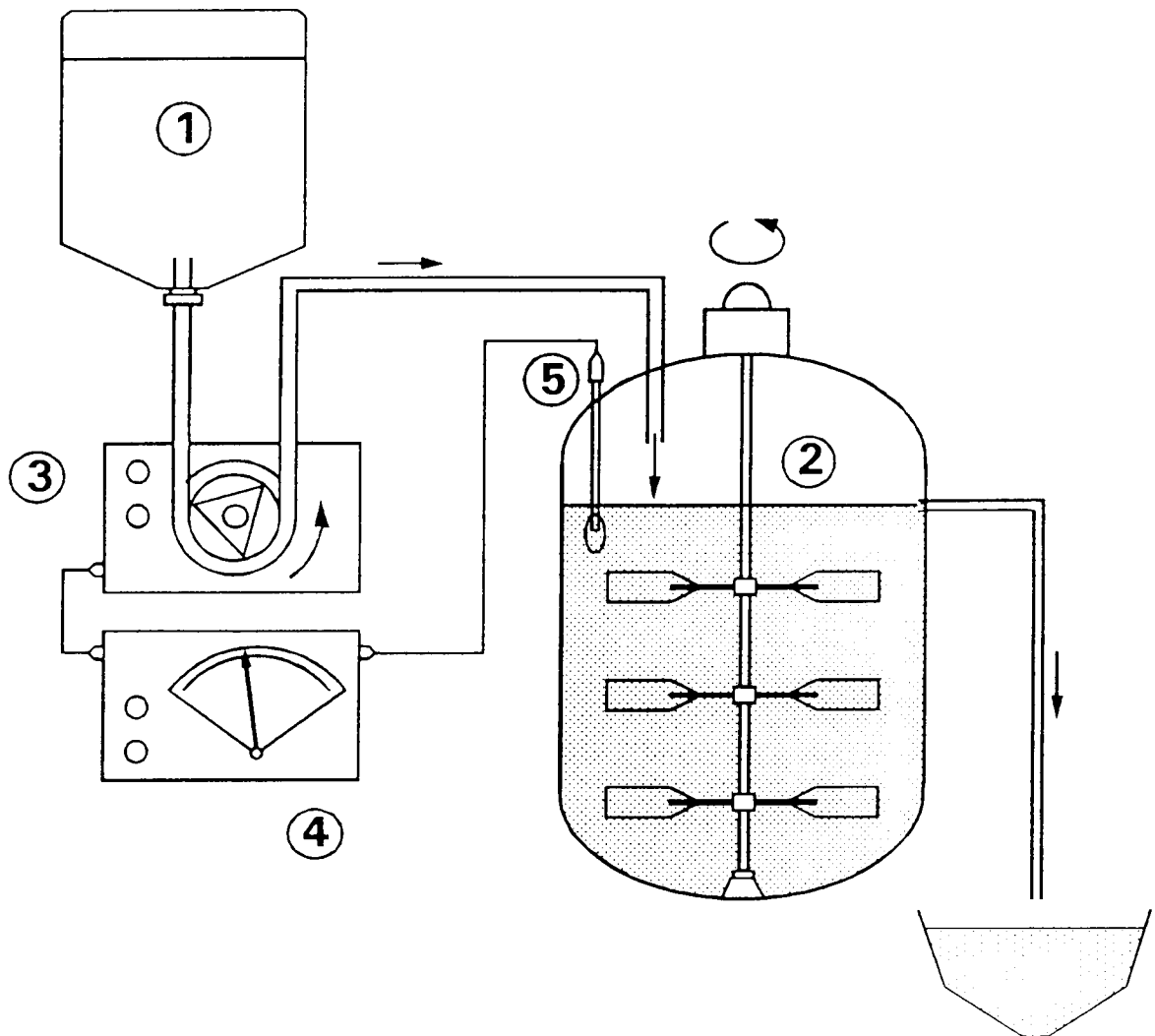
50

55

60

65

Figura 1





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 073 357
⑫ N.º solicitud: 9301641
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 21.07.93
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12M 1/36

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP-0065895-A (L'AIR LIQUIDE, SOCIETE ANONYME POUR L'ETUDE ET L'EXPLOITATION DES PROCEDES GEORGES CLAUDE) 01.12.82	
A	US-3472765-A (WILLIAM E. BUDD et al.) 14.10.69	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
23.06.95

Examinador
M. Ybarra Fernández

Página
1/1