

232870

- 7 ENE 1951

232870

P - 15.350

Pos- 44



MEMORIA DESCRIPTIVA
para solicitar
PATENTE DE INVENCION
en
ESPAÑA
por VEINTE años

a nombre de KYOMA HAKKO KOGYO KABUSHIKI KAISHA, entidad japonesa, establecida en 9, Yurakucho-1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, por:

"UN METODO DE PRODUCCION DE ACIDO L-GLUTAMICO"

Este invento se refiere a un metodo de produccion de ácido l-glutámico por fermentación. Particularmente se refiere a un método de producción y acumulación de ácido l-glutámico en una cantidad considerable mediante cultivo de una nueva cepa de Micrococcus en un medio de cultivo en condiciones apropiadas de fermentación.

Es bien sabido que los microorganismos pueden producir en un medio apropiado diversas clases de ami-



noácidos. Sin embargo, la cantidad producida ha sido extremadamente pequeña y nunca se ha descrito que ningún tipo particularmente de aminoácido se acumule en una gran cantidad en el medio, mediante procesos de fermentación.

5 La razón de la enorme dificultad de acumulación de cualquier aminoácido en un medio de fermentación se ha atribuido al hecho de que los aminoácidos son los componentes de las proteínas y cualquier aminoácido que se produzca en un medio es apto para ser resintetizado fácilmente a proteínas, polipéptidos o similares o es capaz de
10 convertirse o descomponerse en otras sustancias por diversas reacciones bioquímicas. En otras palabras, un aminoácido puede acumularse difícilmente en un medio de cultivo en la forma de estado monómero. La palabra "estado monómero" se utiliza en la presente solicitud significando estado monomolecular,
15 independientemente de que pueda ser un ácido libre o una sal.

 Este es el motivo por el que nunca se ha propuesto hasta ahora un proceso de fermentación, un empleo directo de las actividades bioquímicas de una población viviente de microorganismos, para la biosíntesis y acumulación de
20 ácido l-glutámico. La conocida biosíntesis se efectúa en algún sistema enzimático, esto es, un tipo particular de enzima se extrae de los microorganismos, o de algunos tejidos animales o vegetales y la enzima se hace reaccionar con sustratos
25 adecuados, por ejemplo, ácido α -cetoglutárico y compuestos amónicos, en condiciones de reacción muy limitadas.

232870



7 ENL

Uno de los objetos del presente invento es proporcionar un método para producir directamente una cantidad considerable de ácido l-glutámico mediante cultivo de un determinado microorganismo en un medio líquido.

5 Otro objeto más del presente invento es proporcionar un método para acumular una gran cantidad de aminoácido, particularmente ácido l-glutámico, en forma de estado monómero mediante cultivo de un determinado microorganismo en un medio líquido.

10 Otro objeto más del presente invento es proporcionar un método para reducir al mínimo cualquier tipo de reacciones secundarias como la polimerización o descomposición de ácido l-glutámico que tendrían lugar durante el cultivo de un determinado microorganismo en un medio líquido.

15 Todavía un objeto más del presente invento es proporcionar un método de acumular ácido l-glutámico en un medio líquido en forma de estado monómero, es decir, en forma fácilmente recuperable.

20 De acuerdo con el presente invento, se cultiva una nueva cepa de Micrococcus en un medio apropiado, en condiciones de fermentación adecuadas, y se acumula en el medio una cantidad considerable de ácido l-glutámico.

25 Hemos descubierto que un microorganismo que satisfaga dos exigencias bioquímicamente específicas, esto es, (1) que tenga capacidad de producir ácido -cetoglutárico a partir de materias azucaradas y (2) que tenga una potente actividad de dehidrogenasa del ácido l-glutámico, par-



tioularmente una fuerte actividad hacia la reacción inversa de la reacción enzimática reversible anterior, es decir, la aminación reductora de ácido α -cetoglutarico, es apropiado para la producción directa de una cantidad considerable de ácido l-glutámico mediante un proceso de fermentación.

El rasgo característico del presente invento se halla en la producción y acumulación de ácido l-glutámico en el medio de cultivo mediante las actividades bioquímicas antes indicadas durante el desarrollo y multiplicación de la cepa. Así es evidente la diferencia esencial del presente invento de la producción enzimática descrita en la que se sintetiza ácido l-glutámico mediante la reacción de una enzima extraída y con sustratos específicos.

Los inventores del presente invento han encontrado una nueva cepa que pertenece al género *Micrococcus* y la cepa se designará como *Micrococcus* Nº 534. Las características generales de la cepa se describirán como sigue. La mayor parte de los ensayos se efectuaron de acuerdo con el "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" (Society of American Bacteriologists, novena edición).

A. Observaciones morfológicas:

I. Observaciones microscópicas:

(Agar nutritivo, 37° C., 18 horas)

1. Forma: micrococos, existen aisladamente, en parejas o masas irregulares, esféricas o ligeramente elipsoidales. Tamaño de la mayor parte: 0,6 - 1,2 micras.

232870



2. Movilidad: ninguna
3. Esporas: ninguna
4. Mancha de Gram: positiva

II. Raya en agar

- 5 (Agar nutritivo, 37° C., 18 horas)
1. Desarrollo: moderado
 2. Forma del desarrollo: filiforme
 3. Brillo: mate
 4. Cromogénesis: blanco lechoso a blanco debilmente amarillento.
- 10
5. Olor: ausente
 6. Consistencia: mantecosa o debilmente viscosa.
 7. Color del medio: inalterado.

III. Colonias del agar:

- 15 (agar nutritivo, 37° C., 20 horas)
1. Forma: circular
 2. Superficie: lisa
 3. Borde: entero
 4. Elevación: ligeramente levantado
- 20
5. Carácter óptico: opaco

IV. Barra de agar

- (Agar nutritivo, 37° C., 20 horas)
1. Desarrollo: óptimo en la cabeza.

V. Caldo nutritivo:

- 25 (Caldo nutritivo, 37° C., 18 horas)
1. Desarrollo superficial: circular
 2. Oscuramiento: débil

232870



3. Olor: ausente

4. Sedimento: floculento, escaso

B. Propiedades fisiológicas

- 5
1. Temperatura de desarrollo: no hay desarrollo por encima de 47° C, desarrollo débil hacia 42° C, buen desarrollo entre 27-37° C, óptimo hacia 30° C.
- 10
2. Oxígeno: estrictamente aerobio
3. Reducción de nitrato: intensa
4. Producción de indol: ausente
5. Sulfuro de hidrógeno: no se produce
- 15
6. Reducción de indicador: se reducen el azul de metileno, 2,6-diclorofenolindofenol, verde y anuse, cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.
7. Licuación de gelatina: negativa o muy débil
8. Digestión de caseína: débil
9. Reacción de Voges-Proskauer: negativa
- 20
10. Reacción con rojo de metilo: ácida débil
11. Utilización de ácido cítrico: negativa
12. Licuación de almidón: ninguna
13. Leche: no cambia o débilmente alcalina
14. Catalasa: muy débil
- 25
15. Ureasa: fuerte
16. Actividad de dehidrogenasas de ácido glutámico: muy fuerte.

232870



17. Producción de ácido: Se forman ácido α -cetoglutárico, ácido láctico. Otros ácidos orgánicos, trazas

18. Fermentación de azúcar:

		Acido	gas
5	arabinosa	±	-
	xilosa	±	-
	glucosa	+	-
	fructosa	+	-
10	galactosa	±	-
	mannosa	+	-
	lactosa	-	-
	dextrina	-	-
	glicerol	-	-
15	sacarosa	+	-
	maltosa	+	-
	trehalosa	-	-
	rafinosa	-	-
	melicitosa	-	-
20	almidon	-	-
	mannita	-	-
	sorbita	-	-
	salicina	-	-
	inulina	-	-
25	glicógeno	-	-

A la vista de las propiedades y observaciones anteriores, los inventores admitieron que la presente

232870



cepa pertenecía a una nueva especie del género de Micrococcus, puesto que no había nada que pudiera identificarse con ninguna del manual de Bergey.

Procedimientos de fermentación:

5 La composición del medio puede ser cualquiera de las conocidas adecuadas para el desarrollo del Micrococcus. Como fuente de carbono puede utilizarse cualquiera de los azúcares fermentables que se aclaran con la tabla
10 anteriormente indicada. En cuanto a las fuentes de nitrógeno y otros nutrientes no existen limitaciones específicas igualmente que con la fuente de carbono. Para obtener un potente metabolismo de hidratos de carbono del cultivo, deben añadirse al medio de cultivo varios tipos de materiales nitrogenados orgánicos o inorgánicos y diversos productos
15 minerales necesarios por el organismo. El cultivo se inocula y se multiplica en condiciones aerobias a 27-30° C. Como durante el curso de la fermentación los ácidos orgánicos tienden a acumularse y vuelven el medio ácido, se ha descubierto que la producción de ácido l-glutámico se afecta
20 considerablemente por el valor del pH del medio durante el curso de la fermentación. La producción de ácido l-glutámico se efectúa favorablemente cuando el valor del pH se controla entre 6,0 y 9,0, y el valor óptimo del pH parece estar desde unos 7,0 a unos 8,5. De acuerdo con el presente
25 invento, el valor del pH se ajusta y mantiene en el intervalo de 6,5 a 8,5 por adición de un compuesto que contenga un radical nitrogenado básico. Así, por la acción catalítica de fuerte aminación reductora de la dehidrogenasa del



ácido l-glutámico contenida en la cepa, el ácido α -cetoglu-
támico producido se hace reaccionar con el ion amonio deri-
vado del radical nitrogenado básico añadido y se da lugar
a la formación de ácido l-glutámico. Debido a la fuerte ac-
5 tividad de aminación reductora de la dehidrogenasa de ácido
l-glutámico de la presente cepa, y manteniendo el valor del
pH en el intervalo óptimo, se reducen al mínimo las diver-
sas reacciones secundarias desfavorables. De este modo, la
reacción de formación de ácido l-glutámico supera a las reac-
10 ciones secundarias y da lugar a la acumulación de ácido l-glu-
támico en una gran cantidad.

Para la neutralización del medio de cultivo
son utilizables diversos procedimientos. En cualquier caso,
debe suministrarse al medio una cantidad indispensable de
15 ion amonio. El empleo combinado de sales amónicas y alcalis
se halla también dentro de los límites del presente invento.
Por lo menos es esencial para el presente invento que las
condiciones de cultivo no se hallen muy alejadas de los lí-
mites apropiados para el desarrollo de la presente cepa. Co-
20 mo comprenderá fácilmente cualquier práctico en la materia,
también se halla dentro de los límites del presente invento
el empleo de mutantes de la presente cepa.

El ácido l-glutámico o su sal acumulada en el
medio se recuperan mediante un método conocido apropiado, co-
25 mo el método de resinas cambiadoras de ion, no siendo tal
procedimiento, por sí mismo, una parte importante del presen-
te invento.

932870



El presente invento se aclarará mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1. Fermentación de un cultivo con agitación mediante un medio sintético.

5 El Micrococcus N^o 534 se cultivó durante 24 horas en caldo de glucosa mediante un cultivo con agitación a 28^o C. y se utilizó como medio de inoculación. 30 ml de medio de fermentación se dispusieron en un matraz de 250 ml, se inocularon con el medio de inoculación anterior y se agitaron mediante un agitador rotatorio de 220 r.p.m. La composición del medio de fermentación fué la siguiente: glucosa 10 50 gr., urea 8 gr., K₂HPO₄ 0,5 gr., MgSO₄·7H₂O 0,1 gr. y FeCl₃·6H₂O 5 mg por litro.

Los resultados analíticos se dan en la tabla 1.

15

T A B L A I

Temperatura de cultivo ° C	Duración del cultivo días	pH	Glucosa residual gr/100 ml	ácido l-glutámico mg/100 ml	Rendimiento referido a la glucosa consumida %	
20	33	1	8,6	2,8	660	30,0
		2	7,3	1,9	700	22,0
		2	8,2	2,3	610	22,6
	28	3	6,8	1,2	810	21,3
		4	8,7	0,2	1130	23,5

232870



Ejemplo 2. Fermentación de un cultivo con agitación mediante un medio complejo.

El medio de inoculación y los procedimientos fueron los mismos que en el ejemplo 1. El medio de fermentación fué el siguiente: glucosa 100 gr., extracto de carne 5 gr., amina NZ 5 gr., urea 15 gr, K_2HPO_4 1 gr., y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 gr. por litro. Temperatura a 28° C.

Los resultados analíticos se dan en la tabla 2

T A B L A 2

10 Duración del cultivo días	pH	Azúcar residual gr/100 ml	ácido l-glutámico mg/100 ml	Rendimiento referido al azúcar consumido %
1	8,4	7,2	370	13,6
2	8,2	5,5	1280	28,4
15 3	7,3	3,5	1960	30,1
4	6,2	2,9	2480	35,2

Los ejemplos anteriores son solamente aclaratorios y, en lugar de los materiales nutricios del medio de fermentación mencionado en el ejemplo 2, son también utilizables otros varios materiales azucarados y otras fuentes nitrogenadas inorgánicas u orgánicas, por ejemplo, amoníaco, sales amónicas como por ejemplo cloruro amónico, sulfato amónico, carbonato amónico, acetato amónico y similares, peptona, harina de soja, digerida, harina de pescado, digerida, hidrolizados de caseína y líquidos de maceración de maíz.

232870



Como es evidente de las descripciones anteriores, en un medio sintético, así como en un medio orgánico, una cantidad tan elevada como 20-30% de azúcar consumido puede convertirse en ácido l-glutámico.

5

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en el Japón el día 17 de Mayo de 1956, bajo el número 12979/56, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto-Ley sobre Propiedad Industrial.

=000= N O T A =000=

10

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

15

1º. - Un método de producción de ácido l-glutámico que comprende el cultivo de una nueva cepa de *Micrococcus* N^o 534 antes definida en un medio de cultivo que contenga fuentes de carbono fermentables, fuentes de nitrógeno y materias inorgánicas, en condiciones aerobias y controlando el valor del ph del medio de cultivo en el intervalo de 6 a 9 por adición de agentes neutralizantes, con lo cual se

20

232870



acumula en el medio de cultivo una cantidad sustancial de ácido l-glutámico y la sal del mismo.

5 2º. - El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fuente carbonada del medio de cultivo comprende por lo menos uno de los hidratos de carbono elegidos del grupo que consta de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, xilosa, y almidón hidrolizado.

10 3º. - El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las fuentes de nitrógeno del medio de cultivo comprenden por lo menos una de las fuentes de nitrógeno elegidas del grupo que consta de urea, amoníaco, sales amónicas, peptona, líquido de maceración de maíz, caseína hidrolizada, harina de pescado digerida, extracto de carne y harina de soja digerida.

15 4º. - El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente neutralizante es amoníaco.

5º. - El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente neutralizante es urea.

20 6º. - El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente neutralizante es por lo menos uno de los compuestos elegidos de entre los compuestos que contienen radicales nitrogenados básicos.

25 7º. - El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los agentes neutralizantes son álcalis cáusticos.

8º. - El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el organismo utilizado es cualquier mutante de Micrococcus Nº 534.

232870 -7ENE



9º. - Un método de producción de ácido l-glu-
támico.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que
antecede y para los fines que se han especificado.

5

Esta Memoria consta de catorce hojas escri-
tas a máquina por una sola cara.

Madrid, 7 ENE 1957

P. A.

Alberto de Ezaburu
Por Poder