

AÑO .....

Expediente núm. .....

237657

237657



# REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

**PATENTE DE** ..... **INVENCION** .....

## MEMORIA DESCRIPTIVA

*que se acompaña a la solicitud de*

una **PATENTE DE** ..... **INVENCION** ..... por ..... 20 ..... años, en España

a favor de AJINOMOTO CO. INC. Y SANRAKU DISTILLERS, CO. INC.

....., de nacionalidad  
japonesas (ambas) ..... domiciliado en TOKYO ( Japón ) .....  
calle de 7, 1-chome, Takara-cho, Chuo-ku ..... núm. ....

*por:*

« "Procedimiento para obtener productos sazonadores, partiendo de  
sacaridos".  
.....  
.....

Nº 3362

Agente Sr. ..... BOLIBAR .....

237 657



JE.

237 657

P A T E N T E   D E   I N V E N C I O N

=====

a favor de

AJINOMOTO CO. INC. y SANRAKU DISTILLERS CO., INC., de nacionalidad japonesa, domiciliadas ambas en N° 7, 1-chome, Takara-cho, Chuo-ku, TOKYO (Japon),

por:

"Procedimiento para obtener productos sazonadores, partiendo de sacaridos".

=====

M e m o r i a   d e s c r i p t i v a .

El presente invento se refiere a un procedimiento bioquímico para la preparación de productos sazonadores, partiendo de sacaridos o materias azucaradas. Este procedimiento comprende las siguientes operaciones: Preparar un medio de cultivo añadiendo a los sacaridos o materias azu-



caradas, un material nitrogenado elegido del grupo que comprende sales amónicas, amoniaco, urea, aminoácidos, nitratos y nitritos, en cantidad superior a la necesaria para el crecimiento de microorganismos como nutrición; inocular uno  
5 o varios microorganismos elegidos entre los dotados de gran capacidad de producción de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, como Pseudomonas, Lactobacillus, Acetobacter, Aerobacter, Escherichia, Serratia, Saccharomyces, Aspergillus y B. subtilis; cultivar tales microorganismos en condiciones aeróbicas o anaeróbicas  
10 a temperaturas de 10° a 50°C, a fin de producir ácido  $\alpha$ -cetoglutárico por la acción fisiológica de dichos microorganismos y de aminorar al mismo tiempo el material por la acción de las enzimas producidas por los microorganismos; formar aminoácidos por el consumo gradual de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico  
15 al asimilar el contenido en nitrógeno, y separar ácido glutámico después de concentrar el medio, o por métodos corrientes, a fin de obtener material sazonador. El objeto de este invento es producir un material sazonador bioquímico compuesto en gran proporción, de ácido L-glutámico, efectuando la  
20 producción de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico y de aminoácido en un solo proceso continuo.

Ya es sabido que es posible producir  $\alpha$ -cetoácidos tales como ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido oxalacético y ácido piroglucónico, como productos intermedios o finales en el  
25 metabolismo del azúcar, por la función de diversos microorganismos, particularmente Pseudomonas, Aerobacter, B. subtilis, Serratia, Lactobacillus, Acetobacter, Gluconobacter entre otros. Sin embargo, estos cetoácidos no se han  
30 utilizado con fines comerciales, porque no son bioquímicamente estables (se transforman en el proceso metabolizan -



te), o resultan difíciles de separar del líquido de fermentación.

5 También se ha demostrado ampliamente en teoría que los  $\alpha$ -cetoácidos se combinan con  $\text{NH}_3$  en el proceso del metabolismo, por obra de microorganismos, para formar  $\alpha$ -amino-ácidos, y se sintetiza proteína, y hoy se admite como teoría bien patente, para explicar el crecimiento del cuerpo de los microorganismos, que éste crece y se reproduce a expensas de azúcar y sales de  $\text{NH}_4$ .

10 Sin embargo, en los experimentos científicos son muy pocos los casos, si hay alguno, en que se haya estudiado e investigado el metabolismo del amoníaco producido conjuntamente con el metabolismo del azúcar agregando sales de amonio, urea, nitratos o nitritos en cantidad superior a la necesaria para el crecimiento de microorganismos, y  
15 creemos que nadie ha intentado hasta ahora producir material sazonador por tal procedimiento, y que somos los primeros en intentarlo.

Nemos ensayado utilizar la teoría de la síntesis de proteína fisiológica - la teoría de la síntesis bioquímicamente importante-, transformando el  $\alpha$ -cetoácido en  $\alpha$ -aminoácido, para preparar ácido glutámico, el material más importante para sazonar, y hemos descubierto, al cultivar uno o varios microorganismos muy productores de ácido  $\alpha$ -ceto-  
25 toglutámico en un medio que contenía azúcar y sales de amonio, urea, nitratos o nitritos en cantidades diferentes, que el módulo de crecimiento y multiplicación del microorganismo no rebasa cierto límite, aunque se aumente la cantidad de compuesto nitrogenado, pero que el consumo del  
30 compuesto nitrogenado añadido al medio aumenta gradualmente



a medida que se agrega mayor cantidad de este compuesto. En otras palabras, el compuesto nitrogenado añadido se consume en parte para el crecimiento de los microorganismos, pero el exceso de dicho compuesto se metaboliza aparte del asimilado para el crecimiento, y se forma aminoácido.

En general, basta 0,1-0,2% de sulfato amónico como fuente de nitrógeno en el medio cultivo para el crecimiento de microorganismos o para los fines de la industria fermentativa en general, y hasta ahora se ha considerado inútil o nocivo utilizar más de esa proporción. Por el contrario, en el procedimiento de esta patente, se eleva esta proporción hasta el 15% del medio de cultivo, por lo que el invento difiere por completo del concepto mantenido hasta ahora respecto al cultivo de microorganismos.

Como se ha indicado antes, el exceso de material nitrogenado no se emplea para el cultivo de los microorganismos como sustancia nutritiva, porque su crecimiento cesa al alcanzar cierto límite, sino que se utiliza exclusivamente para continuar la producción de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, que se transforma en aminoácido. A continuación se exponen los resultados de ensayos realizados para hallar la relación entre la cantidad de material nitrogenado añadido y la de ácido glutámico producido, y el crecimiento del cuerpo bacteriano.

Ensayo 1º.

Medio de cultivo: Glucosa, 8%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,03%;  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  y  $\text{CuSO}_4$ , 0,001% respectivamente.

A este medio básico se añade sulfato de amonio, en las proporciones siguientes: 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2,



0,3, 0,5, 1, 3, 5, 6 y 8%.

Los medios así preparados se esterilizan calentándolos a 130°C durante veinte minutos, y se utilizan luego.

Microorganismos:

- 5 a) Dos especies de Aerobacter,
- b) Una especie de Acetobacter y dos de Gluconobacter.
- c) Una especie de Pseudomonas y otra de Serratia.

Método de cultivo: El cultivo se realiza en condiciones aeróbicas durante 48 horas, a 32°C, y el medio se deja en  
10 reposo doce horas, y se decanta. El cuerpo bacteriano se separa mediante centrifuga. La cantidad de líquido es de 10 litros en cada ensayo.

Advertencias: En la Tabla 1, de la página siguiente, en la que se expone el resultado de estos ensayos, las cifras de ácido glutámico indican tantos por 100 del clor-  
15 hidrato; las del cuerpo bacteriano, tantos por 100 del cuerpo bacteriano seco, y la marca "-" indica que por cromatografía sobre papel, no se ha descubierto ningún indicio de ácido glutámico, mientras que la señal "+" signifi-  
20 ca el caso opuesto o positivo.



TABLA 1ª.

	Acido glutámico %			Cuerpo bacteriano		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
Bacterias						
Sulfato amónico %						
5	0.01	-	-	0.017	0.019	0.008
	0.03	-	-	0.050	0.062	0.031
	0.05	±	-	0.071	0.081	0.068
	0.1	0.03	-	0.113	0.134	0.101
	0.2	0.12	±	0.165	0.153	0.114
	0.3	0.24	0.19	0.159	0.160	0.125
10	0.5	0.75	0.81	0.174	0.168	0.122
	1.0	1.07	1.12	0.146	0.167	0.110
	3.0	1.15	1.24	0.157	0.169	0.113
	5.0	1.23	1.29	0.160	0.176	0.104
	6.0	1.20	1.36	0.145	0.152	0.098
15	8.0	0.98	1.19	0.119	0.135	0.076

Como se desprende de lo expuesto, el crecimiento y la multiplicación de bacterias se suspenden substancialmente al llegar a cierto límite, pero la producción de ácido glutámico aumenta al hacer mayor la adición de sulfato amónico.

20 A continuación se indica la relación de las cantidades producidas de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico y ácido glutámico respecto al tiempo, mediante el

#### Ensayo 2º.

25 Medio de cultivo: Se emplea líquido de almidón sacarificado, a razón de 5,4% de azúcar reducido, en lugar de glucosa del medio básico del ensayo 1º, y se añade a este medio básico, sulfato amónico al 2%, y además se añade 0,2%



de sulfato amónico solamente al medio de cultivo de los microorganismos de C);

Microorganismos:

- A). Una especie de Acetobacter y otra de Serratia.
- 5 B). Una especie de Acetobacter, dos de Acetogluconobacter, y otra de Saccharomyces cerevisiae.
- C). Dos especies de Pseudomonas.

10 Método de cultivo: Como medio de cultivo se emplean porciones de 20 litros, a 32°C, agitando y dejando en reposo, y se toman muestras de vez en cuando.

15 Advertencias: En las Tablas 2, 3 y 4 siguientes se exponen las proporciones (%) de ácidos glutámico y de ácido α-cetoglutárico. El cuerpo bacteriano se suspendió en agua sometiendo el líquido a centrifugación, y se calculó mediante un fotonefelómetro; el valor volvió a calcularse a base del cuerpo bacteriano seco.

TABLA 2ª

		Acido glutámico			
Microorganismo		A	B	C	
20	Sulfato amónico %	2	2	2	0.2
	15 horas	0.02	±	±	-
	30	0.25	0.17	0.30	±
	50	0.96	0.24	0.71	0.01
	75	1.53	1.33	1.08	0.01
25	100	1.60	1.52	1.45	0.02
	125	1.61	1.53	1.47	0.03



TABLA 3ª.

Acido $\alpha$ -cetoglutárico					
Microorganismo	A	B	C		
Sulfato amónico %	2	2	2	0.2	
Tiempo	15 horas	0.01	0.02	±	0.01
	30	0.23	0.31	0.12	0.18
	50	0.72	0.98	0.03	0.74
	75	0.18	0.20	0.01	0.95
	100	0.02	0.01	±	1.02
	125	±	-	±	1.02

TABLA 4ª.

Cuerpo bacteriano					
Microorganismo	A	B	C		
Sulfato amónico %	2	2	2	0.2	
Tiempo	15 horas	0.04	0.05	0.02	0.03
	30	0.12	0.10	0.11	0.13
	50	0.14	0.14	0.15	0.15
	75	0.14	0.15	0.16	0.15
	100	0.14	0.15	0.16	0.16
	125	0.13	0.15	0.15	0.16

Como se ve por lo que antecede, el ácido glutámico no se produce prácticamente por adición de sulfato amónico en proporción de 0,2%, pero añadiendo 2.0% de sulfato amónico la producción de ácido glutámico se continúa con la



de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico al cabo de 50 a 75 horas de cultivo,  
y luego aumenta la de ácido glutámico al consumirse ácido  
 $\alpha$ -cetoglutárico, con lo que el rendimiento de ácido glutá-  
mico aumenta mucho más que cuando se añade 0,2% de sulfato  
5 amónico. Dicho en términos más concretos, el crecimiento  
del microorganismo o el aumento del cuerpo bacteriano viene  
a ser el mismo, independientemente de que se agregue 2% o  
0,2% de sulfato amónico, pero la cantidad de ácido  $\alpha$ -ceto-  
glutárico producida aumenta mucho, y en su mayor parte se  
10 transforma en ácido glutámico. En la Tabla 3, las cifras  
de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico son posteriores a su transformación,  
y no representan los valores reales del ácido producido: pe-  
ro si tomamos en cuenta la cantidad de ácido glutámico re-  
sultante según la Tabla 2, se advierte que la producción de  
15 ácido cetoglutárico aumenta alrededor de 50 a 60% en total,  
si se añade 2% de sulfato amónico en vez de 0,2%, y este  
aumento en la producción de ácido cetoglutárico contribuye  
a aumentar la producción de ácido glutámico.

Seguidamente se describirán unos ejemplos de la a-  
20 plicación del procedimiento del invento, para la mejor com-  
prensión de este último, pero ha de entenderse que los ejem-  
plos no tienen carácter limitativo.

EJEMPLO 1º.

Se añade 10% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una solución acuosa de  
25 melaza sacarina al 10%, y la mezcla líquida se inocula con  
una especie de Aerobacter y otra de Pseudomonas, o sea con dos  
clases de microorganismos; luego se cultiva durante siete  
días a 33°C. Se obtiene un material sazonador de sabor a-  
gradable refinando y concentrando el líquido cultivado.



EJEMPLO 2º.

Se emplean 10 litros de líquido de cultivo que contiene 5% de urea, agregado a sacarosa al 8% (con adición ulterior de 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y 0,05% de  $\text{MgSO}_4$  como sustancia nutritiva). La cantidad de urea añadida a este líquido corresponde a un 2,3%, a base del nitrógeno.

En 10 litros del medio de cultivo antes descrito se siembran una especie de Aerobacter y otra de Gluconoa-  
cetobacter, y se cultivan en condiciones aeróbicas a 30°C, durante 72 horas. El líquido cultivado se concentra, sin retirar el cuerpo bacteriano, se trata con HCl concentrado, y se separa ácido glutámico en forma de clorhidrato, conforme al método habitual, para obtener 105,6 g. del producto. Cuando se examina separadamente la muestra que contiene cuerpos bacterianos, se calcula que contiene solo 18,5 g. de estos cuerpos, a base del material seco, lo cual demuestra que el ácido glutámico obtenido no procede solo de los cuerpos de las bacterias, sino que es producido de nuevo bioquímicamente en el líquido, a expensas del exceso de urea.

EJEMPLO 3º.

Se prepara un medio de cultivo añadiendo 15% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3,1% en N) y 5% de  $\text{CaCO}_3$  a mosto (10% en azúcar), y a 10 litros de este medio de cultivo se agrega un trozo de queso (alrededor de 1 g.), y se cultiva a 33°C. En este líquido se encuentran una especie de Pseudomonas, dos de Aerobacter, dos de Saccharomyces, una de Aspergillus, una de B.subtilis y una de B. coagulans.

La proporción de nitrógeno del compuesto amónico se calcula de vez en cuando durante quince días de cultivo, y se observa que llega al mínimo el día 13º. Suspendiendo el



cultivo en este punto mínimo, retirando el exceso de  $\text{CaCO}_3$  y el  $\text{CaSO}_4$  producido, concentrando el líquido, separando los iones de Ca y el amonio en exceso por adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , neutralizando el líquido mediante adición de HCl y concentrándolo, se obtiene un material de buen sabor, apropiado para sazonar. En esta operación se demuestra que se consume 67,4% de nitrógeno del compuesto amónico, y que el nitrógeno del aminocompuesto obtenido asciende hasta 34% del total del nitrógeno agregado al principio, pues este compuesto asimila aproximadamente la mitad del nitrógeno metabolizado (67,4%), mientras que la cantidad total del cuerpo bacteriano es sólo de 3,1 g., o sea únicamente 1% del nitrógeno total (310 g. en nitrógeno) añadido al líquido, aún suponiendo que estos 3,1 g. de cuerpo bacteriano sean en absoluto proteína. Esto indica que la mayor parte del nitrógeno incorporado en exceso se metaboliza, y la mayor parte del nitrógeno metabolizado se acumula como aminoácidos en el líquido.

EJEMPLO 4º.

Una especie de Aerobacter se inocula en un medio de cultivo que contiene 5% de glucosa, 0,1% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05% de  $\text{MgSO}_4$ , y 2% de  $\text{NaNO}_3$  como fuente de nitrógeno, y se cultiva a 30°C durante cinco días. Terminado este plazo, se analiza el medio cultivado y se encuentra 1,50% de ácido glutámico (alrededor de 30% de azúcar). Para comparar, se agrega 1,5% de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en vez de  $\text{NaNO}_3$ . (La cantidad de nitrógeno es la misma de antes, 0,33%). Se inocula el mismo germen, el cultivo se efectúa en iguales condiciones, y el rendimiento obtenido esta vez es de 1,48%.



EJEMPLO 5º.

Se prepara un medio de cultivo añadiendo 0,1% de  $K_2HPO_4$ , 0,04% de  $MgSO_4$  y 2% de  $NaNO_3$  a líquido de almidón sacarificado (5% en azúcar), y se inocula con una especie de Pseudomonas, para cultivarlo como en el ejemplo precedente. Al quinto día de cultivo se obtiene 1,25% de ácido glutámico (25% en azúcar).

EJEMPLO 6º.

Se prepara un medio de cultivo añadiendo 0,75% de  $NH_4Cl$  y 1% de  $NaNO_3$  como fuente de nitrógeno a un líquido que contiene 5% de sacarosa, 0,1% de  $KH_2PO_4$  y 0,05% de  $MgSO_4$ ; se inocula con una mezcla de Serratia y B.subtilis, y se cultiva a 33°C durante cinco días. Terminada la fermentación, el líquido de cultivo contiene 1,70% de ácido glutámico (34% en azúcar).

N O T A  
=====

Se reivindica como objeto de esta patente:

- 1) Procedimiento para obtener productos sazonadores, partiendo de sacaridos, mediante la inoculación de microorganismos muy productores de  $\alpha$ -cetoácidos de los sacaridos, a un medio preparado añadiendo un compuesto nitrogenado del grupo que comprende sales amónicas, amoniaco, urea, aminoácidos, nitratos y nitritos, en cantidad mayor de la necesaria para el crecimiento y la reproducción de dichos microorganismos, y cultivando estos microorganismos a temperaturas de 10º a 50º C para producir ácido  $\alpha$ -cetoglutámico por la acción fisiológica de los microorganismos y aminorar a la vez el material por obra de la enzima de los mismos, con lo que el material nitrogenado en exceso se

237 857

- 13 -



asimila para suscitar la producción de ácido  $\alpha$ -cetoglutá-  
rico, el cual se transforma en ácido glutámico aumentando  
asi la producción de este último.

5 2) Procedimiento para producir material sazonador  
según la reivindicación 1, en el que los microorganismos  
muy productores de  $\alpha$ -cetoácidos de las sustancias azucara-  
das, se eligen del grupo que comprende Pseudomonas, Lacto-  
bacillus, Acetobacter, Aerobacter, Serratia, Escherichia,  
B. subtilis, Gluconobacter, Saccharomyces y Aspergillus, y  
el material sazonador contiene ácido glutámico como ingre-  
10 diente principal.

3) Procedimiento para obtener productos sazona-  
dores, partiendo de sacaridos.

Esta memoria consta de trece páginas escritas por  
una sola cara.

BARCELONA, 10 SEP. 1957

P. A.

JOSE M. SOLIAR  
P. P.