

Caso 6350

248196



P A T E N T E D E I N V E N C I Ó N

a favor de

MERCK & CO., INC. - de nacionalidad norteamericana - domiciliada en RAHWAY, N.J. E.U., 126 East Lincoln Avenue,

por:

"Procedimiento para la preparación de ácido L-glutámico"

====:oOo:=====

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

Este invento se refiere a la síntesis del ácido L-glutámico, y más concretamente a la producción de este ácido por fermentación, sobre todo a la preparación de ácido L-glutámico en estado libre, con exclusión substancial del D-glutámico, por fermentación de un medio nutritivo con microorganismos del

248196



género Bacillus. Con más precisión aún, atañe a la producción de ácido L-glutámico por fermentación con microorganismos del tipo intermedio de Bacillus megateriumcereus.

5 El ácido L-glutámico es un aminoácido que, en forma de su sal monosódica, se emplea mucho como sazonador de productos alimenticios. Se conocen síntesis químicas de la substancia, pero con el inconveniente de que en la mayoría de los casos dan la forma racémica de ácido glutámico.

10 También es conocido el aislamiento de ácido L-glutámico a partir de caldos. En la gran mayoría de estos casos, sin embargo, el producto inmediato es un complejo de ácido glutámico que ha de degradarse o hidrolizarse para obtener el ácido libre, o una mezcla de las formas L y D del ácido. Las síntesis microbiológicas que dan complejos de glutamato, mezclas o isómeros,
15 no son satisfactorias como métodos comerciales de preparación de ácido L-glutámico, por las operaciones complementarias requeridas para recuperar el producto deseado en forma pura. Además, en muchas de las síntesis microbiológicas publicadas hasta ahora en la bibliografía, sólo se forman o pueden recuperarse
20 pequeñas cantidades de ácido L-glutámico, por lo que no resultan comercialmente prácticas.

Se ha descubierto ahora que es posible obtener elevados rendimientos de ácido L-glutámico libre mediante fermentación en un medio nutritivo apropiado con cepas de microorganismos
25 seleccionados del género Bacillus, y en particular con cepas del tipo intermedio de Bacillus megaterium-cereus. Cuando la fermentación se lleva a cabo en las condiciones y con los microorganismos que se describen con detalle más adelante, se forma directamente ácido L-glutámico en el caldo de fermentación,
30 substancialmente libre de ácido D-glutámico, con propor-



248196

ciones relativamente bajas de ácido glutámico combinado.

Los microorganismos del tipo intermedio de Bacillus megaterium-cereus que sirven para producir ácido L-glutámico, y que se incluyen dentro del marco de este invento, se caracterizan por su vegetación en medios nutritivos de glucosa-extracto de levadura-sales. Cultivadas en tal medio nutritivo, las células aparecen hinchadas, deformes y de tamaño irregular, o sea muy diferentes de las especies de Bacillus conocidas hasta ahora, cuyas células presentan el aspecto de bastoncillos compactos normales.

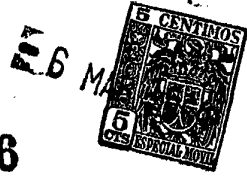
Un nuevo microorganismo productor de ácido L-glutámico que cae dentro de la esfera del invento fue aislado del suelo en Austin, Texas, y mantenido en cultivos inclinados en agar de un medio de glucosa-extracto de levadura-sales conservado a 4°C. Por sus propiedades morfológicas, se parece mucho al Bacillus megaterium y al Bacillus cereus, pero, como se indica más lejos, es distinto de una y otra especie; por consiguiente, el microorganismo se ha designado como cepa del tipo intermedio de Bacillus megaterium-cereus. Un cultivo de esta nueva cepa se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, en Washington, D.C., con el número ATCC 13062.

Las características morfológicas del nuevo cultivo ATCC 13062 son las siguientes:

Células vegetativas. Cultivos jóvenes procedentes de agar nutritivo: bastoncillos de 0,9-1,2 x 2,0-5,0 μ , sueltos o en cortas cadenas, con extremos redondeados y protoplasma moteado (fucsina básica); de aspecto perlado o jaspeado, no móviles, encapsulados, sin flagelos; gramnegativos (cultivo de 6-12 horas).

En agar nutritivo glucosado, los bastoncillos eran

248196



mayores, más largos, y contenían muchos glóbulos refringentes voluminosos. Cultivos viejos en ambos medios: filamentos o cadenas, largos y enredados; células de tamaño irregular, algunas con extremos apuntados.

5 En un medio de glucosa-extracto de levadura-sales, líquido o sobre agar, las células jóvenes eran mayores, con más vacuolas, y contenían glóbulos refringentes grandes. La morfología del medio líquido es distintiva, totalmente diversa de la de las cepas de referencia de Bacillus megaterium y Bacillus cereus. El cultivo ATCC 13062 en este medio es típicamente pleomorfo, con la mayoría de las células de tamaño irregular y deformes, y considerablemente hinchadas.

10

Esporangios. No hinchados distintamente.

Esporas. De 0,8-1,2 x 1,2-2,2 μ , cilíndricas u ovales, centrales o paracentrales; formación abundante al cabo de 48 horas en agar nutritivo; resistentes a una hora de calor a 60 $^{\circ}$ C.

15

Colonias. En placa de agar nutritivo, después de 48 horas a 30 $^{\circ}$ C: lisas, circulares (1,5-2 mm), enteras, convexas, no difusibles, translúcidas, relucientes; de color blanco cremoso.

20

Cultivos inclinados de agar nutritivo. Vegetación moderada; lisos, suaves, relucientes, translúcidos, ligeramente difusibles; húmedos, de color blanco cremoso y olor a amoníaco.

Caldo nutritivo. Turbio, con sedimento; sin película.

Cultivos inclinados en agar nutritivo y glucosa. Vegetación más suave y glutinosa que en agar nutritivo, con puntos diáfanos.

25

Cultivos inclinados en agar con sales, extracto de levadura y glucosa. Vegetación abundante, butirosa, realzada, húmeda, reluciente, opaca, de color blanco grisáceo.

30

248196

6 MAR



Caldo con glucosa, sales y extracto de levadura. Muy turbio, con sedimento y material capsular filante, pero sin película.

5 En la tabla siguiente se exponen los caracteres fisiológicos y bioquímicos del Bacillus megaterium, del Bacillus cereus y de la cepa ATCC 13062

	Caracteres	B.megat.	B.cereus	ATCC 13062
	Vegetación sobre agar con glucosa-nitrato	+	-	-
10	Vegetación s/patata	+	+	-
	Formación de ácido en			
	Glucosa	+	+	+
	Sacarosa	+	-	+
15	Manita	+	-	-
	Arabinosa	-	-	-
	Xilosa	+	-	+
	Glicerina	+	+	-
	Salicina	-	+	+
	Reacción de Voges-Proskauer-		+	+
20	Hidrólisis de			
	Almidón	+	+	+
	Gelatina	+	+	+
	Caseína	+	+	+
	Reducción de nitrato	-	+	+
25	Formación de ureasa	+	-	+
	Utilización de citrato*	+	+	+
	Vegetación anaeróbica en caldo glucosado	-	+	+
30	Formación anaeróbica de gas a partir de nitrato	-	+	-
	Reacción en yema de huevo	-	+	-

* Medio de agar citratado, con 0,2% de extracto de levadura.



5 El medio nutritivo empleado para el cultivo de los
microorganismos del tipo intermedio de Bacillus megaterium-
cereus conforme a este invento, para producir ácido L-glutámi-
co, debe contener un manantial de carbono y otro de nitrógeno,
y sales. La dextrosa es la mejor proveedora de carbohidratos,
pero pueden utilizarse otras fuentes, tales como almidón, sa-
carosa, levulosa, lactosa, dextrina, melazas y sus análogos,
si se quiere, con resultado satisfactorio. La cantidad de ácido
L-glutámico producido depende, al menos en parte, de la de
10 azúcar contenida en el medio. Para una producción óptima, pre-
ferimos emplear un medio nutritivo que contenga una cantidad de
azúcar inferior a la concentración vegetativa límite, o un
medio al que se agregue continuamente dextrosa manteniendo un
nivel inferior a la concentración que limita el crecimiento.
15 Aunque se pueden añadir al medio concentraciones de dextrosa
al 10% y más, preferimos emplear un medio nutritivo con 4 a 8%
de dextrosa.

Ejemplos de fuentes adecuadas de nitrógeno son urea,
sales de amonio, como sulfato amónico, aminoácidos y análogos.
20 De ellas, preferimos emplear urea o sulfato amónico, pues así
vegetan bien los cultivos y se logra consecuentemente una ele-
vada producción de ácido L-glutámico. Es corriente asimismo
incluir en el medio ciertas sales, como fosfato potásico, o sa-
les de magnesio, cinc, hierro y manganeso, en cantidades míni-
25 mas. Estos minerales en indicios, requeridos por los organismos
para su desarrollo, suelen encontrarse en grandes cantidades
en las fuentes de carbono y de nitrógeno. Preferimos incluir
igualmente en el medio nutritivo carbonato cálcico, porque de
este modo se obtiene habitualmente un rendimiento mayor en
30 ácido L-glutámico.



248196

Se ha comprobado que el pH del medio de fermentación es esencial para una producción elevada de ácido L-glutámico. El aminoácido se forma muy satisfactoriamente y en abundancia cuando el pH del medio está comprendido entre 6,5 y 7,5 aproximadamente, A medida que vegeta el cultivo y se produce ácido L-glutámico, el pH del medio se vuelve más ácido, y, si no se vigila, puede llegar a ser bastante ácido para retardar o detener el desarrollo del microorganismo. Por eso, el pH se ajusta a neutralidad esencial periódicamente, en el curso de la fase de fermentación, por adición aséptica de una base, con preferencia hidróxido amónico. Un reajuste del pH alrededor de 7,0 a intervalos de unas seis horas, durante la fase de vegetación activa del microorganismo, ha resultado adecuado para el buen desarrollo del cultivo y una gran acumulación de ácido L-glutámico.

El cultivo de este nuevo microorganismo se efectúa en condiciones aeróbicas. Cuando se practican fermentaciones a pequeña escala, como en matraces de Erlenmeyer, se obtiene una aireación suficiente agitándolos durante el periodo de fermentación. Para operaciones a mayor escala, el caldo nutritivo se agita mecánicamente, y se introduce en el medio aire esterilizado, aplicando técnicas bien conocidas en este ramo. Para rendimientos óptimos en ácido L-glutámico, se incuba la cepa ATCC 13062 en el medio nutritivo a unos 28-32°C, y con preferencia a unos 30°C, durante 36-84 horas. Se obtienen rendimientos muy satisfactorios de ácido L-glutámico al cabo de 48-72 horas de incubación en las condiciones apuntadas.

Una peculiaridad especial del invento aquí descrito es el elevado rendimiento en ácido L-glutámico libre producido por el nuevo microorganismo del tipo intermedio de Bacillus



megaterium-cereus, tal como ATCC 13062. Empleando las condiciones ya expuestas, se logran uniformemente conversiones abundantes de carbohidrato en ácido L-glutámico, hasta de 60% del carbohidrato consumido, en cantidades superiores a 25-35 mg. de ácido glutámico por mililitro de caldo de fermentación. Además de las grandes cantidades de ácido L-glutámico producido, se forma una cantidad relativamente pequeña de ácido L-glutámico combinado, que se convierte fácilmente en el ácido libre hidrolizándolo con un ácido mineral, preferiblemente con ácido clorhídrico.

El ácido L-glutámico producido mediante cultivo de nuestras nuevas cepas de Bacillus en un medio nutritivo, según se deja descrito, se puede recuperar del líquido de fermentación después de retirar el material sólido por filtración o por centrifugación. En general, este procedimiento comprende la acidificación de un filtrado de cultivo con ácido clorhídrico, y la adsorción del ácido L-glutámico contenido en el líquido acidificado sobre una resina de intercambio de aniones débilmente básicos, como IR-4B, resina comercial expendida por la Rohm & Haas Company. El aminoácido se retira de la resina por elución con ácido clorhídrico diluido y concentración del eluato a volumen reducido. El clorhidrato de ácido L-glutámico se obtiene por cristalización en esta última solución.

La cantidad de ácido L-glutámico contenida en un caldo de fermentación particular puede determinarse también, sin recurrir al aislamiento efectivo de aminoácido, por uno de dos métodos: uno químico, que utiliza la cromatografía sobre tiras de papel, y otro enzimático. A continuación detallamos ambos procedimientos de valoración.

A.- Método químico. Filtrados de cultivo que contienen

176



248196

ácido glutámico se marcan sobre papel de filtro Whatman nº 1, graduando el volumen de modo que contengan 10 a 90 mmg. de ácido glutámico. Una solución tipo de ácido glutámico se marca en la misma hoja de papel a niveles de 10, 30, 50, 70 y 90 mmg., para poder trazar una curva de graduación. Se pasan por duplicado en diferentes hojas de papel soluciones problema y patrón de ácido glutámico. Se revelan los papeles durante 20-24 horas, por el método descendente, empleando como disolvente revelador fenol saturado con una solución acuosa que contiene 6,3% de citrato sódico y 3,7% de fosfato monosódico. Así se obtiene una buena separación de las marcas de ácido glutámico frente a otras reactivas a la ninhidrina contenidas en los filtrados.

Después de secarlos durante la noche en una corriente de aire, los cromatogramas se rocían ligeramente con solución de ninhidrina al 0,1% en n-butanol saturado de agua. Las marcas de ácido glutámico se localizan a valores Rf de alrededor de 0,23, después de calentar los papeles a 80-100°C durante unos dos minutos.

El glutamato de las marcas se valora por medios descritos en la bibliografía. Cada marca de ácido glutámico se corta luego en trocitos y se coloca en 1 ml. de agua, en un tubo de ensayo graduado. A cada tubo se añaden sucesivamente 2 ml. de solución tope de citrato (pH 5) y 2 ml. de ninhidrina reactivo. Los tubos se ponen en agua hirviendo, y a cada uno de ellos se agrega 1 ml. de solución recién preparada de SnCl₂ al 0,2% (en solución tope de citrato de pH 5). Después de calentar quince minutos, los tubos se retiran y se enfrían en la oscuridad durante diez minutos. Se completa el líquido de cada tubo hasta 10 ml. añadiendo una solución saturada de NaCl. El complejo que contiene color se extrae de la fase acuosa agitando



248196

con 5 ml. de n-butanol. La solución clara de butanol se pasa con pipeta a un tubo de Klett, y la intensidad del color púrpúreo se mide con un fotoelectrocolorímetro de Klett-Summerson, empleando un filtro verde. Después de corregir para la lectura de una muestra en blanco preparada del cromatograma, pero sin ácido glutámico, se encuentra una relación rectilínea entre la intensidad de color y la concentración de ácido glutámico en una escala de 10 a 90 mmg. El contenido en ácido glutámico de los filtrados desconocidos se calcula a partir de sus curvas tipo de calibración respectivas.

B.- Método enzimático. De pulpa blanca reciente se obtiene una descarboxilasa L (+)-glutámica específica. La enzima cruda se prepara mezclando 90 g. de pulpa con 30 ml. de solución tope de fosfato (pH 5,75) m/15, fría como hielo, durante unos tres minutos, en un mezclador Waring. El material se pone en el refrigerador durante una hora, y luego se filtra por una gasa. Después de centrifugar el filtrado en frío, se obtiene un líquido ligeramente turbio. La preparación de enzima cruda congelada retiene su actividad sólo dos o tres días.

El CO_2 producido por descarboxilación de ácido glutámico se mide manométricamente en respirómetros Warburg a 37°C . La cámara principal del recipiente de Warburg contenía 2 ml. de preparación de enzima. Una rama lateral contenía 0,2 ml. de una muestra que representaba 0,5-1,0 mg. de ácido glutámico, y la del otro lado, 0,2 ml. de ácido sulfúrico 1,2n. Se obtiene una muestra en blanco substituyendo la desconocida por 0,2 ml. de agua. La eficiencia de la preparación de enzima se comprueba substituyendo la muestra que ha de analizarse por 0,2 m. de una solución neutralizada de L (+)-glutamato al 0,50%. Los filtrados de cultivo se acidifican con ácido clorhídrico 6n, para

6 MAR



248196

eliminar el CO₂, y luego se neutralizan con hidróxido amónico al 28%. Los experimentos se practican en atmósfera de aire.

Después de equilibrar la temperatura, las soluciones de glutamato se vierten en la enzima. La reacción se prolonga hasta que no se desprenda más CO₂, por lo regular 60 minutos. Se hacen luego lecturas, y el ácido sulfúrico se vierte en el recipiente principal, para dejar CO₂ (combinado) en solución. Un tratamiento de comprobación permite determinar la cantidad de CO₂ (combinado) en solución al principio del experimento, y este valor se deduce de la cifra final de CO₂.

Los siguientes ejemplos se exponen con fines de ilustración, sin la menor idea limitativa.

EJEMPLO 1º.

Se efectuaron varias fermentaciones en matraces de Erlenmeyer de 500 ml., tapados con algodón esterilizado, empleando un medio nutritivo estéril de la siguiente composición:

	Dextrosa	30,-- g/litro
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 "
	KH ₂ PO ₄	2,38 "
20	K ₂ HPO ₄	5,65 "
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,00 "
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0011 "
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,0079 "
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0015 "
25	Extracto de levadura (Difco)	0,25 "
	CaCO ₃	0,10 "

La dextrosa y el CaCO₃ se esterilizaron por separado. El pH se ajustó a 6,9 por ser necesario.

Se inocularon 100 ml. del medio precedente con 2% en volumen de una siembra vegetativa del cultivo de Bacillus

6 MAR.



248196

megaterium-cereus ATCC 13062, y la fermentación se efectuó en un sacudidor giratorio mecánico, a unos 30°C, durante 72 horas. Los caldos de fermentación se ajustaron periódicamente a un pH de 6,5-7,5, a base del color del azul de bromotimol indicador, añadiendo hidróxido amónico concentrado.

Al terminar la fermentación, las células bacterianas y el residuo de CaCO₃ se retiraron por centrifugación, y se determinó el contenido de ácido L-glutámico en el centrifugado claro por el método enzimático descrito anteriormente, con los resultados que siguen:

10

<u>Filtrado número</u>	<u>Acido L-glutámico libre (mg/ml.)</u>
1	5,42
2	5,74
3	5,86
4	5,05

15

EJEMPLO 2º

Se efectuaron varias fermentaciones según la técnica del ejemplo 1º, para determinar los rendimientos en ácido L-glutámico con diferentes fuentes de carbono en el medio nutritivo. Este era el mismo del ejemplo 1º, pero reemplazando la dextrosa por la fuente de carbono indicada en la tabla de resultados que sigue. Los productos en ácido L-glutámico se determinaron por el método químico antes descrito.

20

<u>Fuente de carbono</u>	<u>Acido L-glutámico libre (mg/ml.)</u>
Glucosa	5,80
Sacarosa	5,04
Lactosa	5,20
Almidón	5,05

25

30



248196

EJEMPLO 3º

5 Se efectuaron fermentaciones en matraces de Erlenmeyer de 250 ml., empleando un medio nutritivo esterilizado de igual composición que el del ejemplo 1º, pero reemplazando por saca-rosa la dextrosa, y con una concentración de extracto de levadu-
ra de 0,1 g/litro. Las concentraciones de sacarosa y de CaCO_3 se variaron como indica la tabla de resultados que sigue; estos dos ingredientes se esterilizaron por separado, y se añadieron a los otros medios nutritivos estériles.

10 El cultivo utilizado y el método de fermentación fueron los mismos descritos en el ejemplo 1º.

Se valoraron muestras de fermentación por un método bio-
lógico y otro de electroforesis.

15 El primero es un procedimiento de difusión, con Lac-
tobacillus arabinosus como microorganismo de ensayo. Este se efectúa en un medio de agar con aminoácido y mezcla de vitami-
nas, que favorece la vegetación del cultivo ensayado sólo en presencia de ácido L-glutámico o de glutamina. Después de un periodo de incubación adecuado, las zonas de exhibición alre-
20 dedor de las placas se miden, y se comparan con las de un ácido L-glutámico tipo.

25 Se realizó un ensayo por electroforesis en tiras de papel, para separar ácido L-glutámico de otros componentes del caldo de fermentación, incluso glutamina. Empleando un poten-
cial de corriente continua y un electrólito adecuado, el ácido L-glutámico emigró hacia el ánodo positivo (+). Revelada la tira de papel, después de la electroforesis, con el reactivo usual de ninhidrina, en condiciones vigiladas, se obtuvieron zonas pigmentadas con densidades, leídas directamente en un
30 densitómetro Photovolt, proporcionales a la cantidad de ácido



248196

L-glutámico presente.

Experimento A^x

	Sacarosa	CaCO ₃	Acido L-glutámico producido	
			Valor.biológica	Valor.Electroforética
5	a) 45	0,1	13,7	11,6
	b) 45	1,0	14,6	12,0
	c) 45	5,0	16,5	16,1
	d) 45	10,0	19,1	18,7

Experimento B^x

10	Sacarosa	CaCO ₃	Acido L-glutámico producido	
			Valor.biológica	Valor.electroforética
	a) 60	1,0	21,9	16,2
	b) 60	10,0	24,3	19,4
	c) 60	20,0	30,3	30,4

15 ^x Cifras en gramos por litro de líquido de fermentación.

EJEMPLO 4^a

Las fermentaciones se efectuaron en recipientes de 5 litros, empleando el mismo medio descrito en el ejemplo 1^a, pero con 45 g/litro de sacarosa en lugar de dextrosa, 0,1 g/litro de extracto de levadura en vez de 0,25 g/litro, y 1,0 g/litro de CaCO₃ en vez de 0,1 g/litro. En el experimento 2^a, se agregó más sacarosa durante la fermentación, como se indica más adelante.

Las fermentaciones se efectuaron como sigue:

- 25 Cultivo - Bacillus megaterium-cereus ATCC 13062.
- Volumen - 3.200 ml.
- Agitación - Dos impulsores de turbina de 3 pulgadas, a 561 rpm.
- Aireación: - Tres litros por minuto.
- Ajuste de pH - Se añadió solución concentrada de amoniaco cada
- 30 seis horas, para mantener el pH entre 6,5 y 7,2.



248196

- Temperatura - 28°C.
- Antiespumoso - Se añadió el silicón antiespumoso GE-66 necesario.
- Valoración - Biológica, por difusión (tubos y placas).
- 5 Resultados -

Experimento 1º

	<u>Tiempo horas</u>	<u>Sacarosa mg/ml.</u>	<u>Valor.de ácido glutámico mg/ml.</u>
	0	49,5	0
10	24	46,5	0
	48	55,2	0
	72	43,6	5,9
	96	23,2	10,0
	120	10,8	12,4

15 Experimento 2º

	<u>Tiempo horas</u>	<u>Sacarosa mg/ml.</u>	<u>Valor.de ácido glutámico^x mg/ml.</u>
	0	37,5	0
	24	43,5	0
20	48	43,2	0
	72	36,0	3,8
	96	43,6	8,3
	120	53,6	14,0

25 ^x Con un tiempo de fermentación de 60 horas, se empezó a cargar sacarosa a razón de 0,08% por hora, y así se continuó hasta el final.

30 La siembra vegetativa del cultivo de ATCC 13062 empleado en los anteriores ejemplos se desarrolló empleando un medio nutritivo similar al descrito en el ejemplo 1º, pero reemplazando los 30 g/litro de dextrosa allí empleados por 10 g/litro de dextrosa. Los cultivos de siembra se dejaron vegetar en este medio 18-24 horas, agitando continuamente, a unos 30°C.



248196

EJEMPLO 5º

Se aisló del caldo de fermentación el ácido L-glutámico producido según el presente invento, procediendo como sigue:

5 Se concentraron a reducido volumen en vacío 50 ml. de filtrado de cultivo, y se acidificaron con 20 ml. de ácido clorhídrico 6n. Esta solución se neutralizó agitando durante una a tres horas con unos 100 g. de resina interiónica Amberlite IR 4B húmeda, hasta que el pH de la solución fue de 6-7. (La resina interiónica se preparó lavando sucesivamente con abundantes porciones de ácido clorhídrico al 4%, agua, carbonato sódico al 4% y agua; al terminar este lavado, la resina estaba en su forma básica). La solución se decantó de la resina, ésta se lavó repetidamente, y se decantaron las lavaduras. Las soluciones y las aguas de lavado reunidas se filtraron y concentraron en vacío hasta un volumen aproximado de 50 ml. Esta solución se acidificó de nuevo con 20 ml. de ácido clorhídrico 6n, y se neutralizó con 100 g. de nueva resina. El mismo ciclo se repitió una vez más.

15 Los tres lotes de resina, con el ácido L-glutámico adsorbido, se extractaron agitando con ácido clorhídrico 0,25n hasta reducir el pH del extracto a menos de 2. Los extractos que contenían el ácido L-glutámico se reunieron y concentraron hasta consistencia siruposa, en vacío. Al jarabe resultante se añadieron unos mililitros de ácido clorhídrico concentrado. De-
25 jando reposar esta solución en frío 24 horas, se formaron cristales de clorhidrato de ácido L-glutámico, los cuales se recogieron mediante filtración y se lavaron por separado con etanol y éter.

-----: N O T A :-----

30 Se reivindica como objeto de esta patente:

248196



5 1.- Procedimiento para la preparación de ácido L-glutámico substancialmente libre de ácido D-glutámico, el cual comprende cultivar un microorganismo del tipo intermedio de Bacillus megaterium-cereus en un medio nutritivo acuoso, en condiciones aeróbicas, a un pH aproximado de 6,5 a 7,5.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se caracteriza por formar células hinchadas y de forma irregular cuando se cultiva en un medio nutritivo con glucosa, extracto de levadura y sales.

10 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio nutritivo contiene un carbohidrato y una fuente de nitrógeno.

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la fuente de nitrógeno es hidróxido amónico.

15 5.- Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la fuente de nitrógeno es urea.

20 6.- Procedimiento para la preparación de ácido L-glutámico que comprende cultivar especies de tipo intermedio ATCC 13062 de Bacillus megaterium-cereus en un medio nutritivo acuoso, en condiciones aeróbicas, a un pH aproximado de 6,5-7,5.

7.- Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el medio nutritivo contiene un carbohidrato y una fuente de nitrógeno.

25 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la fuente de nitrógeno es hidróxido amónico.

9.- Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la fuente de nitrógeno es urea.

10.- Procedimiento para la preparación de ácido L-



248196

glutámico.

Esta memoria consta de dieciocho páginas, escritas por una sola cara.

BARCELONA, = 6 MAR. 1959

P. A.

JOSÉ M. BOLIBAR
P. P.

A large, stylized signature in black ink, consisting of several overlapping, sweeping strokes that form a complex, abstract shape. It is positioned below the typed name 'JOSÉ M. BOLIBAR'.