



261620

261620

RECEIVED
1 OCT 1960

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de registro de una Patente de Invención, por veinte años, en España, por "Procedimiento para la producción de ácido glutámico por fermentación", a favor de "MERCK & CO., INC.", entidad de nacionalidad norteamericana, domiciliada en Rahway, New Jersey (U.S.A.).

- - - -

Esta invención se refiere generalmente a un método para la producción microbiológica de ácido L(+)-glutámico. Más particularmente, se refiere a un proceso mejorado para la producción directa de ácido glutámico por fermentación. Aún más específicamente, concierne con un método para la obtención de altos rendimientos de ácido glutámico por fermentación de un medio nutriente conveniente con un microorganismo requiriendo biotino.

5. La producción económica de ácido glutámico es de importancia comercial considerable dado que la sal monosódica del mismo es altamente útil como agente para dar sabor a muchos productos alimenticios, En la literatura científica o de patentes se han divulgado diversos métodos para obtener o producir ácido glutámico. La mayoría de ellos son métodos químicos que conducen a la forma racémica del ácido glutámico y requieren una etapa de resolución para obtener la forma natural, o métodos de aislamiento en los que el ácido glutámico es recuperado de diversas fuentes naturales. También existen informes de la producción de ácido glutámico de un ácido -keto glutárico.

10.

15.



Todos estos métodos, sin embargo, dejan mucho que desear porque son costosos, de bajo rendimiento o dependientes de materiales iniciales difícilmente asequibles.

- No ha sido sino hasta recientemente que la producción de la forma naturalmente ocurrente de ácido glutámico por fermentación directa de un medio nutriente con un microorganismo conveniente ha sido divulgada. De esta manera, la síntesis de ácido L(+)-glutámico con diversos microorganismos incluyendo aquellos identificados como deformaciones de
5. Micrococcus glutamicus ha sido conocida, y la producción de
10. ácido glutámico por fermentación con deformaciones de Cephalosporium C. ha sido igualmente conocida. Más recientemente la síntesis de ácido glutámico con un bacilo identificado como un Bacillus megaterium-Bacillus cereus de tipo intermedio ha sido
15. descrito en la literatura. Otras especies de microorganismos conocidos para producir ácido L-glutámico son del género Brevibacterium, Pseudomonas, Aspergillus y Arthrobacter.

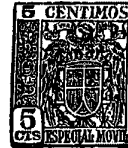
- Se ha descubierto que varios de los microorganismos hasta ahora conocidos como capaces de producir ácido glutámico
20. requieren también el biotino para desarrollo. Posteriormente se ha observado, sin embargo, que, mientras que el biotino es necesario para el desarrollo del organismo, el biotino excesivo presente en el medio de fermentación provoca desarrollo extremadamente abundante y fértil que afecta adversamente la
25. producción del ácido glutámico. En otras palabras, aunque una cierta cantidad de biotino es esencial para el crecimiento de estos microorganismos productores de ácido glutámico, que requieren biotino, la presencia del exceso de biotino permite el crecimiento desbordante a expensas de la producción de ácido
30. glutámico. Se apreciará por los técnicos que esta propiedad del requerimiento de biotino en microorganismos productores de ácido glutámico es una desventaja para la producción econó



mica del ácido glutámico, dado que muchos de los materiales nutritivos comúnmente empleados tienen un contenido de biotina relativamente alto. Aunque la concentración óptima de biotina no puede ser lograda sin excesiva dificultad en un medio totalmente sintético, esto no ha sido posible hasta ahora en medios conteniendo fuentes nutritivas naturalmente concurrentes tales como melazas y licor de grano de maíz. Ello ha presentado un serio problema dado que los medios sintéticos son generalmente costosos y normalmente no preferidos para fermentaciones en gran escala.

De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que el crecimiento de un organismo que requiere biotina en una fermentación conteniendo biotina puede ser efectivamente limitado o controlado por la adición de un inhibidor al medio de fermentación. Se ha descubierto, además, que cuando el crecimiento de tales organismos es así controlado o limitado, la habilidad del organismo para producir ácido glutámico no es adversamente afectada y el ácido glutámico es acumulado en cantidades significativas. Esto es una importante característica de nuestra invención dado que algunos métodos para limitar el crecimiento del organismo también limita la formación de ácido glutámico, y tales métodos no serían satisfactorios.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método microbiológico para la producción de ácido glutámico con un organismo que requiere biotina en un medio conteniendo exceso de biotina. Es un objeto adicional proporcionar un método para impedir o neutralizar el efecto adverso del exceso de biotina en la acumulación del ácido glutámico. Otro objeto es el de proveer un método para controlar o limitar el crecimiento de un microorganismo que requieren de biotina en presencia de un excedente de biotina. Aún otro objeto es la provisión



de un proceso de fermentación para hacer ácido glutámico con un organismo que requiere de biotino que permite el uso de materiales nutrientes naturalmente ocurrentes no costosos.

Otros objetos serán evidentes de la discusión detallada siguiente de la presente invención.

5.

Como se ha especificado arriba, muchos de los microorganismos capaces de producir ácido glutámico por fermentación directa requieren biotino para su crecimiento. Sin embargo, es sabido que existe una relación inversa entre la cantidad de celdillas en crecimiento y la cantidad de ácido glutámico producida. Así, cuando el contenido biotino del medio

10.

excede un cierto nivel óptimo el organismo crece muy exuberantemente e incontrolado, pero a expensas de la formación del ácido glutámico. Se ha observado que con la mayoría de los microorganismos que requieren biotino, productores de ácido glutámico, una concentración de biotino de alrededor de

15.

1.0-5.0 partes por billón (v.gr., 1-5 microgramos por litro) en el medio nutriente es óptima tanto para el desarrollo como para la formación de ácido glutámico. Mientras que esta concentración puede ser controlada en un medio sintético, muchas de las fuentes fácilmente asequibles y normalmente empleadas

20.

contienen tanto como 0.3 -gm. de biotino. Cuando estos materiales se emplean como nutrientes, resultan niveles de biotino en caldo de fermentación tan altos como 30-50 partes por billón. Si se deja incontrolado, el organismo en tal medio crecerá en tal alcance que no se formará ácido glutámico en cantidad significativa.

25.

Hemos descubierto que cuando una cantidad menor de un inhibidor conveniente es añadida al medio de fermentación después de un periodo inicial de crecimiento del microorganismo, el crecimiento del organismo es efectivamente detenido y cantidades significantes de ácido glutámico son en-

30.



tonces acumuladas en el medio. Como inhibidor, preferimos emplear un antibiótico tal como penicilina, cefalosporina C, oxamicina, novobiocina, oxytetraciclina, clorotetraciclina, tetraciclina, estreptomina, bacitracina y similares. Sin embargo, otros inhibidores tales como fenol, propionato de sodio, resorcinol, cetyltrimetilamonio bromuro y similares pueden ser usados con éxito, si se desea.

De los inhibidores útiles en esta invención, preferimos emplear un antibiótico del grupo ejemplificado por penicilina, cefalosporina y oxamicina. De éstos, la penicilina es altamente satisfactoria. Cuando se hace referencia aquí a la penicilina, el término se intenta que incluya los diversos miembros del grupo de la penicilina tales como Penicilina G, fenoxietilo penicilina, fenoximetilo penicilina, y otros llamados "penicilinas sintéticas" que pueden ser producidas por métodos conocidos en la técnica.

La penicilina es normalmente añadida al medio fermentador en la forma de una sal tal como la procaína, dibenzil-etilenediamina, o similares sales amino, o una sal metal tal como penicilina de calcio, de sodio o de potasio. Dado que la fermentación es conducida en un medio acuoso, es conveniente emplear una sal de penicilina soluble al agua, y con este propósito preferimos emplear una solución acuosa de penicilina de potasio o sodio. Solamente pequeñas cantidades de antibiótico se requieren. La inhibición del crecimiento con acumulación de ácido glutámico resultante se obtiene cuando se añade solamente 0.05 unidades de penicilina por ml. de caldo de fermentación aunque para resultados óptimos es preferible emplear de alrededor de 0.05 unidades de penicilina por ml. de caldo de fermentación aunque para resultados óptimos es preferible emplear de alrededor de 0.2 a alrededor de 10 unidades/ml. de caldo. Cantidades mayores no afectan la acumulación de ácido



glutámico y pueden ser usadas si se desea. La cantidad óptima variará algo, aumentando con el contenido biotino del medio.

- De acuerdo con la invención, el inhibidor, tal como penicilina, es añadido a la fermentación después de un crecimiento inicial de organismo terminado. De esta manera, es deseable que el organismo se desarrolle aproximadamente en la extensión que tendría lugar en presencia de alrededor de 1.0-5.0 partes por billón de biotino. El crecimiento de celdillas es convenientemente seguido midiendo la densidad óptima del medio de fermentación a intervalos periódicos por el método descrito en el Ejemplo 1. El inhibidor es preferiblemente añadido cuando la densidad óptica de todo el caldo está dentro del promedio de alrededor de 15 a 30. Deberá señalarse, sin embargo, que este representa un aspecto preferido de la invención y se obtienen ventajosos resultados cuando el inhibidor es cargado en sus etapas primera o última de fermentación, y se han obtenido buenos resultados añadiéndolo cuando la densidad óptica del medio alcanza un valor de alrededor de 5. Se apreciará por los técnicos en la materia que esta densidad óptica puede ser convertida a por ciento de aumento en volumen de celdilla, y este aumento empleado como la medida del crecimiento. En la mayoría de los casos, algún desarrollo del microorganismo y aumento en el volumen de celdilla continuará hasta después de la adición del inhibidor, pero el aumento no es continuo e incontrolado.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

- Los inhibidores que son preferidos para uso en nuestra invención son aquéllos que alteran la permeabilidad de la pared de la celdilla o membrana de celdilla del microorganismo requirente de biotino, productor de ácido glutámico para que el ácido glutámico elaborado por el organismo pueda ser relevado al medio de fermentación. Tal relevo de ácido glutámico al medio que lo rodea por la celdilla, permite que el
- 30.



organismo biosintetice continuamente el ácido glutámico, que de otra manera no podría hacerse. Los inhibidores más satisfactorios en el proceso de esta invención son aquellos que provocan la relación de ácido glutámico extracelular a ácido glutámico intracelular para ser mayor de 50. En la mayoría de las veces también provocan una disminución de cuando menos alrededor del 50% en el nivel del ácido glutámico intracelular sobre el nivel del ácido glutámico intracelular encontrado cuando el inhibidor no es usado. Hemos encontrado que los antibióticos penicilina, cefalosporina C, estreptomycinina y oxamicina son altamente eficientes y satisfactorios inhibidores.

5.
10.

La fermentación por sí misma, incluyendo la composición del medio nutriente y las condiciones empleadas, son aquellos conocidos en el arte como convenientes para la producción directa de ácido glutámico en un medio nutriente con un microorganismo requiriente de biotino, productor de ácido glutámico. El medio nutriente deberá contener una fuente de carbono y nitrógeno, y contiene también normalmente cantidades menores de sales y minerales tales como fosfato, sulfato, magnesio, manganeso y potasio. En algunos casos, estos componentes menores pueden ser suplidos por el nutriente usado como fuente de carbohidrato. Por supuesto, el medio también contiene biotino.

15.
20.

Como fuente de carbohidrato se pueden usar cualesquiera de aquellos materiales que son normalmente empleados en la fermentación, tales como dextrina, mieles de betabel, mieles de caña, jarabe de maíz, melasas de zarzamora negra, melasas de alta experimentación, y similares. Esencialmente, todos estos materiales contienen biotino y actúan como fuente de biotino para el organismo. Cuando se emplea en las cantidades requeridas para suministrar suficiente carbohidrato, sin embargo, una cantidad excesiva de biotino es frecuentemente introducida y es por esta razón que la adición de inhibidores, y preferiblemente de anti-

25.
30.



bióticos, de acuerdo con nuestra invención, se hace necesaria. Haciendo referencia a una cantidad excesiva de biotino, deseamos dar a entender una cantidad sobre la concentración requerida tanto para el crecimiento óptimo como para la producción de ácido glutámico. El nitrógeno puede ser suministrado por medio de las sales orgánicas o inorgánicas, o por complejos nutrientes tales como licor de granos de maíz, amoniaco o urea. En aquellos casos en donde la fuente nitrógeno contiene biotino, el inhibidor se sobrepondrá al efecto adverso de cualquier excedente biotino.

5.

10.

Es importante que el pH del medio de fermentación sea controlado para producción óptima de ácido glutámico. Preferimos mantener el pH entre 6.0 y 8.5, y deseablemente entre 6.5 y 8.0. Esto se logra convenientemente por la adición de urea o amoniaco como sea necesario durante la fermentación, aunque pueden ser empleadas bases tales como hidróxidos de metal álkalí, ya sea sólo o en combinación con hidróxido de amoniaco, si se desea. Llevamos a cabo las fermentaciones a temperaturas de alrededor de 26-34° C., aunque la temperatura preferida variará dependiendo del microorganismo que esté siendo empleado.

15.

20.

La fermentación es conducida bajo condiciones aeróbicas por un período de alrededor de 24-72 horas y preferiblemente de alrededor de 38-60 horas. Con la mayoría de los organismos, los tiempos de fermentación de alrededor de 48 horas dan resultados altamente satisfactorios. Al terminar este tiempo, cantidades substanciales de ácido glutámico, v.gr., en exceso de 15 gramos por litro, han sido acumuladas aún en un medio conteniendo cantidades excesivas de biotino cuando un inhibidor tal como penicilina ha sido añadido de acuerdo con la presente invención.

25.

30.

El ácido glutámico así producido puede ser recuperado del medio por métodos conocidos en el arte. Estos incluyen absorción en y elución de resinas convenientes de intercambio



de ion, remoción de las celdillas y concentración del filtrado con-
teniendo ácido glutámico, y/o absorción en alúmina ácido-lavada y
elución de la misma con ácido hidroclopórico diluido.

5 Al llevar a cabo el proceso de nuestra invención, el microorga-
nismo particular empleado en la fermentación no es crítico y cual-
quier organismo dependiente de biotino, productor de ácido glutámi-
co es conveniente. Estos incluyen bacteria, levaduras y fungi, ta-
les como deformaciones productoras de ácido glutámico de Bacillus
subtilis, Escherichia coli, Micrococcus glutamicus, Bacillus mega-
10 terium--Bacillus cereus en tipos intermedios, Brevibacterium diva-
ricatum, Brevibacterium aminogenes, Arthrobacter globiforme, Baci-
llus megaterium, Brevibacterium alanicum, Brevibacterium lactofer-
mentus y similares.

15 Los siguientes ejemplos ilustran métodos de realización de la
presente invención, pero también debe entenderse que los mismos se
dan con propósitos de ilustración y no de limitación.

EJEMPLO 1

A. Un medio acuoso teniendo la siguiente composición fué prepa-
rado:

	<u>% (por peso)</u>
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.004
25 K ₂ SO ₄	0.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2
Urea	0.5
Melasa de alta experimentación para dar una concentración de 30 carbohidrato de	12.7

El sulfato de amoniaco y urea fueron esterilizados separadamen-
te a 100°C., y el remanente del medio esterilizado a 120°C. por alre-
dedor de un minuto. El medio contiene 37.5 partes por billón de bio-



tino (de las melasas). 3.0 litros de este medio en un fermentador de 5 litros equipado con agitador y entrada de aire fueron asépticamente inoculados con 8% por volumen de una cultura en desarrollo de una deformación requirente de biotino, productora de ácido glutámico, de un organismo descrito por Kinoshita et al como deformación M-560 de Micrococcus glutamicus ("Estudio Taxonómico de Bacteria acumulante de Acido Glutámico, Micrococcus glutamicus nov. sp.," BULL. AGR. CHEM. SOC. Japón, Vol. 22, Nº 3, pp. 176-185, 1958). Una cultura de este organismo está en depósito en la Colección de Cultura Tipo Americano bajo ATCC nº 13761.

La fermentación fué llevada a cabo a 33°C. con agitación (700 rpm) y aereación (1.75 litro/min.). Cantidades de 20 ml. de una solución acuosa estéril al 30% de urea fueron añadidas como fué necesario durante la fermentación para mantener el pH entre 7.0 y 8.0.

Quando la densidad óptica de la fermentación total del caldo alcanzó 20 (10-20 horas), 400 unidades de penicilina de potasio estéril g por litro de caldo fueron añadidas a la fermentación.

Al finalizar las 48 horas del tiempo de fermentación, el medio contenía 400 gms/l. de ácido glutámico.

B. En un segundo experimento llevado a cabo de la misma manera que la fermentación descrita arriba, pero sin la adición de cualquier penicilina, el medio contenía 4 gms/l. de ácido glutámico al finalizar las 48 horas.

Las medidas de densidad óptica descritas en este y ejemplos subsiguientes se llevan a cabo removiendo una pequeña porción del caldo de fermentación y diluyendo 1 ml. del caldo total a un volumen de 100 ml. con agua. La densidad de la muestra diluida es medida con un espectrofotómetro Beckman a una onda larga de 700 mμ. La lectura de densidad multiplicada por 100 da los valores de densidad óptica referidos aquí.

Los caldos de fermentación son ensayados para ácido glutámico

261620



- 11 -

por el ensayo decarboxilasa descrito en la publicación "TECNICAS MANOMETRICAS Y METODO", por Umbreit, Burris y Stauffer, 3^a Ed. Burgess Publishing Co., p. 207.

La cultura inoculum para la fermentación descrita arriba fué preparada desarrollando el organismo en un medio asemillado teniendo la composición:

	<u>%</u>
Glucosa (anhydr.)	5.0
KH ₂ PO ₄	0.05
10 K ₂ HPO ₄	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.001
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
15 Urea	0.5
Biotino	11 partes por billón.

La fermentación fué llevada a cabo con agitación y aereación a 27.5°C. por 8-14 horas a un pH de 7.0-8.0 controlado por adiciones periódicas de urea.

20 EJEMPLO 2

Quando los experimentos del Ejemplo 1A y 1B se repiten usando como microorganismo la deformación del organismo descrito en la Patente canadiense nº 562.728 como deformación de Micrococcus glutamicus nº 541 (ATCC nº 13058), se obtienen resultados similares con respecto a las cantidades de ácido glutámico producidas con y sin la adición de penicilina G de potasio.

EJEMPLO 3

Una serie de redomas batidoras Hinton de 250 ml. conteniendo cada una 35 ml. de un medio estéril acuoso teniendo la composición:

	<u>% (por peso)</u>
Dextrosa (Anhydr.)	11.5

- 12 - **261620**



$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.1
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.004
K_2SO_4	0.3
Urea	0.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2
Biotino	(como en Tabla I)

5

se inocularon con una cultura del organismo empleado en el Ejemplo I, se cubrieron las redomas con gasa estéril y se agitaron en una batidora giratoria (2ª impulsión 220 rpm) a 33°C. por espacio de 48 horas, siendo mantenido el pH entre 7.0 y 8.0 por la adición periódica de una solución estéril de urea. Como se expone en la Tabla I, la penicilina G estéril de potasio fué añadida a algunas de las redomas después de que la fermentación se había iniciado. Las redomas individuales fueron ensayadas para ácido glutámico después de 48 horas. Los resultados se asientan en la Tabla I.

15

TABLA I

	<u>Redoma</u>	<u>Biotino (p.p.b.)</u>	<u>Penicilina Potasio u/ml.</u>	<u>Adición Penicilina Añe jada</u>	<u>Acido glutámico Producido g/l.</u>	
20	Exp. A. 1	2.5	0		39	
	2	2.5	0		32	
	3	2.5	0		33	
	4	37.5	2	2 horas	29	
	25	5	37.5	2	2 horas	26
		6	37.5	2	4 horas	32
		7	37.5	2	4 horas	38
30	Exp. B. 1	37.5	0		3	
	2	37.5	0		4	
	3	2.5	0		39	
	4	2.5	0		38	
	5	2.5	0		40	

281620



EJEMPLO 4.

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo con el organismo y bajo las condiciones del Ejemplo 1 en el medio siguiente:

	Medio A %	Medio B %
5		
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1	0.1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.1	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	0.05
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.004	0.004
K ₂ SO ₄	0.3	0.3
10		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	0.2
Urea	0.5	0.5
Dextrosa Monohidrato	12.5	---
Melazas de alta experimentación para dar la concentración de carbohidrato de	----	12.5
15		
Biotino	37.5 partes por billón	37.5 partes por billón

x Presentes en la melaza.

La penicilina G de potasio (como solución estéril acuosa) igual a 5000 μ/l de caldo fué añadida a la fermentación con Medio A cuando la densidad óptica del caldo se elevó a alrededor de 6. Esto ocurrió una hora después de que la fermentación hubiese empezado. Una segunda adición igual de penicilina se hizo para fermentar el Medio A 38 horas después de la inoculación. No se añadió penicilina al Medio B.

Los siguientes rendimientos de ácido glutámico fueron obtenidos:

	Inoculación después de añejado	Acido glutámico (gms./l.)
Medio A	48	29
Medio B	46	4

EJEMPLO 5

Se llevaron a cabo dos fermentaciones con el organismo y bajo

261620



las condiciones del Ejemplo 1. Cuando la densidad óptica del caldo alcanzó un valor de alrededor de 20, se añadieron 4 unidades de penicilina G de potasio por ml. de caldo al primer fermentador y 100 unidades de penicilina G de potasio por ml. de caldo se añadieron al otro fermentador. Al finalizar 48 horas, 30 gms./l. de ácido glutámico estaban presentes en la primera fermentación, y 33 gms./l. de ácido glutámico fueron encontrados en la segunda fermentación.

EJEMPLO 6

A. Un medio acuoso fué preparado con la siguiente composición:

	<u>% (por peso)</u>
NH ₄ H ₂ PO	0.1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.004
H ₂ SO ₄	0.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2
Urea	0.4
Despumador Swift #51	0.02 (por vol.)
Dextrosa para dar una concentración carbohidrato de	12.7
Biotino	2.5 /litro

El sulfato de potasio y sulfato de amoníaco fueron esterilizados juntos y la urea esterilizada separadamente a 115°C., el biotino esterilizado separadamente a 120°C., y el remanente del medio es terikizado a 115°C. 14,000 litros de este medio en un fermentador equipado con agitador y entrada de aire fueron asépticamente inoculados con 9.2% por volumen de una cultura en desarrollo de una deformación requisiente de biotino, productora de ácido glutámico, de un organismo descrito por Kinoshita et al como deformación M-560 de Micrococcus glutamicus (Estudio Taxonómico de Bacteria Acumulante de Acido Glutámico, Micrococcus Glutamicus nov. sp., BULL. AGR. CHEM. SOC. Japón, Vol. 22, nº 3, pp. 176-185, 1958). Un organismo



de esta cultura ha sido depositado en la Colección de Cultura Tipo Americano bajo ATCC nº 13761.

La fermentación fué llevada a cabo a 33°C. con agitación (100 rpm) y aereación (10 mt³ x 104 cm./min.) bajo una presión positiva de 2.54 x 6.541 cm.2. Proporciones de una solución acuosa de urea al 30% fueron añadidas como fué necesario durante la fermentación para mantener el pH entre 7.0 y 8.0.

B. Después de un periodo de fermentación de 18 horas, un alícuota del caldo total fué removido. Porciones de 200 ml. de esta mezcla fueron centrifugadas y el licor supernatante removido. A las celdillas mojadas se añadió una solución acuosa de amortiguador de fosfato 0.1 M y la solución llevada a un volumen de 200 ml. Se añadió dextrosa para dar una concentración final de 7.5-8.0%. A esta solución se añadió una pequeña cantidad de indicador pH (Fenol Rojo -Azul Brom Timol) y esta solución dividida en porciones de 35 ml. en redomas batidoras Hinton. A estas redomas se añadió biotino y fenoxymetilo en las cantidades indicadas en la siguiente tabla. Las redomas fueron cubiertas con gasa estéril y agitadas en una batidora giratoria (2" impulsión, 220 rpm) a 33°C. por 21-1/2 horas, el pH siendo mantenido entre 7.0 y 8.0 por la adición periódica de una solución estéril de urea. Al final de las 21-1/2 horas las redomas individuales fueron ensayadas para ácido glutámico. Los resultados se asientan abajo:

Redoma	Biotino (-litro)	Antibiótico (Unidades/ml.)	Acido glutámico (mg./ml.)
1-4	35	0	14.1
5-8	35	3.5	31.3
9-12	35	35.0	35.9
13-16	35	100	36.9

EJEMPLO 7

El experimento del Ejemplo 6 fué repetido excepto que el alícuota del caldo total fué removido después de un periodo de fermentación



tación de 14 horas, y una concentración de dextrosa de 7.5% y un periodo de incubación de 24 horas empleado en el procedimiento del Ejemplo 6 B.

5. El antibiótico usado era una penicilina -fenoxietilo (Syn-cillin) en lugar de fenoximetilo penicilina. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Redoma	Biotino (/litro)	Antibiótico (unidades/ml.)	Acido glutámico (mg./ml.)
1-4	35	0	4.1
5-8	35	3.5	33.2
10. 9-12	35	35.0	36.0
13-16	35	100	37.3

EJEMPLO 8

15. El ejemplo 6 fué repetido con las siguientes modificaciones; el alícuota de caldo fué removido de la fermentación después de 20 horas, la incubación del ejemplo 6B fué llevada a cabo por espacio de 21 horas usando una concentración de dextrosa de 7.5%. La oxamicina fué añadida a las redomas en lugar de la penicilina fenoximetilo. Los siguientes resultados fueron obtenidos:

Redoma	Biotino (/litro)	Oxamicina (/ml.)	Acido Glutámico (mg./ml.)
20. 1-4	35	0	2.4
9-12	35	300	27.2
13-16	35	500	30

EJEMPLO 9

25. Una serie de redomas batidoras Hinton de 250 ml. conteniendo cada una 35 ml. de un medio estéril acuoso con la composición:

	<u>% (por peso)</u>
R Dextrosa	11.5
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.1
30. MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.004

261620



	K_2SO_4	0.3
	Urea	0.5
	$(NH_4)_2SO_4$	0.2
	Biotino	37.5 partes por billón
5.	Indicador Rojo Fenol	0.0005
	Indicador Azul Brom Timol	0.0005

fueron inoculados con una cultura requiriente de biotinom productora de ácido glutámico del organismo Micrococcus glutamicus, las redomas cubiertas con gasa estéril, y

10. agitadas en una batidora giratoria (2" impulsión, 220 rpm) a 33^o C. por 48 horas, el pH siendo mantenido entre 7.0 y 8.0 por la adición periódica de una solución estéril de urea al 15%. Como se asienta en la siguiente tabla, se añadieron varias substancias a grupos de las redomas después de que la fermentación se había iniciado. Las redomas fueron ensayadas para ácido glutámico después de 48 horas.
- 15.

TABLA II

	Redoma	Antibiótico	/ml.	Adición antibiótico Añejado	Acido Glutámico Producido (g/l.)
20.	1-2	Oxitetraciclina	7	4	6
	3-4	"	10	5	10.5
	5-6	"	9	6	17
	7-8	"	8	7	14.5
	9-10	"	7	8	8
25.	11-14	"	0	---	4
	1-2	Sulfato Dihidro- treptomocina	4	3	8
	3-4	"	4	4	9
	5-6	"	0	---	4
30.	1-2	Novobiocin	1000	2	17
	3-4	"	1000	3	14

	5-6	"	1000	4	14
	7-8	"	0	---	3.5
	1-2 ^{XX}	Sulfato Neomi- cyn	350	3	10
	3-4	"	200	4	10.5
5.	5-6	"	400	4	8
	7-10	"	250	5	12
	11-14	"	300	6	14
	15-16	"	150	7	10
	17-18	"	200	8	13
10.	19-22	"	0	---	6

X

Promedio de redomas

XX

Medio contenido en 35 p.p.b. de biotino

EJEMPLO 10

15. A. Se llevó a cabo una fermentación de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 6A. Después de una fermentación por espacio de 18 horas una porción alícuota del caldo total fué removida. Porciones de 200 ml. del alícuota fueron centrifugadas y descartadas las supernatantes. Las celdillas mojadas así obtenidas fueron mezcladas con fosfato calmante 0.1 M para dar un
20. volumen final de 200 ml. Se añadió dextrosa a la concentración de 7.8%, así como una pequeña cantidad de solución de fenol azul timol rojo-brom indicadora del pH. Porciones de 35 ml. de las suspensiones resultantes de celdillas en reposo se cargaron
25. a redomas batidoras Hinton. Biotino y oxitetraciclina en las cantidades indicadas en la siguiente Tabla se añadieron a las redomas individuales. Las redomas fueron cubiertas con gasa estéril y agitadas en una batidora giratoria (2" impulsión, 220 rpm) a 33° C. por 22-1/2 horas. El pH fué mantenido entre
30. 7 y 8 por la adición (como requerido) de una solución estéril de urea. Después de 22-1/2 horas las redomas fueron ensayadas para contenido ácido glutámico. Los resultados se muestran en



la siguiente Tabla, la numeración del ácido glutámico siendo un promedio de 4 redomas:

Redoma	Biotino (/litro)	Oxitetraciclina (/ml.)	Acido Glutámico (mg./ml.)
a-d	0	0	37.4
5. e-h	35	0	3.2
i-l	35	5	22.2
m-p	35	10	23.9
q-t	35	20	22.8
u-x	0	5	34.5

10. B. El efecto de cloramfenicol, oxitetraciclina y otros compuestos se determinó repitiendo el anterior experimento con las siguientes modificaciones: Las celdillas fueron recolectadas después de 19 horas de tiempo de fermentación, la concentración de dextrosa fué de 7.5% y la suspensión de celdillas lavadas fué incubada por espacio de 16 horas en lugar de 22-1/2 horas. Los siguientes resultados fueron obtenidos:

Redoma	Biotino (/l.)	Inhibidor	Concentración de Inhibidor	Acido Glutámico (mg./ml.)
1-4	20	--	--	6.9
5-6	20	Cloramfenicol	8 /ml.	19.4
20. 7-8	20	Cloramfenicol	5 /ml.	15.0
9-10	20	Resorcinol	0.3%	11.8
11-12	20	Oxitetraciclina	8 /ml.	20.3
13-14	20	Clortetraciclina	8 /ml.	19.7
15-16	20	Bromuro Cetriltri metilamonio	0.005%	14.6
25. 17-18	20	Propionato de Sodio	0.1%	15.4

EJEMPLO 11

Un medio de fermentación fué preparado con la siguiente composición:

261620



	<u>Gms./l.</u>
Dextrosa (anhidr.)	45.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.0
(NH ₄)H ₂ PO ₄	1.0
5. MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg.
MnSO ₄ ·1H ₂ O	40 mg.
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
K ₂ SO ₄	3.0
10. Urea	5.0
Biotino	100 microgramos
B ₂ O Destilado	a l l.

El medio fue esterilizado calentándolo a 120° C., 15 p.p.c.

40 ml. de medio fueron añadidos a cada una de las series de redomas con divisiones de 250 ml. y cada redoma inoculada con 0.4 ml. de una suspensión estéril acuosa de elementos del organismo usado en el ejemplo 1. La inoculación fué obtenida por suspensión de una cultura Agar en botella Blake del organismo en 15 ml. de agua estéril. La fermentación fué llevada a cabo en una batidora giratoria de 220 rpm a 28° C.

A algunas de las redomas se añadió un inhibidor después de la fermentación por espacio de 12 horas. La cantidad de desarrollo de celdillas, las cantidades de ácido glutámico en el caldo de fermentación y en las celdillas se determinaron a intervalos periódicos. Los resultados asentados en las siguientes Tablas.

En la Tabla I de abajo se presentan los resultados de los experimentos en los que no se añadió inhibidor. Las fermentaciones, resultados de los cuales se reportan en la Tabla II, fueron llevadas a cabo de la misma manera que las de la Tabla I excepto que se añadieron 40 unidades de Penicilina G de sodio después de 12 horas de fermentación.



TABLA I

	Añejado (hr.)	Peso Seco Celdillas Desarrollo (mg./ml.)	pH	Acido Glutámico Celd. ug./mg.	Super ug./ml.	Relación Acido Glutámico Caldo/Celdillas
	8	0.44	8.1	17.2	40.	5.3
5.	10	1.32	8.1	21.4	58.	2.06
	12	1.77	8.1	23.4	69.	1.66
	14	7.97	7.6	25.9	91.	0.44
	16	10.3	6.7	29.6	129.	0.39
	18	9.82	5.7	27.2	237.	0.89
10.	20	5.92	5.3	8.5	194.	3.86
	22	10.9	5.2	12.5	333.	2.46

TABLA II

	8	0.75	8.35	20.0	25.	1.67
15.	10	2.22	8.25	30.0	35.	0.52
	12	3.68	8.15	34.0	73.	0.58
	14	2.96	7.8	6.2	641.	36.00
	16	2.54	8.0	2.7	1580.	220.0
	18	2.81	7.4	3.8	3110.	280.0
20.	20	2.17	7.65	6.2	3660.	280.0
	22	2.22	7.5	6.1	4790.	340.0
	24	2.62	6.0	10.0	6970.	270.0

25. Las Tablas III, IV y V que aparecen abajo contienen los resultados de experimentos similares en donde se añadieron 400 /ml. de novobiocin en el período de 12 horas (Tabla III), 10 de estreptomycin por ml. de caldo de fermentación, como el complejo estreptomycin de cloruro de calcio, fueron añadidos después de doce horas de fermentación (Tabla IV), y se añadieron 15 L/ml. de Cefalosporina C de sodio por ml. de caldo de fermentación después de 12 horas (Tabla V).

261620



TABLA III

	Afiejado (hr.)	Peso Seco Celdillas Desarrollo (mg./ml.)	pH	Acido Glutámico Celd. ./mg.-	Super ./ml.	Relación Acido Glutámico Caldo/Celdillas
	8	0.22	8.1	16.3	19.	5.2
5.	10	0.79	8.2	25.7	39.	1.95
	12	1.64	8.25	33.3	64.	1.08
	14	2.05	8.3	19.8	154.	3.85
	16	2.22	8.35	15.6	282.	8.15
	18	3.39	8.2	12.8	598.	13.8
10.	20	4.78	7.95	11.6	1122.	20.3
	22	2.92	8.35	10.5	1051.	33.
	24	2.96	8.4	822	1401.	57.5
	24 (Control)	10.82	5.4	9.4	278.	2.72

15.

Tabla IV

	8	0.58	8.2	21.2	39.	3.2
	10	1.00	8.2	16.0	45.	2.8
	12	2.10	8.0	26.7	40.	0.71
	14	3.65	7.85	31.6	243.	2.1
20.	16	6.12	7.0	30.3	399.	2.15
	18	6.84	7.1	23.5	998.	6.2
	20	3.74	7.8	10.0	1328.	35.
	22	3.65	8.0	4.55	1488.	89.
	24	7.66	5.95	7.1	1329.	24.6
25.	24 (Control)	11.67	5.45	8.8	273.	2.7

TABLA V

	8	1.81	8.3	13.6	34.	1.38
	10	2.34	8.3	2100	39.	0.79
30.	12	4.86	8.05	24.4	40.	0.34



	14	5.29	7.7	0.8	900.	214.
	16	5.11	7.45	0.93	2389.	504.
	18	7.29	6.2	1.55	3556.	314.
	20	6.12	5.3	2.07	5880.	465.
5.	22	6.68	5.1	1.44	5490.	570.
	24	9.38	5.0	0.84	3970.	500.
	24 (Control)	14.98	5.5	10.1	343.	0.225

N O T A

10. Descrito suficientemente el procedimiento que se presenta como objeto de la patente solicitada, se declara que lo que constituye la esencialidad de ese objeto es lo que se concreta en las siguientes reivindicaciones:

15. 1ª.- Procedimiento para la producción de ácido glutámico por fermentación de un medio nutriente con un microorganismo requiriente de biotino, productor de ácido glutámico, caracterizado por presentar la etapa que comprende añadir un antibiótico al medio fermentante subsecuente a la inoculación del medio con dicho microorganismo.

20. 2ª.- Procedimiento para la producción de ácido glutámico, según la reivindicación anterior, caracterizado, además, por comprender el desarrollo de un microorganismo requiriente de biotino, productor de ácido glutámico, en un medio nutriente conteniendo biotino bajo condiciones aeróbicas, y añadiendo penicilina a dicho medio de fermentación después de que un desarrollo substancial ha tenido lugar.

30. 3ª.- Procedimiento para la producción de ácido glutámico por fermentación de un medio nutriente con un microorganismo requiriente de biotino, en donde el medio nutriente contiene biotino en exceso de la cantidad requerida para el desarrollo substancial del organismo, según las reivindicaciones anterior-



res, caracterizado, además por presentar la etapa que comprende añadir penicilina al medio fermentante después de que un desarrollo substancial del microorganismo ha tenido lugar.

5. 4^a.- Procedimiento para la producción de ácido glutámico por fermentación de un medio nutriente conteniendo un exceso de alrededor de 5 partes por billón de biotino, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además, por comprender la adición de una cantidad menor de penicilina al medio fermentante después de que un desarrollo substancial del microorganismo ha tenido lugar.

10. 5^a.- Procedimiento para la producción de ácido glutámico por fermentación, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, por que una sal de metal álcali de Penicilina G es añadida al medio de fermentación.

15. 6^a.- Procedimiento para la producción de ácido glutámico por fermentación de un medio nutriente con un microorganismo requiriente de biotino, en el que dicho medio contiene en exceso de alrededor de 5 partes por billón de biotino, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además, por presentar la etapa que comprende añadir penicilina al caldo de fermentación cuando la densidad óptica de dicho caldo es alrededor de 15.

20. 7^a.- Procedimiento para la producción de ácido glutámico por fermentación de un medio nutriente con un microorganismo requiriente de biotino, productor de ácido glutámico, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además, por presentar la etapa que comprende añadir un inhibidor al medio fermentante subsecuente a la inoculación del medio con dicho microorganismo.

25. 8^a.- Procedimiento para la producción de ácido glutámico por fermentación de un medio nutriente con un microorganismo requiriente de biotino, productor de ácido glutámico, caracterizado, además, por comprender la adición de un inhibidor al

30.

261620



medio de fermentación, siendo tal inhibidor aquél que provoca una disminución de ácido glutámico intracelular a nivel menor que la mitad de aquél de fermentación conducida sin inhibidor, mientras se aumenta simultáneamente la relación de ácido glutámico extracelular a intracelular a un valor mucho mayor de 50, siendo conducido tal proceso dentro del promedio pH de 6.0 a 8.5.

5. 2^a. - Procedimiento para la producción de ácido glutámico por fermentación.

Todo según queda descrito y reivindicado en la presente Memoria que consta de veinticinco hojas foliadas y escritas a máquina por una de sus caras.

Madrid, 8 de octubre de 1.960.

EL AGENTE,
P. P.