

mc/

Caso AJI-Q

267086

267086

22



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

a favor de

AJINOMOTO KABUSHIKI KAISHA y SANRAKU SCHUZO KABUSHIKI KAISHA
de nacionalidad japonesa - domiciliadas en TOKYO (Japón),
Nº. 7, 1-chome, Takaracho, Chuo-Ku,

por:

" Procedimiento para la obtención 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 un procedimiento para producir ácido L-glutámico, y particularmente a un procedimiento nuevo y original para obtenerlo mediante fermentación, empleando bacterias.



Se han dado a conocer hasta ahora diversos métodos para producir ácido L-glutámico por fermentación empleando bacterias que lo originan. Por ejemplo, se han descripto ya métodos de producción de ácido L-glutámico mediante cultivo de las precitadas bacterias en condiciones aeróbicas, en un medio que contenga carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, hidrolizados de almidón o sus análogos, y generadores de nitrógeno tales como sales amónicas inorgánicas u orgánicas, urea, amoniaco líquido, amoniaco gaseoso y similares como componentes primarios, así como una pequeña cantidad de aminoácidos, vitamina B₁ y sales inorgánicas como fosfatos de potasio, sulfato de magnesio, ion de hierro, ion de manganeso y análogos. Pero en esos métodos usuales, el desarrollo de bacterias fermentativas es escaso, y muy bajo el rendimiento, o sea la cantidad de ácido L-glutámico producido por hora. Por consiguiente, esos métodos corrientes son antieconómicos e inestables para la obtención de ácido L-glutámico a gran escala, por ser escaso el desarrollo de bacterias de fermentación, a causa de falta de las substancias nutritivas que requieren.

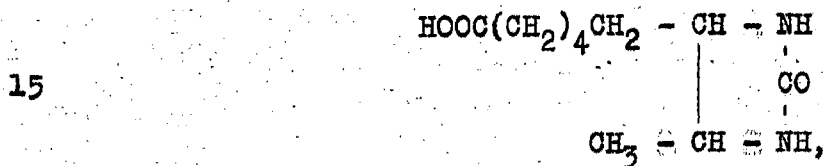
Un objeto de este invento es proporcionar un procedimiento nuevo de producción de ácido L-glutámico, en el que la cantidad de este ácido producida y acumulada en el medio de cultivo aumenta inesperadamente. Otro objeto de este invento es proporcionar un procedimiento de producción de ácido L-glutámico con eficacia y a escala industrial. Otros objetos y ventajas de este invento se apreciarán por la siguiente descripción detallada.

Se ha descubierto ahora que es posible producir efi-

22 AD



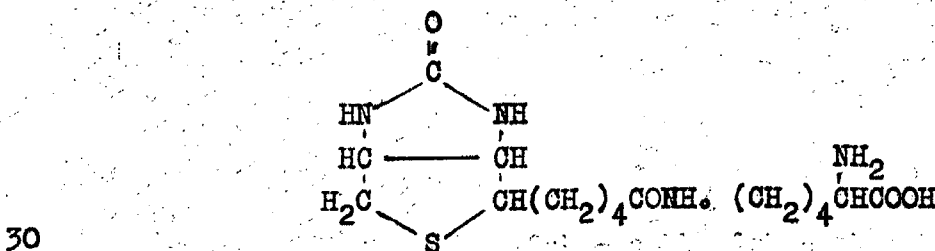
cazmente ácido L-glutámico en gran cantidad y en poco tiempo cultivando bacterias que lo originan en condiciones aeróbicas, en presencia de un miembro por lo menos del grupo integrado por destiobiotina, d-sulfóxido de biotina y biocitina en el medio de cultivo ya descrito para la fermentación de ácido L-glutámico. De conformidad con este invento, se produce ácido L-glutámico cultivando bacterias que lo producen, pertenecientes al género Brevibacterium, en condiciones aeróbicas, en un medio de cultivo que contenga por lo menos un miembro seleccionado del grupo consistente en destiobiotina (ácido 5-metil-2-oxo-4-imidazolidin-caproico), de fórmula



d-sulfóxido de biotina, de fórmula



25 y biocitina, de fórmula





con carbohidratos, generadores de nitrógeno y sales inorgánicas como componentes primarios.

5 Según el procedimiento del invento, se acelera el ritmo de crecimiento de las bacterias de fermentación, y se aumenta la cantidad de ácido L-glutámico producido y acumulado.

10 Como queda dicho, aunque existen multitud de métodos en materia de fermentación de ácido L-glutámico empleando bacterias, no se conocen con anterioridad al presente invento informes de que la eficacia y el rendimiento de tal fermentación aumenten de modo notable cultivando esas bacterias en un medio que contenga por lo menos destiobiotina, d-sulfóxido de biotina o biocitina.

15 En caso de fermentación con diversas cepas del género Brevibacterium capaces de producir ácido L-glutámico, la influencia de la adición de destiobiocina, d-sulfóxido de biotina o biocitina se expresa en las siguientes tablas, con las cantidades de ácido L-glutámico respectivamente producidas.



TABLA I 267086

Bacteria empleada	Brevibacterium lactofermento ATCC Nº. 13869	Brevibacterium saccharolyticum ATCC Nº. 14066	Brevibacterium flavum ATCC Nº. 14067
Análisis	Cre- Azú- Acido ci- car L-glu- mien- resi- támico to dual produ- to (%) cido (%)	Cre- Azú- Acido ci- car L-glu- mien- resi- támico to dual produ- to (%) cido (%)	Cre- Azú- Acido ci- car L-glu- mien- resi- támico to dual produ- to (%) cido (%)
DL-destio biotina (/lit.)			
0	0.11 85.3 6.3	0 92.5 0.7	0.14 83.2 4.3
6	0.59 31.9 30.4	0.46 36.4 21.2	= = =
8	0.70 17.2 37.6	0.65 10.2 36.0	0.52 25.8 39.5
10	= = =	- - =	0.60 7.1 49.2
12	0.80 5.9 42.5	0.68 26.0 44.7	0.65 0.6 44.7
16	0.92 5.4 38.5	= = =	= = =



267086

TABLA I (continuación)

Bacteria empleada	Brevibacterium immariophilum ATCC N ^o . 14068			Brevibacterium roseum ATCC N ^o . 13825		
Análisis	Cre- ci- mien- to	Azú- car resi- dual (%)	Acido L-glu- támico produ- cido (%)	Cre- ci- mien- to	Azú- car resi- dual (%)	Acido L-glu- támico produ- cido (%)
DL-destio- biotina (γ/lit.)						
0	0.18	78.2	2.9	0.15	80.8	3.9
6	0.-	=	=	=	=	=
8	0.52	38.2	17.0	0.50	34.4	32.0
10	0.60	4.5	29.1	0.73	1.9	49.8
12	0.65	1.5	27.4	0.78	0.8	39.8
16	=	=	=	=	=	=



22
267086

Todos los experimentos relacionados en la
 tabla I, excepto los realizados con Brevibacterium
lactofermentum ATCC N^o. 13869, se hicieron a una tem-
 peratura de 30°C durante 40 horas, cultivando con agi-
 tación en un medio compuesto de

5

Glucosa	10.4 %
KH ₂ PO ₄	0.1 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04 %
Fe ⁺⁺	2 p.p.m.
Mn ⁺⁺	2 p.p.m.
Hidrolizado de pro- teínas de soja (N to- tal, 2.4 g/dl.)	0.1 ml/dl
Clorh. de vitamina B ₁	200 γ/l.
Urea	1.8-3.6 %

10

15

20

En el caso del Brevibacterium lactofermentum
 ATCC N^o. 13869, se emplearon 50 γ /lit. de clorhidra-
 to de vitamina B₁ y 0.9-3.2% de urea.



TABLA II

267086

Bacteria empleada	Brevibacterium lactofermentum ATCC N ^o . 13869			Brevibacterium saccharolyticum ATCC N ^o . 14066		
	Cre- ci- mien- to	Azú- car resi- dual (%)	Acido L-glu- támico produ- cido (%)	Cre- ci- mien- to	Azú- car resi- dual (%)	Acido L-glu- támico produ- cido (%)
D-sulfó- xido de biotina (μ /lit.)						
0	0.10	76.8	13.4	0.00	92.5	0.7
2	0.34	48.0	21.7	0.24	20.3	15.0
4	0.45	22.7	36.9	=	=	=
5	=	=	=	=	=	=
6	=	=	=	=	=	=
8	0.67	1.3	45.1	=	=	=
12	=	=	=	0.70	0.4	40.1

267086

22



TABLA II (continuación)

Bacteria empleada	Brevibacterium flavum ATCC Nº. 14067			Brevibacterium roseum ATCC Nº. 13825		
Análisis D-sulfóxido de biotina (X/lit.)	Cre- ci- mien- to	Azú- car resi- dual (%)	Acido l-glu- támico produ- cido (%)	Cre- ci- mien- to	Azú- car resi- dual (%)	Acido l-glu- támico produ- cido (%)
0	0.14	83.2	7.6	0.15	80.8	10.1
2	=	=	=	0.37	46.2	25.0
4	-	-	-	=	=	=
5	=	=	=	0.80	2.0	46.3
6	0.68	0.7	50.1	=	=	=
8	=	=	-	-	-	-
12	=	-	-	=	=	=

22 ADP
267086



TABLA II (Continuación)

Bacteria empleada	Brevibacterium lactofermentum ATCC N ^o . 13869			Brevibacterium saccharolyticum ATCC N ^o . 14066		
Biocitina (γ/lit.)	Cre- ci- mien- to	Azú- car resi- dual (%)	Acido L-glu- támico produ- cido (%)	Cre- ci- mien- to	Azú- car resi- dual (%)	Acido L-glu- támico produ- cido (%)
0	0.10	78.6	11.1	0.00	92.5	0.7
2	0.31	49.8	19.6	=	=	=
3	0.43	31.3	27.3	=	=	=
4	=	=	=	=	=	=
6	0.59	4.8	41.9	0.33	18.8	16.3
8	=	=	=	=	=	=
16	=	=	=	0.70	0.4	34.7



TABLA II (continuación)

267086

Bacteria empleada	Brevibacterium flavum ATCC N ^o . 14067			Brevibacterium roseum ATCC N ^o . 13825		
Análisis	Cre- ci- mien- to	Azú- car resi- dual (%)	Acido L-glu- támico produ- cido (%)	Cre- ci- mien- to	Azú- car resi- dual (%)	Acido L-glu- támico produ- cido (%)
Biociti- na (γ lit.)						
0	0.14	83.2	7.6	0.15	80.8	10.1
2	=	=	=	=	=	=
3	=	=	=	=	=	=
4	0.44	37.2	38.2	0.51	24.9	39.2
6	=	=	=	0.73	2.0	47.7
8	0.66	1.0	47.3	=	=	=
16	=	=	=	=	=	=



267086

Todos los experimentos descritos en la tabla II se practicaron a una temperatura de 31°C durante 40 horas, cultivando con agitación en un medio compuesto de los siguientes ingredientes:

5

Glucosa	10 %
KH_2PO_4	0.1 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04 %
Fe^{++}	2 p.p.m.
Mn^{++}	2 p.p.m.

10

Hidrolizado de proteínas de soja (N total 2.4 g/dl.)	0.1 ml/dl.
Clorhidrato de vitamina B ₁	200 γ/lit.
Urea	0.9-3.2 %.

15

En las tablas precedentes, el "crecimiento" denota el grado de turbiedad en medio de cultivo diluido 26 veces a 562 mμ, y las proporciones de "azúcar residual" y de "ácido L-glutámico producido" se basan en el peso de los sacáridos naturales cargados.

20

Se aprecia por las anteriores tablas que la fermentación de cualquier cepa del género Brevibacterium se desarrolla de un modo ineficaz, con escaso crecimiento de las bacterias de fermentación, retención de mucho azúcar residual en el medio, y bajo rendimiento (alrededor de 10%) de ácido L-glutámico, cuando no se emplea destiobiotina, d-sulfóxido de biotina o biocitina.

25

Por el contrario, es evidente que empleando al menos uno de esos compuestos, se consigue una fermentación activa, o sea, un crecimiento mayor de bacterias fermen-

30

267086



5 tativas y un consumo substancial del sacárido; la cantidad de ácido L-glutámico producido, o sea su concentración, excede fácilmente de 4,0 g/dl., y puede obtenerse un rendimiento hasta de 50% de ácido L-glutámico. Por consiguiente, en tales condiciones, la adición de destio-
biotina, d-sulfóxido de biotina o biocitina produce un efecto muy notable.

10 Cuando se emplean destiobiotina, biocitina, o d-sulfóxido de biotina solos, se hace con preferencia en cantidad no mayor de 20 γ/lit., 15 γ/lit. o 15 γ/lit., respectivamente. Como es natural, se puede conseguir el mismo efecto ventajoso descrito mediante la combinación de dos de esos tres productos, o de todos ellos. Y cuando se toman combinadas biotina y biocitina, la cantidad total de ambas se prefiere no mayor de 15 γ/litro; si se emplea además d-sulfóxido de biotina, la cantidad total se prefiere no mayor de 18 γ/litro.

15 Las bacterias productoras de ácido L-glutámico pertenecientes al género Brevibacterium aplicables al presente invento comprenden a las Brevibacterium lactofermentum ATCC número 13869, Brevibacterium saccharolyticum ATCC número 14066, Brevibacterium flavum ATCC número 14067, Brevibacterium immariophirium ATCC número 14068, y Brevibacterium roseum ATCC número 13825.

25 En la fermentación conforme al invento, el cultivo se efectúa manteniendo ligeramente alcalino el pH del medio por adición de amoniaco o de urea. Las temperaturas y el lapso de cultivo dependerán de las bacterias empleadas.

30 Los métodos de fermentación que pueden utilizarse

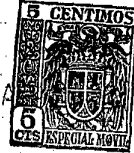


en este invento comprenden las fermentaciones en cultivo agitado o sumergido, con aireación. El ácido L-glutámico producido en el medio de cultivo se puede recuperar por cualquiera de las técnicas corrientes, por ejemplo, 5 filtrando el medio fermentado para retirar las células, concentrando el filtrado, ajustando el pH a 3,2 por adición de ácido clorhídrico, y precipitando ácido L-glutámico.

Para ilustrar el presente invento, se exponen a continuación algunos ejemplos.

10 EJEMPLO 1º.

Un medio de cultivo, que contenía 10,39% de glucosa, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,04% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 ppm. de Fe^{++} , 2 ppm. de Mn^{++} , 0.1 ml/dl. de hidrolizado de proteínas de soja (N total 2.4 g/dl.) 50 γ /lit. de clorhidrato de vitamina B_1 , y 7 γ /lit. de DL-destiobiotina, se ajustó a un 15 pH 7,0 y se esterilizó mediante calor. Luego se añadió 2% de solución de urea (45 g/dl.) esterilizada al medio de cultivo; se inocularon las células de Brevibacterium lactofermentum ATCC N^o. 13869 cultivadas en agar-caldo 20 exento de sacárido a 30^o C durante 24 horas, y se cultivó a 31^o C agitando a razón de 120 r.p.m. y 7 cm. de amplitud. Durante el cultivo, la descomposición de la urea por la ureasa, da amoniaco, y el pH se vuelve alcalino. Sin embargo, el amoniaco así formado se asimila y se consume 25 gradualmente, por lo que el pH alcanza el valor de 7,0 a las 16 horas de comenzar el cultivo. Al final de ese tiempo, se añadió 2% de solución de urea (45 g/dl.), y se continuó la fermentación seis horas más. El pH disminuyó de nuevo a 7,0, y se añadió 3% de solución de urea



(45 g/dl.) El cultivo terminó a las 40 horas de empezar. El ácido L-glutámico en el medio de cultivo así obtenido ascendió a 5,23 g/dl., y el rendimiento fué de 51,3%, referido al peso del sacárido natural cargado.

5 EJEMPLO 2º.

Un medio de cultivo, que contenía 10,2% de glucosa, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,04% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,8% de urea, 5 ppm. de Fe^{++} , 5 ppm. de Mn^{++} , 80 mg/l. de glicina, 160 mg/l. de DL-alanina, 80 mg/l. de L-metionina, 160 mg/l. de DL-fenilalanina, 80 mg/l. de L-histidina, 100 μ /l, de clorhidrato de vitamina B_1 y 10 μ /l, de DL-destiobiotina, se ajustó a un pH 6,5 y se esterilizó a presión elevada. Luego se añadió 4% de urea acuosa esterilizada (45 g/dl.) al medio, y se inocularon las células de "Brevibacterium
10 saccharolyticum ATCC Nº 14066 cultivadas en agar-caldo sin sacarido a 30°C durante 18 horas; seguidamente, se agitó el cultivo a 29-32°C, a razón de 125 r.p.m. y 7 cm. de amplitud. El cultivo terminó a las 40 horas de ini-
15 ciarlo.

20 El ácido L-glutámico en el medio de cultivo obtenido así peso 4,68 g/dl., y el rendimiento fué de 45,8% referido al peso del sacárido natural cargado.

EJEMPLO 3º

25 Un medio de cultivo, que contenía 10,4% de glucosa, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,04% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 ppm. de Fe^{++} , 2 ppm. de Mn^{++} , 0,1 ml/dl. de hidrolizado de proteínas de soja (N total 2,4 g/dl.). 200 μ /l. de clorhidrato de vitamina B_1 y 10 μ /l. de DL-destiobiotina, se esterilizó a gran presión. Se añadió 2% de urea acuosa esterilizada

267086

22 ABR



5 (45 g/dl.) al medio, y luego se inocularon las células de Brevibacterium flavum ATCC N° 14067 cultivadas en agar-caldo sin sacárido a 30°C durante 24 horas, y se cultivaron con agitación a 30°C. Se añadieron 2% y 3% de urea acuosa 12 y 22 horas después de iniciar el cultivo, respectivamente; éste terminó a las 40 horas de empezarlo.

El ácido L-glutámico en el medio de cultivo obtenido ascendió a 5,12 g/dl., y el rendimiento fué de 49,3% referido al peso del sacárido natural cargado.

10 EJEMPLO 4º

Se repitió el ejemplo 3º, pero empleando Brevibacterium roseum ATCC N° 13825, y se añadieron 2% y 3% de urea acuosa al medio 14 y 22 horas después de iniciar el cultivo.

15 El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido llegó a 5,18 g/dl., y el rendimiento fué de 49,8% referido al peso del sacárido natural cargado.

EJEMPLO 5º

20 Se repitió el ejemplo 3º, pero empleando Brevibacterium immariophirium ATCC N° 14068, y se añadieron al medio 2% y 3% de urea acuosa 14 y 21 horas después de iniciar el cultivo.

25 El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido pesaba 3,03 g/dl., y el rendimiento fué de 29,1% referido al peso del sacárido natural cargado.

EJEMPLO 6º

30 Un medio, que presentaba 7,0 de pH, y contenía 10% de glucosa, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,04% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 ppm. de Fe^{++} , 2 ppm. de Mn^{++} , 0,1 ml/dl. de hidrolizado de proteínas de soja (N total 2,4 g/dl), 200 δ /l. de clor-



5 hidrato de vitamina B₁, y 8 μ /l. de D-sulfóxido de biotina, se esterilizó por calor. Señaló 2% de urea acuosa (45 g/dl.) al medio, se inocularon las células de Brevibacterium lactofermentum ATCC N° 13869, cultivadas en agar-caldo durante 24 horas; a continuación, se agitó el cultivo a 31° C durante 40 horas, ascendiendo a la vez el pH a 9,0 y descendiendo de nuevo a 7,0. Las adiciones de urea fueron, por tanto, 2% y luego 3%.

10 El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido pesaba 4,65 g/dl., y el rendimiento fué de 46,3% referido al sacárido natural cargado.

EJEMPLO 7º

15 Se repitió el ejemplo 6º, pero empleando Brevibacterium saccharolyticum ATCC N° 14066, con una concentración de D-sulfóxido de biotina de 12 μ /litro.

El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido ascendió a 4,21 g/dl. y el rendimiento fué de 42,1% referido al peso del sacárido natural cargado.

EJEMPLO 8º

20 Se repitió el ejemplo 6º, pero empleando Brevibacterium flavum ATCC N° 14067, con una concentración de D-sulfóxido de biotina de 6 μ /litro.

25 El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido ascendió a 5,19 g/l., y el rendimiento fué de 51,9% referido al peso del sacárido natural cargado.

EJEMPLO 9º

30 Se repitió el ejemplo 6º, pero empleando Brevibacterium roseum ATCC N° 13825, con una concentración de D-sulfóxido de biotina de 5 μ /litro.

El ácido L-glutámico en el medio fermentado así



obtenido pesaba 4,61 g/dl., y el rendimiento fué de 46,1% referido al peso del sacárido natural cargado.

EJEMPLO 10

5 Se repitió el ejemplo 6º, pero empleando Brevibacterium immariophirium ATCC Nº 14068, con una concentración de D-sulfóxido de biotina de 6 μ /l., y se añadieron 2% y 3% de urea acuosa, 13 y 18 horas después de iniciar el cultivo.

10 El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido dió 2,43 g/dl., y el rendimiento fué de 24,3% referido al peso del sacárido natural cargado.

EJEMPLO 11

15 Se repitió el ejemplo 6º, pero empleando biocitina 6 μ /lit., en vez de 8 μ /l. de D-sulfóxido de biotina.

El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido ascendió a 4,23 g/dl., y el rendimiento fué de 42,3% referido al peso del sacárido natural cargado.

EJEMPLO 12

20 Se repitió el ejemplo 7º, pero empleando 16 μ /l. de biocitina en vez de D-sulfóxido de biotina.

El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido dió 3,6 g/dl., y el rendimiento fué de 36%, referido al peso del sacárido natural cargado.

25 EJEMPLO 13

Se repitió el ejemplo 8º, pero empleando 8 μ /l. de biocitina en vez de D-sulfóxido de biotina.

30 El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido dió 4,86 g/dl., y el rendimiento fué de 48,6%, referido al peso del sacárido cargado.

22
267086



EJEMPLO 14

Se repitió el ejemplo 9º, pero empleando 6 γ /l. de biocitina en vez de D-sulfóxido de biotina.

5 El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido ascendió a 4,85 g/dl., y el rendimiento fué de 48,5%, referido al peso del sacárido natural cargado.

EJEMPLO 15

10 Se repitió el ejemplo 10, pero empleando 6 γ /l. de biocitina en vez de D-sulfóxido de biotina, y añadiendo 2% y 3% de urea acuosa 14 y 23 horas después, respectivamente.

15 El ácido L-glutámico en el medio fermentado así obtenido pesó 2,99 g/dl., y el rendimiento fué de 29,9%, referido al peso del sacárido natural cargado.

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

Se reivindica como objeto de esta patente:

20 1.- Procedimiento para la obtención de ácido L-glutámico, mediante el cultivo de bacterias que lo producen, pertenecientes al género Brevibacterium, en condiciones aeróbicas y en medio de cultivo que contenga carbohidratos, generadores de nitrógeno, aminoácidos y sales inorgánicas, caracterizados por el cultivo de ta-
25 les bacterias en condiciones aeróbicas en dicho medio en presencia de un miembro al menos seleccionado del grupo consistente en destiobiotina, D-sulfóxido de biotina y biocitina, y la recuperación del ácido L-glutámico así formado.

30 2.- Procedimiento para la obtención de ácido

22



267086

L-glutámico.

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

BARCELONA, a veintidós de Abril de mil novecientos sesenta y uno.

5

P. A.

[Handwritten signature or scribble]