

P.- 21.796

Nº. 55.520
Case D-0030



10
271206

17 ABR 1962

271206

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

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

formulada el 14 de Octubre de 1961, con el núm. 271.206

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de INTERNATIONAL MINERALS & CHEMICAL CORPORATION,
entidad norteamericana, establecida en Old Orchard Road,
Skokie, Illinois, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE
AMINOACIDOS".

Este invento se refiere a la preparación de ácido
L- glutámico, y más particularmente a la preparación de
ácido L-glutámico a partir de carbohidratos, utilizando
medios biológicos.

5 Para atender la creciente demanda de glutamato
monosódico como aditivo mejorador del sabor de los ali-
mentos, se han realizado amplias investigaciones técni-
cas en busca de métodos para la producción de ácido L-glu-
támico. Se han estudiado con todo detalle los métodos
10 para la obtención de ácido glutámico a partir de fuentes

271206



naturales, los métodos para la síntesis química de ácido glutámico y los métodos para la síntesis biológica de ácido glutámico.

5 Desde un punto de vista histórico, el ácido glutámico se ha obtenido por hidrólisis de proteínas que existen en estado natural, tal como gluten de trigo, o por recuperación a partir de licores de Steffens. Sin embargo, se ha hecho cada vez más evidente que las posibilidades de tales procedimientos no alcanzan a
10 satisfacer por completo la demanda esperada.

La síntesis química de ácido glutámico conduce a la formación de mezclas racémicas de ácido DL- glutámico. Teniendo esto en cuenta, las investigaciones encaminadas a los procedimientos químicos no solamente
15 tienen que idear una conversión eficiente de reaccionantes baratos que conduzcan a ácido glutámico, sino que tienen que establecer también un medio eficiente de desdoblar la mezcla racémica. Las dificultades que se han presentado han servido de estímulo para
20 una investigación más a fondo en los medios biológicos de producción de ácido glutámico.

A su vez, la investigación en el campo biológico ha seguido varias directrices. Se ha reconocido la posibilidad de transaminación y se ha demostrado
25 que el ácido glutámico puede producirse por transaminación, utilizando microorganismos en unión con ácido alfa-cetoglutarico y ácido aspártico o análogos. Tales procedimientos utilizan necesariamente materiales de partida bastante caros y el reaccionante aminoácido
30 resulta sacrificado en el proceso.

271206



5 Se ha investigado también la posibilidad de producir ácido glutámico a partir de ácido alfa-cetoglúterico, ácido cítrico, y análogos, utilizando una fuente de amonio barata, tal como amoníaco o urea. Aún cuando este intento tiene la ventaja de usar una fuente nitrogenada barata, requiere todavía la presencia de un material de partida principal relativamente caro.

10 Tomando como base la premisa de que un procedimiento potencialmente atractivo debe emplear un material de partida principal que sea a la vez abundante y barato, se ha emprendido una cantidad considerable de investigaciones dirigidas a la fermentación utilizando carbohidratos, tal como azúcar o almidón. Es conveniente que tal utilización vaya acoplada con una fuente de nitrógeno fácilmente disponible, tal como amoníaco o urea. Este intento de solución que emplea un material de partida principal barato parece que proporciona la máxima posibilidad final.

15 La investigación de la fermentación de los carbohidratos para producir ácido glutámico se ha realizado utilizando una amplia variedad de microorganismos. Frecuentemente, se ha prestado atención sólo a la determinación de qué microorganismo produciría una cantidad identificable de ácido glutámico a partir de un medio
25 nutriente que contenga un carbohidrato y una fuente de nitrógeno. Como resultado de tal investigación, se ha identificado un número sustancial de microorganismos como productores de ácido glutámico. Aún cuando algunos investigadores limitan sus conclusiones a las especies
30 ensayadas, otros han identificado los microorganismos



productores de ácido glutámico de un modo amplio por el género. Tales investigaciones no se limitaron a bacterias solamente sino que incluyeron también hongos y levaduras. Gracias a las investigaciones publicadas, es posible establecer que, entre otros, los miembros de los siguientes géneros de microbios producirán ácido glutámico a partir de carbohidratos.

Género bacterias: Acetobacter, Aerobacter, Aeromonas, Bacillus, Brevibacteria, Escherichia, Gluconoacetobacter, Lactobacillus, Micrococcus, Pseudomonas, Rhizobium, Salmonella, Sarcina, Serratia, Streptococcus, Streptomyces, Xanthomonas;

Hongos: Aspergillus, Cephalosporium, Mucor, Neurospora, Penicillium, Rhizopus, Ustilago;

Levaduras: Cryptococcus, Endomyces, Monilia, Mycoderma, Pichia, Pullularia, Rhodotorula, Shizosaccharomyces, Sporobolomyces, Torulopsis, Willia y Zygosaccharomyces.

Tomando como base estos resultados, parece que un gran número de microorganismos, acaso una mayoría, produce por lo menos cantidades traza de ácido glutámico.

Un análisis más detenido de los trabajos emprendidos, sin embargo, indica que la bibliografía no proporciona ninguna guía para la selección de un amplio grupo de microorganismos que produzcan ácido glutámico en cantidades que sugieran importancia comercial posible. Por ejemplo, solamente 20% de 650 bacterias examinadas en una investigación produjeron solamente unos pocos mg. de ácido glutámico por ml. de medio, y únicamente una especie descrita convirtió hasta 30% del azúcar a partir de un medio de fermentación que contenía originalmente

271206



5 5% de azúcar. Como los procedimientos de obtención
prácticos desde el punto de vista comercial han de pro-
porcionar por lo menos, aproximadamente 50%, y, conve-
nientemente, por lo menos, alrededor de 60% de conver-
sión de un medio que contenga hasta 15 ó 20% de azúcar,
se deduce evidentemente que la mayor parte de la infor-
mación publicada con respecto a la fermentación de car-
bohidratos para dar ácido glutámico no tiene ningún
valor real si se considera desde el ángulo de las exi-
gencias comerciales.

10 Por lo menos dos investigadores han indicado que
las especies del género Micrococcus tienen la facultad
de acumular ácido glutámico. Se ha señalado que
Micrococcus glutamicus proporciona, aproximadamente,
15 una conversión de 46% de glucosa a partir de un medio
de fermentación que contenga 10% de glucosa, y se ha
citado también que Micrococcus varians da, aproximadamen-
te, 17% de rendimiento a partir de una solución de glu-
cosa al 2%.

20 También se han señalado microorganismos de la es-
pecie Bacillus megaterium cereus, tipo intermedio, como
convertidores de hasta 51% de glucosa a partir de me-
dios de fermentación de 3% de glucosa, y se ha informa-
do que Brevibacterium lactofermentus proporciona ren-
25 dimientos de 54% a partir de medios de glucosa al 10%
en matraces de laboratorio.

30 En la búsqueda de microorganismos capaces de con-
vertir azúcar en cantidades importantes a ácido glutá-
mico, la técnica se enfrenta, excepto en cuanto se re-
fiere a unas pocas especies aisladas, con el problema



20611

de seleccionar microorganismos al azar a partir de las innumerables especies existentes.

Es un objeto principal del presente invento preparar ácido glutámico por un método microbiológico que proporciona altos rendimientos.

Otro objeto de este invento es preparar ácido L-glutámico a partir de materiales de partida baratos.

Otro objeto más de este invento es preparar ácido L-glutámico por un método de fermentación sencillo.

Aún otro objeto adicional de este invento es preparar ácido L-glutámico empleando únicamente una sola operación de fermentación.

Otro objeto que puede todavía añadirse de este invento es preparar ácido L-glutámico con elevados rendimientos y a bajo coste.

El presente invento abarca el método para la preparación de ácido L-glutámico que comprende fermentar aeróbicamente un medio carbohidrato acuoso que contiene una fuente nitrogenada y un sistema catalizador biológico producido por un microorganismo seleccionado del grupo constituido por Corynebacterium lilium y Corynebacterium callunae y recuperar del mismo ácido L-glutámico.

En la práctica de este invento, pueden emplearse los microorganismos mismos, o bien un extracto del organismo que contiene el material catalítico activo, para la fermentación. El término "fermentación", tal como aquí se usa, se refiere a un procedimiento en el que la conversión del sustrato definido en producto se efectúa, o bien por la acción de la clase de microorganismos definida, o bien por un sistema catalítico biológico ela-

2712 16



borado por dichos organismos. El extracto puede prepararse por una maceración mecánica, por tratamiento con ondas ultrasónicas, extracción con un disolvente adecuado o por cualquier otra de las técnicas conocidas en esta especialidad. Se han conseguido rendimientos sustancialmente superiores al 50% del teórico, siguiendo la práctica de este invento.

Los organismos empleados en la práctica de este invento han recibido el nombre de Corynebacterium lilium y Corynebacterium callunae. Es evidente que la eficacia de los organismos puede ser susceptible de mejoramiento por tratamiento con rayos X, luz ultravioleta, o por otros medios que son conocidos para producir mutaciones y alteraciones en las características de los microorganismos. Según esto, los términos "Corynebacterium lilium" y "Corynebacterium callunae" tal como aquí se emplean, incluyen estos organismos, así como mutantes y análogos derivados de los mismos.

Los organismos que entran dentro del objeto de este invento, Corynebacterium lilium y Corynebacterium callunae, están constituidos típicamente por bastones cortos, pleomórficos Gram-positivos, algunos de forma de porras, otros en forma de perlas o de bandas con gránulos metacromáticos. En cultivos en caldo, una pequeña proporción (generalmente menos de aproximadamente 5%) de los organismos más jóvenes (18 horas de edad o menos) son Gram-negativos y, en cultivos más viejos, (más de 70 horas) existen organismos algo más Gram-negativos. Estos organismos son no móviles, y sin flagelos. No se ha acusado la formación de esporas. Sobre agar nutriente, estos organismos presentan



crecimiento moderado en 24 horas a 30°C, produciendo colonias de color crema blanco a amarillo (a la luz) con bordes enteros, plenos, arrugados, secos. Sobre medio de agar-TGY, crecen bien, produciendo crecimientos filiformes, brillantes. Las colonias son circulares, enteras, ligeramente abroqueladas, amarillas cuando crecen a la luz, blanco-cremosas a muy ligeramente amarillentas cuando crecen en la oscuridad. Cuando crecen sobre agar de telurita, los organismos presentan un rápido crecimiento y producen colonias grises con centros más oscuros, típicos de Corynebacteria

Corynebacterium lilium tiene las siguientes propiedades fisiológicas:

1. Células: 0,4 a 0,8 por 0,7 a 5,7 micrones.
2. Temperatura óptima para producción de ácido L-glutámico: 25-35°C.
- Buen crecimiento a temperaturas hasta de 37° C; ligero a 40°C; sin crecimiento a 41° C.
3. Límites de pH: 5-9; óptimo 6-8.
4. Aeróbica.
5. Produce ácido, no produce gas, a partir de dextrosa, fructosa, maltosa, sacarosa, manosa, galactosa (invirtiéndose indicios a alcalino a 72 horas), trehalosa (haciéndose indicios fuertemente positivos en 2-3 semanas), inulina (invirtiéndose indicios a lentamente positivos a negativos a las 2 semanas), manitol (indicios a lentamente positivos, variables), e inositol (indicios a lentamente positivo, variable). (Indicador: azul de bromo timol).
6. No produce ácido ni gas a partir de arabinosa,



71206

lactosa, rafinosa, ducitol, salicina, ramnosa, sorbosa, melibiosa, melezitosa, xilosa, adonitol, sorbitol, glicerol, dextrina y almidón (Indicador: azul de bromotimol).

- 5 7. Gelatina: no se licúa.
 8. Indol: no produce
 9. Sulfuro de hidrógeno: no produce.
10: Acetil metil carbinol (Reacción de Voges Proskauer):
 No produce.
- 10 11: Rojo de metilo: dudosa.
 12. Citrato: débilmente positiva.
 13. Catalasa: positiva.
 14. Ureasa: positiva
 15. Leche al tornasol: sin cambio en 14 días; alcalina después de 25 días; sin digestión.
- 15 16. Reducción de nitrato: positiva.

La caracterización de Corynebacterium callunae y Corynebacterium lilium se hizo de acuerdo con el Manual Microbiological Methods, Soc. Am. Bact., McGraw Hill (1957).

20 Corynebacterium callunae varía con respecto a las características anteriores en que Corynebacterium callunae produce ácido, no produce gas (sin reversión), a partir de galactosa, rafinosa y salicina; Corynebacterium callunae, da una reacción fuertemente positiva con rojo de metilo (pH 5,0); y Corynebacterium callunae no reduce los nitratos.

25 Los microorganismos empleados en el presente invento se mantienen, convenientemente, sobre cultivos inclinados de agar TGY corrientes (triptona-glucosa-extracto de

30

27-2-6



levadura). En la preparación de un inóculo conveniente, se hace un pase desde cultivo inclinado a una pequeña cantidad de caldo TGY y se incuba 15 a 30 horas a 28-30°C, con aireación adecuada. Una porción del cultivo resul -
 5 tante se traslada a TGY adicional o a otro caldo conveniente para proporcionar desde, aproximadamente, 2 a, aproximadamente, 10% del cultivo basado sobre la mezcla total, y la mezcla se incuba bajo condiciones dentro de los límites anteriormente empleados, y produciendo así
 10 un inóculo adecuado.

Un medio de fermentación satisfactorio para el crecimiento activo de Corynebacteria y para la producción de ácido L-glutámico corresponde generalmente a medios nutrientes patrón y contiene agua, un azúcar adecuado,
 15 una fuente nitrogenada, calcio, magnesio, potasio, fosfato, sulfato, factores de crecimiento adecuados, y elementos secundarios.

El medio puede incluir también un álcali suave, no tóxico o tampón para ajuste de pH y mantenimiento. Un
 20 medio típico puede tener la composición siguiente.

	<u>Límites convenientes</u>	<u>Preferidos</u>
Azúcar	1,25 % en peso	5-20% en peso.
(NH ₃) ₂ SO ₄	indicios-15%	0,05-10%
Biotina	mcgr./L variable	mcgr./L variable
25 K ₂ HPO ₄ (o KH ₂ PO ₄ o mezcla)	0,01-1%	0,05 - 0,4 %
MgSO ₄ ·7·H ₂ O	0,05 - 0,3 %	0,1 - 0,2 %
CaCl ₂	indicios	indicios
Elementos secundarios	indicios	indicios
30 Amoníaco	mantener el pH	mantener el pH

271206



Aun cuando el anterior es un medio satisfactorio, se observará que la composición exacta de un medio variará dependiendo del pH exacto de la aireación o de la operación análoga empleada. De acuerdo con esto, no se pretende limitar el presente invento a la utilización del medio arriba definido.

El invento considera de un modo general los medios de fermentación que contienen carbohidratos, incluyendo almidones, dextrinas, azúcares y análogos.

En la práctica de este invento, pueden emplearse perfectamente azúcares, tales como glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa y análogos, así como mezclas de tales azúcares. La glucosa y la sacarosa constituyen materiales particularmente preferidos para este invento. Tal como aquí se emplean, los términos "azúcar", "almidón", y análogos, abarcan no solamente tales materiales, per se, sino también sus equivalentes lógicos; Por ejemplo, el término "glucosa", abarca materiales tales como "Cere-lose" (Corn Products Company) y "Clintose" (Clinton Corn Processing Company), que son formas asequibles comercialmente de glucosa monohidrato preparadas por hidrólisis de almidón de maíz. Estos términos abarcan también mezclas de azúcar invertido, tal como las que se preparan por conversión ácida de azúcares del modo conocido. Se deducirá, evidentemente, que una porción o la totalidad del azúcar requerido puede añadirse al medio como melazas.

Los carbohidratos se emplean en el medio de fermentación en cantidades de, por lo menos 1%, aproximadamente, y, preferiblemente, por lo menos 5%, aproximada-

27.206



mente, en peso. Convenientemente, el medio contendrá desde, aproximadamente, 5% a, aproximadamente, 20% de carbohidrato, aunque puede obtenerse rendimientos importantes empleando medios de fermentación que contengan hasta, aproximadamente, 25 % y más. Se comprenderá, evidentemente, que la proporción exacta de carbohidrato empleada en el medio se podrá elegir arbitrariamente.

El medio contendrá también una fuente de nitrógeno corriente, tal como amoníaco, urea, u otra fuente de nitrógeno asimilable, ya sea orgánica o inorgánica. Pueden usarse varios compuestos de amonio, incluyendo cloruro, sulfato, fosfato y otros. El nitrógeno y el fosfato pueden añadirse juntos en forma de fosfato amónico, o separadamente, según se desee; Preferiblemente, hay presente una cantidad suficiente de nitrógeno, por lo menos para suministrar nitrógeno para el crecimiento celular y para la conversión teórica de todo el carbohidrato en ácido glutámico. La fuente de nitrógeno total puede añadirse al principio o puede añadirse periódicamente durante la fermentación.

Los factores de crecimiento auxiliares pueden añadirse en forma de biotina pura, o equivalente de biotina (es decir, una sustancia que tenga la acción biológica de la biotina), o en forma de un compuesto precursor de biotina (o sea, una sustancia que se convierte en biotina o equivalente de biotina bajo las condiciones de fermentación). Entre las fuentes adecuadas de factores de crecimiento auxiliares que pueden usarse solas o en combinación, figuran: extracto de carne, peptona,



agua de maceración de maíz, melazas de remolacha, me-
lazas de caña de azúcar y un producto asequible en el
comerercio, conocido con el nombre de "Protopeptone
No. 366", suministrado por Wilson & Company. Muchos
5 de los materiales anteriores suministran también ele-
mentos secundarios.

Ensayos de rutina han establecido que la concen-
tración óptima de los factores de crecimiento auxilia-
res variará según sea la cantidad de carbohidrato pre -
10 sente en el medio de fermentación. Por ejemplo, la
concentración óptima de biotina para un medio con 5% de
azúcar es desde, aproximadamente, 1,5 a, aproximadamen-
te, 2 mcgr./L, 10% de azúcar requieren 2 a 3 mcgr; /L;
15 15% de azúcar requieren de 4 a 8 mcgr /L, y 20% de azú-
car requieren de 7 a 10 mcgr./L. Como los sustratos
que existen en estado natural, tal como melazas de re-
molacha, melazas de caña de azúcar, agua de maceración
del maíz, y análogos, contienen pequeñas cantidades de
biotina y/o materiales equivalentes, debe tenerse en
20 cuenta este hecho en la preparación del medio de fer-
mentación que contiene tales materiales.

Pueden emplearse varias sales de calcio, potasio y
magnesio en el medio de fermentación incluyendo los clo-
ruros, sulfatos, fosfatos, y análogos. Análogamente,
25 pueden suministrarse los iones fosfato y sulfato en for-
ma de sales diversas. Aunque puede emplearse sales que
suministran tanto el anión como el catión deseados(p.ej:
fosfato potásico, sulfato magnésico), la selección no
está en modo alguno limitada de esta forma. Igualmente,
30 tales materiales son corrientes en los medios de fer-
mentación y la selección de los materiales específicos,



así como su proporción, cae dentro de la pericia de los expertos.

Los llamados "elementos secundarios" se entiende que abarca comúnmente manganeso, hierro, cinc, cobalto y posiblemente otros. Se necesitan cantidades iniciales de los mismos, y tales cantidades están comúnmente presentes en los materiales usados en la preparación de medios de fermentación.

Finalmente, el medio contendrá un álcali no tóxico o tampón para mantener el pH en los límites deseados. También pueden emplearse aquí una gran variedad de materiales no tóxicos. Frecuentemente, se emplean para mantener el pH del medio de fermentación carbonato calcio y amoníaco (gaseoso o acuoso), por ser fácilmente asequibles.

Al principio del proceso, el medio de fermentación se inocula con un cultivo del microorganismo, mientras se mantiene el pH entre, aproximadamente, 5 y, aproximadamente 9, y, convenientemente, entre aproximadamente 6, y, aproximadamente, 8: La cantidad de cultivo empleada puede variar ampliamente pero, frecuentemente, está comprendida entre, aproximadamente, 0,5% y, aproximadamente, 15% en volumen, y ventajosamente entre aproximadamente 2% y aproximadamente 10% en volumen. Durante las fases iniciales de fermentación, el organismo crece rápidamente. Después del período inicial, frecuentemente de 10 a 20 horas, la velocidad de crecimiento del organismo tiende a decrecer y la acumulación de ácido glutámico se produce en cantidad importante. Durante la acumulación de ácido glutámico en el medio, debe mante -

271208



nerse el pH entre, aproximadamente, 6 y, aproximadamente, 8. La fermentación se suele continuar hasta que la acumulación de ácido L-glutámico alcanza un máximo y entonces está terminada. El tiempo total para la fermentación variará naturalmente, dependiendo de factores tales como composición nutriente, pH, temperatura, proporción de inóculo, y análogos. Frecuentemente, la acumulación máxima de ácido glutámico ocurrirá entre, aproximadamente, 30 o 50 y aproximadamente 100 horas, aunque algunas operaciones pueden terminar más tarde o más temprano.

Para fermentación efectiva, la temperatura del medio se mantiene entre, aproximadamente 20°C, y aproximadamente 40°C, y, preferiblemente entre 25°C y aproximadamente 35°C. La fermentación con células activas debe realizarse con aireación activa producida por agitación, sacudimiento, riego o análogo, efectiva para producir una velocidad de absorción de oxígeno de, por lo menos, aproximadamente, 01, milimoles por litro de medio por minuto. La selección de las velocidades de absorción óptimas de oxígeno es conocida por los expertos en esta técnica.

En el caso de que se emplee el sistema catalítico en vez del organismo, el tiempo de fermentación disminuirá en el período de tiempo durante el cual el organismo experimenta rápido crecimiento. El medio de fermentación será el mismo que el empleado para un organismo vivo.

La recuperación de ácido L-glutámico del licor de fermentación puede realizarse por medios corrientes

271206



con poca o ninguna modificación. Según un procedimiento de recuperación aceptable, el licor se filtra primero para separar los sólidos suspendidos. Después puede tratarse por varios métodos para eliminar mucílagos o para reducir su concentración. Por ejemplo, puede tratarse con una pequeña proporción de tanino o álcalilignina, según se describe en la patente americana 2.487.807, de Hoglem (15 de noviembre, 1949) y en la patente americana 2.487.785, de Blish (15 noviembre, 1949). O bien, puede concentrarse hasta un nivel de sólidos de aproximadamente 25-45 % en peso, mezclarse después con una pequeña proporción de cloruro bórico, hidróxido bórico o análogo, a un pH de más de 7, para precipitar impurezas orgánicas, como se describe en la patente americana 2.796.433, de Purvis-Fike (18 de Junio 1957). El licor purificado se concentra y se ajusta luego a pH aproximadamente 3,2 con ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o análogo, en cuyo momento cristaliza del mismo el ácido L- glutámico con buen rendimiento.

Se ha encontrado que, particularmente con la concentración más elevada de azúcares, puede producirse por los organismos ácido glutámico combinado, así como el ácido glutámico mismo. Por tanto, si se desea, el medio de fermentación puede someterse a hidrólisis para hidrolizar los compuestos a ácido glutámico libre. También en este caso, la hidrólisis puede hacerse por medios convencionales, tal como, por ejemplo, la hidrólisis ácida descrita en la patente americana 2.548.124. En el caso de que el medio y las condiciones de fermentación empleadas no den cantidades importantes de ácido glutámico combinado o no

271206



las den en absoluto entonces, como es natural, no es preciso emplear la hidrólisis.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar más detalladamente la práctica de este invento. Estos ejemplos se incluyen con fines ilustrativos únicamente y no tratan en modo alguno de limitar el alcance del invento.

EJEMPLO I

Se llenó un tanque de fermentación de 1.892,5 l. con un medio de fermentación normal que contenía 10% de "Cerelese" (92% de glucosa) y se inoculó con 5 % de inóculo en volumen, conteniendo el organismo Corynebacterium lilium. El medio de fermentación se agitó y se aireó mientras se mantenía el pH entre 6 y 8 para dar un licor de fermentación final que tenía las características indicadas en la Columna A de la Tabla I a continuación.

La fermentación se repitió empleando un medio de fermentación que contenía 15 % de "Cerelese". Los resultados de esta fermentación se indican en la Columna B de la Tabla I a continuación:

Tabla I

	<u>A</u>	<u>B</u>
Concentración inicial de "Cerelese", %	10	15
Licor de fermentación final		
Acido glutámico (l): mg/ml.	42.9	60
Sólidos secos; %	7.8	10.2
Peso específico	1.028	-
Conversión teórica a partir de glucosa, %	57	53
Concentrado de licor de fermentación		
Acido glutámico, m/g/ ml.	258	295
Acido glutámico libre, %	60	56
Bound Glutamic Acid, %	40	44
Sólidos secos, %	40	44.7
Peso específico	1.163	

271206



- (1) Acido glutámico y compuestos de ácido glutámico combinado expresados como ácido glutámico libre.

EJEMPLO II

Se preparó un medio de fermentación que tenía la siguiente composición:

5

<u>Medio</u>	<u>gr/ L (1)</u>
"Cerelese"	220 (20% glucose)(2)
"Melazas (NH ₄) ₂ SO ₄	10 10
KH ₂ PO ₄	3
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1
CaCl ₂	0.33
"Protopeptone 366"	2
Biotina.	3 mcg.

10

15

- (1) Las tablas indican gr/L a no ser que se indique otra cosa (mg.=miligramos; mcgr. = microgramos).
- (2) Aproximadamente 20% de concentración de glucosa en el medio.

EJEMPLO III

Se preparó un medio de fermentación que tenía la siguiente composición:

20

<u>Medio</u>	<u>gr./ L</u>
"Cerelese"	163 (15% glucosa)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2
Glutamato cálcico	0.56
Citrato férrico amóni- co	60 mg.
MnSO ₄ · H ₂ O	200 mg.

25

30



M U A B J

<u>Medio</u>	<u>, gr/ L</u>
Zn (C ₂ H ₃ O ₂) ₂ 2 H ₂ O	5 mg
"Protopeptona N ^o . 366"	3
Biotina	3.5 mcg

5 Se inocularon siete litros del medio con 10% en
 volúmen de un cultivo TGY de Corynebacterium lilium
 (inóculo descrito en el Ejemplo IX). El medio de fer -
 mentación se sometió a aireación (7 L/ min) y se
 agitó a 450 rpm. a 30°C. El pH se mantuvo a 7 con gas
 10 amoníaco. Después de 40,5 horas, se hidrolizó el medio
 y dió un rendimiento de 70,5 mg/ ml., que corresponde a
 un rendimiento de 57,6%.

EJEMPLO IV

15 Se preparó un medio de fermentación que tenía la
 siguiente composición:

<u>Medio</u>	<u>gr/ L</u>
"Cerelese"	108 (10% glucosa)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
20 K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2
CaCl ₂	0,33
Biotina	0,6 mcg/L
25 <u>Elementos secundarios</u> (Fe ⁺⁺ , Mn ⁺⁺)	indicios.

Se esterilizaron seis litros del medio y luego se
 inocularon con 10% en volúmen de un cultivo TGY de
Corynebacterium lilium. El medio de fermentación se ai -
 reó (6 L/ min) y se agitó a 300 rpm. a 35 ° C.,
 30 mientras se mantenía el pH a 6,6 aproximadamente, con



gas amoníaco. Al cabo de 52 horas, se hidrolizó el medio y dió 44 mg/ ml. de ácido L-glutámico, que corresponde a 54 % de rendimiento.

EJEMPLO V

5 Un cultivo inclinado de agar TGY de Corynebacterium lilium se trasladó a 10 mililitros de caldo TGY en un tubo de ensayo y se incubó con agitación a 30° C durante 16 horas; El cultivo resultante se añadió a 2% en volúmen de concentración sobre una cantidad mayor de
10 caldo TGY, que se incubó 15,75 horas a 30°C, para producir el cultivo de inóculo.

Se preparó un medio de fermentación a partir de soluciones de reserva que tenía la composición siguiente:

Solución A

15	Sulfato amónico	20 gramos
	Extracto de carne	2 gramos
	Peptona	2 gramos
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1 gramo
	K ₂ HPO ₄	1 gramo
20	CaCO ₃	20 gramos
	Agua	500 mililitros

Solución B

	"Cerelese"	54 gramos
	Agua para hacer	500 mililitros

25 Las soluciones A y B se esterilizaron y se mezclaron asépticamente. El medio completo, que contenía 5 % de glucosa y tenía un pH de 8, se inoculó con 2% en volúmen del cultivo de inóculo y se fermentó a 28° C en una vasija de 14 litros equipada con un agitador que trabajaba a
30 300 rpm. Se introdujo aire a la velocidad de 12 litros

271206



por minuto a través de un tubo de regadera situado cerca del fondo del líquido. Se añadió a mano un agente anti-espuma de silicona, según se necesitaba para controlar la espuma. Se tomaban muestras del licor de fermentación de vez en cuando y se determinaba en las muestras el contenido de ácido L-glutámico libre por el método de descarboxilasa de ácido L-glutámico.

Se realizaron tres fermentaciones de acuerdo con el procedimiento anterior, utilizando 4, 6 y 8 litros de medio de fermentación. Los resultados fueron como sigue:

Velocidad del aire, l/l/ min	4	6	8
Análisis de ácido L-glutámico, mg/ ml.	3	2	1.5
24 horas	8.7	7.0	8.2
36	12.0	13.2	15.6
48	16.4	17.2	22.2
60	21.4	19.8	23.4
70	22.8	20.8	22.4
89	26.4	23.6	23.4

Aunque los datos anteriores indican que la aireación no es un factor importante con el medio empleado, se ha encontrado que la variación de la aireación ejerce un efecto más pronunciado con algunos otros medios, particularmente a concentraciones de azúcar más elevadas.

EJEMPLO VI

El siguiente ejemplo ilustra la producción de ácido L-glutámico a partir de "Cerelese" a pH 6,9.

Se preparó un medio de fermentación a partir de soluciones de reserva que tenía las composiciones siguientes.

271206



Solución A

	"Cerelese"	165 gramos
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	3 gramos
	CaCl ₂	0.3 gramos
5	Agua para hacer	1500 mls.

Solución B

	Sulfato amónico	30 gramos
	K ₂ HPO ₄	3 gramos
	Peptona	3 gramos
10	Extracto de carne	3 gramos
	Agua	1500 mls.

Las soluciones se trataron en autoclave por separado, se mezclaron, se inocularon con 2% de un cultivo TGY de Corynebacterium lilium, y se fermentaron a 30° C. con una velocidad de agitador de 400 rpm. y una velocidad de aireación de 2 litros de aire por minuto. Se añadió solución concentrada de hidróxido amónico según se necesitaba para mantener el pH a, aproximadamente, 6,9, usándose un total de 150 ml. para este fin, a lo largo de un tiempo de fermentación total de 52 horas. Se añadió a mano un agente antiespumante de silicona, según se necesitaba para controlar la espuma. Los análisis periódicos del licor de fermentación dieron los resultados siguientes:

	<u>Tiempo de fermentación</u>	<u>Concentración de A I-G; libre</u>
	10.5 horas	2.2 mg/ml
	19	7.5
	24	9.0
	28	16.8
30	36	23.2

271206



47 19.2
52 22.0

EJEMPLO VII

5 El siguiente ejemplo ilustra el uso de un medio que contiene urea como fuente de nitrógeno.

Se preparó un medio a partir de solución de reserva que tenía las siguientes composiciones:

Solución A

10	"Cerelese"	55 gramos
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 gramos
	Azul de bromo cresol	10 miligramos
	CaCO ₃	20 gramos
	Agua	500 mililitros

Solución B

15	Sulfato amónico	10 gramos
	K ₂ HPO ₄	1 gramo
	Urea	1 gramo
	Extracto de carne	1 gramo
	Agua	500 mililitros

20 Las soluciones A y B se esterilizaron por separado, luego se mezclaron, siendo suficientes las cantidades empleadas para producir 3 litros de medio completado (5% de glucosa). El medio se inoculó con 1% en volumen de un cultivo TGY de Corynebacterium lilium y se fermentó en
25 una vasija de 4 litros a 30°C. Se agitó el medio a 180 rpm. se regó con aire a 2 litros por minuto, y se ajustó intermitentemente a pH 6-7 con una solución acuosa de urea al 20%. Los análisis periódicos del licor de fermentación dieron los siguientes resultados:

30	<u>Tiempo de fermentación</u>	<u>Concentración de A L-G libre</u>
	24 horas	2.2 mg/ml.



211

<u>Tiempo de fermentación</u>	<u>Concentración de A L-G Libre</u>
32	2 3.6
48	8.2
84	14.0
5 96	16.4 (40%)

EJEMPLO VIII

Se preparó un medio de fermentación que tenía la siguiente composición:

<u>Medio</u>	<u>gr/L</u>
10 Glucosa	5 %
Sulfato amónico	2
Extracto de carne	0, 2
Peptona	0, 2
15 K_2HPO_4	0, 1
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0, 1
$CaCO_3$	2
Agua	el resto

Se esterilizó una porción de 50 ml. del medio, se inoculó con 2% en volumen de un TGY de Corynebacterium lilium y se incubó a 30° en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. en un agitador rotatorio. Al cabo de 5 días, el licor de fermentación tenía un contenido de ácido L-glutámico de 36,2 mg./ml., analizado por el método de descarboxilasa de ácido L-glutámico, que corresponde a una conversión de glucosa de 88,5 % de la teoría.

EJEMPLO IX

Se preparó un medio de fermentación que tenía la siguiente composición:

<u>Medio</u>	<u>gm/L</u>
30 "Cerelese"	108 (10% glucosa)

27120



	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2
	K_2HPO_4	2
	Citrato férrico amónico	60 mg.
5	Biotina	1,4 mcgr.
	CaCO_3	60
	Tripticasa	1

Una porción de 100 ml. del medio esterilizado se
inoculó con 10 ml. (10% en volúmen) de un cultivo de
10 *Corynebacterium lilium*. El inóculo empleado tenía la si-
guiente composición:

	<u>Medio</u>	<u>gr./L</u>
	"Cerelese"	5,0 de glucosa
	Urea	0,5
15	K_2HPO_4	1,0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0
	Citrato férrico amónico	30,0 mg.
	Biotina	5,0 mcgr.

El medio inoculado se agitó a 30°C, en un matraz
20 Erlenmeyer de 500 ml. en un agitador rotatorio durante
100 horas. El medio hidrolizado contenía 48,8 mg/ ml.
de ácido L-glutámico, que corresponde a un rendimiento
de 60%.

EJEMPLO X

25 Se preparó un medio de fermentación que tenía la
siguiente composición:

	<u>Medio</u>	<u>gr/L</u>
	"Cerelese"	162 (15% glucosa)
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	60
30	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2



	K_2HPO_4	2
	Citrato férrico amónico	60 mg.
	Biotina	5 mcg.
	Tripticasa	1
5	$CaCO_3$.	

Una porción de 100 ml. del medio esterilizado se inoculó con 10 ml. del inóculo del Ejemplo IX y se agitó a 30° C, en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. en un agitador rotatorio durante 66 horas. El medio de fermentación después de hidrólisis, contenía 68 mg/ ml. de ácido L-glutámico, que corresponde a un rendimiento de 57%.

EJEMPLO XI

Un ensayo, repitiendo esencialmente el Ejemplo VIII, pero empleando sacarosa en lugar de "Cerelese" como azúcar, dió un licor de fermentación que contenía 32 mg./ml. de ácido L-glutámico al cabo de 5 días, que corresponde a una conversión de sacarosa de 75% de la teoría.

EJEMPLO XII

Se preparó un medio de fermentación que tenía la siguiente composición:

<u>Medio</u>	<u>gr/L</u>
Sacarosa	100 (10% sacarosa)
25 Sulfato amónico	40
Biotina	1,5 mcgr.
K_2HPO_4	2
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	2
Citrato férrico amónico	60 mg.
30 $CaCO_3$	60

271298



Una porción de 100 ml. de este medio esterilizado se inoculó con 10% en volúmen del inóculo del Ejemplo IX que contenía un cultivo de Corynebacterium lilium. El medio inoculado se agitó a 30° C en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. en un agitador rotatorio durante 72 horas. El medio hidrolizado contenía 54 mg/ml. de ácido glutámico, que corresponde a 63 % de rendimiento.

EJEMPLO XIII

Se repitió el procedimiento del Ejemplo XII empleando un medio que contenía 15 % de sacarosa y 2 mcgr./ L de biotina. Al cabo de 114 horas, el medio hidrolizado contenía 76 mg./ml. de ácido glutámico, que corresponde a un rendimiento de 59 %.

EJEMPLO XIV

Se repitió el procedimiento del Ejemplo VIII empleando fructosa en lugar de "Cerelese", como azúcar. El ensayo dió un licor de fermentación que contenía 11,8 mg./ml. de ácido L-glutámico al cabo de 72 horas, que corresponde a una conversión de fructosa de 29% de la teoría.

EJEMPLO XV

Se preparó un medio de fermentación que tenía la siguiente composición:

<u>Medio</u>	<u>gr./L</u>
Fructosa	100(10% fructosa)
Sulfato amónico	40
Biotina	1,8 mcgr.
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2
Citrato férrico amónico	60 mg.
CaCO ₃	60



Una porción de 100 ml. del medio se inoculó con 10% en volumen del inóculo del Ejemplo IX que contenía un cultivo de Corynebacterium lilium. El medio inoculado se agitó a 30° C, en un matraz Erlenmeyer en un agitador rotatorio. El medio hidrolizado contenía 42 mg./ml. de ácido glutámico, que corresponde a un rendimiento de 52%.

EJEMPLO XVI

Se repitió el procedimiento del Ejemplo XV empleando un medio de fermentación que contenía 15 % de fructosa y 5 mcgr./L de biotina. Al cabo de 65 horas, el medio hidrolizado contenía 58 mg;/ml. de ácido glutámico, que corresponde a una conversión de 48 %.

EJEMPLO XVII

Se repitió el procedimiento del Ejemplo VIII empleando 5% de maltosa en lugar de "Cerelese", como azúcar y empleando 50 ml. del medio de fermentación en un matraz de 250 ml. Al cabo de 66,5 horas el medio hidrolizado contenía 14,4 mg./ml. de ácido L-glutámico, que corresponde a una conversión de maltosa de 35 %.

EJEMPLO XVIII

Se repitió el procedimiento del Ejemplo VIII con excepción de que el extracto de carne y la peptona se sustituyeron por 0,8 % de melazas de remolacha. Al cabo de 72 horas, el licor de fermentación hidrolizado contenía 25,4 mg./ml. de ácido glutámico, que corresponde a una conversión de 58 %.

271206



EJEMPLO XIX

5 Se repitió esencialmente el procedimiento del Ejemplo IX con excepción de que el medio de fermentación contenía 0,3 % de autolizado pancreático en lugar de tripticasa, 1 gr./ L de extracto de levadura y el orga - nismo empleado fué Corynebacterium callunae. Al cabo de 66 horas, el medio hidrolizado contenía 26 mg./ml. de ácido L-glutámico que corresponde a una conversión de 32 %.

10 EJEMPLO XX

Una porción de 100 ml. de un medio que tenía la composición indicada en el Ejemplo VIII, se inoculó con 2% en volumen de cultivo TGY de Corynebacterium callunae, y el medio completado se fermentó en un 15 matraz de 500 ml. en un agitador rotatorio a 30° C. El análisis del licor de fermentación para ácido L-glutámico dió los resultados siguientes:

<u>Tiempo de fermentación</u>	<u>Concentración de A-IG</u>
34 horas	4,1 mg;/ ml.
20 71	10,0 (25 % conversión)
93,5	10,2

25 Numerosas modificaciones del procedimiento des - crito serán evidentes para los expertos en esta técni - ca. Así, por ejemplo, los materiales pueden esterili - zarse separadamente o el inóculo puede formularse pri - mero y luego esterilizarse. Además, aunque el proce - 30 dimiento se ha descrito esencialmente como fermentación discontinua, puede también realizarse como procedimien - to continuo, sirviendo un fermentador como una fase pa - ra crecimiento y los fermentadores subsiguientes para



10 ABR

la conversión. Como estas y otras modificaciones se-
rán evidentes, se entiende que el presente invento es -
tá limitado solamente por el alcance de las reivindi -
caciones que figuran al final.

5 Las dos especies preferidas de Corynebacterium
adecuadas para uso en el presente invento se han de -
positado en el Departamento de Agricultura de los Es -
tados Unidos, Northern Utilization Research and Deve -
lopment División, Peoria, Illinois, para añadir a
10 la colección permanente de microorganismos mantenida
por dicha organización. Las especies presentadas y
sus números de identificación son como sigue:

- Corynebacterium liliun 2088-17A - NRRL-B-2243
- Corynebacterium callunae 2088-17B - NRRL - B-2244

15

- N O T A -

20 Los puntos de invención propia y nueva que se
presentan para que sean objeto de esta Patente de In -
vención, en España, por VEINTE años, son los siguien -
tes:

25 1º.- Un procedimiento que comprende fermentar
aeróbicamente un medio acuoso de carbohidrato que
contiene una reserva de nitrógeno y un sistema cata -
lizador biológico producido por un microorganismo
elegido del grupo consistente en Corynebacterium
liliun y Corynebacterium Callunae.

30 2º.- Un procedimiento para producir ácido

271206

1 D ABR.



5 l-glutámico, que comprende fermentar aeróbicamente un
carbohidrato acuoso que contiene una reserva de nitró-
geno y un sistema catalizador biológico producido por
un micro-organismo elegido del grupo consistente en
Corynebacterium Liliium y Corynebacterium Callunae y
recuperar de él ácido glutámico.

3º.- El procedimiento de los puntos 1º ó 2º, en
el cual dicho carbohidrato es azúcar.

10 4º.- Un procedimiento para producir ácido L-glu-
támico, que comprende fermentar aeróbicamente una mez-
cla acuosa que contiene azúcar y una reserva de nitró-
geno a una temperatura entre unos 20º C unos 40º C y
a un pH de entre 5 y 9 aproximadamente, con un orga -
nismo elegido del grupo consistente en Corynebacterium
15 Lililium y Corynebacterium Callunae, continuar la fer -
mentación en dichas condiciones hasta que el desarrollo
de los organismos alcance un máximo, continuar luego
la fermentación a un pH entre 6 y 8, aproximadamente,
y recuperar ácido L-glutámico del medio de fermenta -
20 ción.

5º.- El procedimiento de los puntos 3º ó 4º, en
el cual el azúcar se elige del grupo consistente en glu-
cosa, sacarosa, fructosa y maltosa y la fermentación
se realiza a una temperatura entre unos 25 y unos 35º C.

25 6º.- Un procedimiento para producir ácido L-glu -
támico que comprende fermentar aeróbicamente un medio
acuoso que contiene glucosa o sacarosa y una reserva
de nitrógeno, con un sistema catalizador biológico pro-
ducido por el microorganismo Corynebacterium Liliium a
30 una temperatura entre unos 20º y unos 40º C y recuperar



271206

10A

de él ácido glutámico.

5 7º.- El procedimiento del punto 6º, que comprende fermentar aeróbicemente un medio acuoso que contiene de 5 a 20% aproximadamente en peso de glucosa o sacarosa, y una reserva de nitrógeno, con un microorganismo Corynebacterium Liliun a una temperatura entre unos 25 y unos 35º C y a un pH entre 6 y 8, aproximadamente, y recuperar ácido glutámico de él.

10 8º.- Un procedimiento para la preparación de aminoácidos.

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

Esta Memoria consta de treinta y dos hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid 10 ABR. 1962

P. A.

Alberto de Elizaburu
For/Paden

MB/