

P.- 31.917

Nº 71625  
U.S. Serial Nº 249-605  
Case D 2017

326,105

326 105



MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

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

formulada el 28 de Abril de 1966, con el número 326.105

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

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

"UN METODO DE PRODUCIR ACIDO GLUTAMICO"

=====  
La presente invención se refiere a la prepara-  
ción de ácido L-glutámico, y más en particular se refiere  
a la preparación de ácido L-glutámico a partir de carbohi-  
dratos, utilizando medios biológicos.

5 Durante los últimos años, se ha investigado in-  
tensamente, a escala mundial, la producción microbiológi-

326105

24 DIC



ca de ácido L-glutámico. Aunque estas investigaciones no han proporcionado un método absolutamente claro para identificar cualquier clase de microorganismos productores de ácido L-glutámico, una extensa selección al azar ha proporcionado varios microorganismos de los que se dice que son capaces de acumular ácido L-glutámico en caldos de fermentación. Tales microorganismos se identifican, entre otros, en la Patente canadiense 604.712 (Micrococcus glutamicus), Patente canadiense 625.387 (Brevibacterium divaricatum), Patente canadiense 633.170 (Microbacterium flavum), Patente belga 609.701 (Corynebacterium lilium y Corynebacterium callunae), y Patente EE.UU. 3.032.474 (Bacillus mageterium-cereus).

Desde luego, la eficacia de los organismos productores de ácido L-glutámico es de la máxima importancia. No solo es conveniente que la fermentación se efectúe en un período de tiempo relativamente corto, sino que es crítico para la economía del procedimiento el que el organismo cubierta en ácido glutámico un tanto por ciento significativo del sustrato principal.

Se ha determinado que la mayoría de los microorganismos productores de ácido L-glutámico son sensibles a la biotina, y, por tanto, en las técnicas de fermentación para producir ácido L-glutámico llevadas a la práctica hasta ahora, se ha hallado que el nivel de biotina en el medio de fermentación ha de ser controlado de forma estricta, para que sean adecuados los rendimientos de ácido L-glutámico. Aunque el control de los niveles de biotina del medio, en la práctica de las técnicas disponibles antes de ahora, puede proporcionar una mayor eficacia de

326105



las fermentaciones, tal modo de actuar es estorbado por  
restricciones inherentes a su aplicación. Por ejemplo;  
los intentos anteriores para regular el contenido de bio-  
tina en los medios, han impedido generalmente la utiliza-  
5 ción de materiales con mucha biotina, tales como melazas  
de remolacha, melazas de alta prueba, y similares, como  
nutrientes primarios. Por otra parte, tales materiales  
son relativamente baratos en comparación con otros carbo-  
hidratos nutrientes, y, por tanto, el ramo ha buscado nue-  
10 vas técnicas que hagan posible su uso.

Por tanto, un objeto primordial de la invención  
es proporcionar medios por los cuales se puede aumentar  
la eficacia de las fermentaciones a ácido L-glutámico.

Otro objeto de la invención es proporcionar un  
15 método por el cual se pueden emplear materiales que con-  
tienen biotina, en medios de fermentación, sin sacrificar  
la eficacia del procedimiento.

La presente invención se refiere a la fermenta-  
ción aerobia de un medio acuoso de carbohidrato, que con-  
tiene una fuente de nitrógeno, con un microorganismo pro-  
20 ductor de ácido L-glutámico, sensible a la biotina, y  
constituye un perfeccionamiento de tal fermentación en el  
que, después de un período inicial de crecimiento, duran-  
te el cual se ajusta el microorganismo al medio, se añade  
25 por incrementos al medio un carbohidrato nutriente que  
contiene biotina, para mantener durante el resto de la  
fermentación un nivel total de carbohidrato en el medio  
menor de aproximadamente 2%.

La práctica de la invención permite un aumento  
30 de la conversión molecular de carbohidrato a ácido L-glu-

326105



támico, sin prolongar el tiempo de fermentación. Aunque el carbohidrato se mantiene a bajo nivel, durante las últimas etapas, el tiempo global necesario para el procedimiento de la presente invención es igual o menor que el tiempo necesario para un procedimiento discontinuo que contenga el mismo carbohidrato total al principio. En la realización preferida por los solicitantes, el contenido de carbohidrato en el medio se puede mantener lo suficientemente bajo para que actúe como control del crecimiento y, por tanto, de la asimilación de ácido L-glutámico por los organismos. En esta realización no es crítico el contenido de biotina en el medio, y en el procedimiento se pueden emplear fácilmente, con ventaja, materiales de gran contenido de biotina, tales como melazas de remolacha. El procedimiento de la invención proporciona la ventaja adicional de permitir la acumulación de mayores tantos por ciento de ácido glutámico libre, en el caldo de fermentación.

La invención se dirige en términos generales a los medios de fermentación que contienen carbohidratos, incluyendo azúcar, dextrinas, y similares. Además, como se ha indicado antes, la invención es aplicable en general a los microorganismos productores de ácido glutámico. Entre los ejemplos específicos de tales microorganismos, según se indicado antes, se incluyen, sin limitación, los microorganismos de los géneros Corynebacterium, Micrococcus, Brevibacterium, Microbacterium y Bacillus, tales como: Corynebacterium lilium, del que es típico el NRRL-B-2243; Corynebacterium callunae, del que es típico el NRRL-B-2244; Micrococcus glutamicus, del que son típi-

326105



cos el ATCC-13022, ATCC-13032 y ATCC-13058; Brevibacterium  
divaricatum, del que es típico el NRRL-2312; Microbacte-  
rium flavum, y Bacillus mageterium-cereus. El Corynebac-  
terium lilium y Corynebacterium callunae constituyen los  
5 microorganismos preferidos para la práctica de la inven-  
ción.

Desde luego, los medios apropiados para la pro-  
ducción de ácido glutámico variarán algo de un microorga-  
nismo a otro. Sin embargo, estos medios son acuosos, y  
10 además de un carbohidrato y una fuente de nitrógeno con-  
tendrán nutrientes secundarios, tales como calcio, magne-  
sio, potasio, cinc, fosfato, sulfato, factores auxiliares  
del crecimiento, y elementos secundarios.

En la práctica de la invención se pueden emplear  
15 de forma muy apropiada los azúcares, tal como glucosa, sa-  
carosa, fructosa, maltosa y similares, así como mezclas  
de tales azúcares. Tal como aquí se emplean, los términos  
"azúcar", "almidón", y similares, abarcan no solo tales ma-  
teriales por sí mismos, sino sus equivalentes evidentes.  
20 Por ejemplo, el término "glucosa" abarca materiales tales  
como "Cerelese" (Corn Products Company) y "Clintose"  
(Clinton Corn Processing Company), que son formas comer-  
cialmente disponibles de monohidrato de glucosa, prepara-  
das por hidrólisis de almidón de grano o maíz. Los términos  
25 abarcan también mezclas de azúcar invertido, tales como  
los preparados por conversión ácido de azúcares, de forma  
conocida. Además, en el término se incluyen los carbohi-  
dratos que contienen biotina, tales como melazas de remo-  
lacha, melazas de alta prueba, y similares. Tales carbohi-  
30 dratos que contienen biotina constituyen las fuentes pre-

326105



feridas de carbohidrato, y se emplean ventajosamente en el medio de partida, en las etapas de adición de carbohidrato por incrementos, o en ambos.

5 Los materiales que contienen biotina y que tienen de aproximadamente 0,02 gammas de biotina por gramo de carbohidrato a aproximadamente 0,3 gammas de biotina por gramo de carbohidrato, no son generalmente satisfactorios para los procedimientos discontinuos comerciales. Sin embargo, tales materiales son ventajosamente adecuados para la práctica de la invención. En la invención se pueden emplear materiales que contienen no más de aproximadamente 0,3 gammas de biotina por gramo de carbohidrato, y se prefieren particularmente para la invención los materiales que tienen de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 10 15 te 0,17 gammas de biotina por gramo de carbohidrato.

El medio contendrá también una fuente normal de nitrógeno, tal como amoníaco, urea, u otra fuente de nitrógeno asimilable, ya sea orgánica o inorgánica. Se pueden usar diversos compuestos amónicos, incluyendo cloruros, sulfatos, fosfatos, y otros. El nitrógeno y fosfato 20 se pueden añadir juntos, en forma de fosfato amónico, o por separado, si se desea. Preferiblemente, durante el procedimiento está presente al menos el nitrógeno suficiente para suministrar nitrógeno para el crecimiento de las 25 células y para la conversión teórica de todo el carbohidrato en ácido glutámico. Se puede añadir al principio toda la fuente de nitrógeno, o se puede añadir periódicamente durante la fermentación.

También se pueden añadir al medio factores auxiliares del crecimiento. Estos pueden ser biotina, o equi- 30



valentes de la biotina (es decir, una sustancia que tenga la acción biológica de la biotina), o en forma de un compuesto precursor de biotina (es decir, una sustancia que se convierte en biotina, o en equivalentes de la biotina, bajo las condiciones de fermentación). También se pueden emplear otros factores secundarios de crecimiento, tal como tiamina, y similares. Entre las fuentes adecuadas de los factores auxiliares del crecimiento que se pueden usar, solos o en combinación, se incluyen el extracto de carne, peptona, agua de maceración de grano, y un producto comercialmente disponible, conocido como "Protopeptona nº 366", suministrado por Wilson & Company. Los anteriores materiales están disponibles en fuentes comerciales, y también pueden suministrar elementos secundarios.

En el medio de fermentación se puede emplear una variedad de sales de calcio, potasio y magnesio, incluyendo los cloruros, sulfatos, fosfatos y similares. Análogamente, los iones fosfato y sulfato se pueden suministrar en forma de cualquiera de una variedad de sales. Aunque se pueden emplear sales que proporcionan tanto el anión como el catión deseados (por ejemplo fosfato potásico, sulfato de magnesio), la elección no está limitada en absoluto por ello. De nuevo, tales materiales son usuales en los medios de fermentación, y la elección de materiales específicos, así como sus proporciones, forman parte de la habilidad de rutina.

Se entiende corrientemente que en los llamados "elementos secundarios" se incluyen el manganeso, hierro, cinc, cobalto, y posiblemente otros. Se necesitan cantidades de trazas de los mismos, y tales cantidades están co-

326105



rrientemente presentes en los materiales usados en la preparación de los medios de fermentación. También se dispone fácilmente de elementos secundarios en fuentes comerciales.

5 Finalmente, el medio contendrá un álcali o tampón no tóxicos, para mantener el pH en el intervalo deseado. De nuevo, se puede utilizar una amplia variedad de materiales no tóxicos. Debido a que se dispone fácilmente de ellos, se emplean a menudo el carbonato cálcico o amoníaco (gaseoso o acuoso), para mantener el pH de los medios de fermentación.

10 En la práctica de la invención, se inocula un medio de fermentación con un cultivo del microorganismo, y se deja que el microorganismo se ajuste al medio durante un período inicial de crecimiento. El tiempo real de este período inicial utilizado dependerá entre otras cosas, del microorganismo y de la concentración inicial de carbohidrato en el medio que se empleen. Sin embargo, en general, el período de crecimiento será de aproximadamente 15  
20 te 1 a aproximadamente 10 horas. Durante este período, no solo queda ajustado el microorganismo al medio, sino que, como se describe más adelante, disminuye la concentración de carbohidrato en el medio, cuando es adecuado, para descender hasta los intervalos empleados en la práctica de la invención.

25 El medio inicial de fermentación puede contener todos los nutrientes secundarios de fermentación apropiados. Sin embargo, el carbohidrato nutriente primario debe estar presente en una cantidad, en peso, menor de aproximadamente 30  
30 madamente 6%, preferiblemente menor de aproximadamente 3%,

326105

24 Dic



y más preferiblemente menor de aproximadamente 2%. Las me-  
nores concentraciones iniciales, por ejemplo menores de  
aproximadamente 3%, son más preferidas especialmente en  
los casos en que el carbohidrato nutriente empleado en el  
5 medio inicial contenga biotina. Cuando en la práctica de  
la invención se emplean microorganismos sensibles a la  
biotina, es deseable que el medio inicial contenga no más  
de aproximadamente 10 gammas/litro de biotina, preferible-  
mente menos de aproximadamente 7,5 gammas/litro. Deseable-  
10 mente, el pH del medio debe ser de aproximadamente 5 a  
aproximadamente 9, y preferiblemente de aproximadamente 6  
a aproximadamente 8. Además, el medio se debe mantener a  
una temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente  
15 40°C, y preferiblemente de aproximadamente 25 a aproxima-  
damente 35°C. Tanto las condiciones de temperatura como  
de pH se deben mantener dentro de los intervalos indica-  
dos durante toda la fermentación.

Después del período inicial de crecimiento, du-  
rante el cual se ajustan los microorganismos al medio, y  
20 la concentración de carbohidrato en el medio es disminuía,  
cuando es necesario, hasta un valor menor de aproximada-  
mente 2%, se añade por incrementos el carbohidrato al me-  
dio, para mantener un nivel de carbohidrato no mayor de  
aproximadamente 2%. En la realización preferida, y cuando  
25 el contenido de biotina en el medio es un factor significa-  
tivo, y se emplean carbohidratos que contienen cantidades  
significativas de biotina, el contenido de carbohidrato  
en el medio se mantiene en no más de aproximadamente 1%,  
y deseablemente no más de aproximadamente 0,5% en peso  
30 sobre el medio total. El término "por incrementos", tal

326105



como aquí se emplea, indica la adición continua de carbohidrato, o, como alternativa, la adición periódica de pequeñas cantidades de carbohidrato. Será evidente que también se pueden añadir por incrementos al medio los nutrientes secundarios.

5

Desde luego, la fermentación es aerobia, y por tanto se efectúa en presencia de oxígeno y con agitación. La velocidad de absorción de oxígeno y la agitación óptimas variarán algo, según el medio y el microorganismo empleados, pero forman parte de la habilidad de rutina.

10

El tiempo global de la fermentación puede variar bastante, pero generalmente termina la fermentación en de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 horas. Generalmente, la fermentación será terminada cuando ya no sea rápida la acumulación de ácido glutámico en el medio. El total de carbohidrato añadido al medio puede variar, pero preferiblemente se añade al menos 7,5% en peso sobre el medio. Se puede añadir fácilmente carbohidrato en cantidades de aproximadamente 10% a aproximadamente 20% en peso sobre el medio.

15

20

La recuperación de ácido L-glutámico del líquido de fermentación se puede efectuar por medios usuales, con poca o ninguna modificación. En un procedimiento aceptable de recuperación, primero se filtra el líquido, para separar los sólidos suspendidos. Luego se puede tratar por una de una variedad de formas, para separar lodos o para reducir su concentración. Por ejemplo, se puede tratar con una pequeña proporción de tanino o lignina alcalina, como se expone en la Patente EE.UU de Hoglan 2.487.807 (15 de Noviembre de 1949) y en la Patente EE.UU. de Blish

25

30



2.487.785 (15 de Noviembre de 1949). Como alternativa, se puede concentrar hasta un nivel de sólidos de aproximadamente 25 a 45% en peso, y mezclar luego con una pequeña proporción de cloruro bórico, hidróxido bórico, o similar, a pH mayor de 7, para precipitar impurezas orgánicas, como se expone en la Patente EE.UU de Purvis y Fike 2.796.433 (18 de Junio de 1957). Después se concentra el líquido purificado, y se ajusta a un pH de aproximadamente 3,2 con ácido sulfúrico ácido clorhídrico, o similares, momento en que cristaliza el ácido L-glutámico, con buen rendimiento.

Se ha hallado que, particularmente a las mayores concentraciones de azúcares, los organismos pueden producir tanto ácido glutámico combinado como el propio ácido glutámico. Por tanto, si se desea, se puede someter a hidrólisis el medio de fermentación, para hidrolizar los compuestos a ácido glutámico libre. De nuevo, la hidrólisis se puede efectuar por medios usuales, tal como, por ejemplo, la hidrólisis ácida descrita en la Patente EE.UU 2.548.124. En el caso de que el medio y las condiciones de fermentación usados no produzcan nada o solo cantidades insignificantes de ácido glutámico combinado, no se necesita emplear hidrólisis, desde luego.

Se incluyen los siguientes ejemplos para poner en evidencia de modo más completo la práctica de la invención. Estos ejemplos se incluyen solo para fines ilustrativos, y de ninguna forma se pretende limitar el ámbito de la invención.

Se emplearon fermentadores de acero inoxidable, de 50 litros, en los que se cargaron inicialmente 39,8 li

326105



5        tros de medio nutriente acuoso. El medio inicial se este-  
rilizó durante 30 min a 121°C, y luego se inoculó con la  
inoculación indicada, a temperatura de aproximadamente 30  
a aproximadamente 32°C. La inoculación constituyó aproxi-  
madamente 10% en volumen sobre la carga.

Los fermentadores de 50 litros estaban provis-  
tos de agitadores de 4 hojas, de 15,3 cm de diámetro, que  
trabajaban a 300 rpm.

10        El contenido de ácido glutámico indicado en los  
ejemplos se determinó empleando el método normalizado de  
descarboxilasa del ácido glutámico, descrito, entre otros  
sitios, en Agricultural and Food Chemistry, vol. 5, nº 6,  
pág. 448, Junio 1957.

15        Ejemplo 1

Se introdujeron en el fermentador 10,5 litros  
del siguiente medio de fermentación, se esterilizaron, y  
se inocularon con Corynebacterium lilium, NRRL-B-2243:

	<u>Medio de fermentación</u>	<u>% en peso sobre el medio</u>
20	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1
	Sólidos de maceración de grano	0,2
	FeSO <sub>4</sub>	0,01
25	CaCl <sub>2</sub>	0,025
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,02
	Acetato de cinc	0,0005
	Sacarosa (como Cerelose)	16,3
	Biotina (purificada)	3,5 gammas/litro
30	El pH del medio se controló a aproximadamente 7,0, con	



amoníaco, y se permitió que la fermentación transcurriera durante 45 horas, tras lo cual no tuvo lugar acumulación significativa de ácido glutámico.

5 El análisis del líquido de fermentación indicó un rendimiento de ácido glutámico de 68,7 mg/ml. De los compuestos de ácido glutámico presentes, el 68% en peso estaba presente como ácido glutámico libre. Basado en el 16,3% inicial de azúcar en la solución, el rendimiento re presentó una conversión molecular del 56,1%.

10

Ejemplo 2

Para poner en evidencia las ventajas de la invención, se efectuó una segunda fermentación empleando los siguientes 39,8 litros de medio inicial.

15	<u>Medio de fermentación</u>	<u>% en peso sobre el medio</u>
	$K_2PO_4$	0,2
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
	$(NH_4)_2SO_4$	0,1
	Sólidos de maceración de grano	0,2
20	$FeSO_4$	0,01
	$CaCl_2$	0,025
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,02
	Acetato de cinc	0,0005
	Sacarosa (como Cerelese)	2%
25	Biotina (purificada)	3,5 gammas/litro

El medio se esterilizó, se inoculó con Corynebacterium lilium, NRRL-B-2243, y se mantuvo a un pH de aproximadamente 7,0, con amoníaco, durante toda la fermentación.

30

Entre las 5 y las 25 horas, se introdujeron por

326105



incrementos en el medio 791 cc/hora de una solución acuosa de Cerelese al 50%. Entre las 27 y las 41 horas se introdujeron en el medio 475 cc adicionales de Cerelese acuoso al 50%. La alimentación se detuvo a las 41 horas, y la fermentación se terminó a las 45 horas.

Durante toda la fermentación, hubo presente, y se consumió en el medio de fermentación, un total de 16,9% de azúcar. El medio final de fermentación contenía 71,4 mg/ml de ácido glutámico, del cual el 72,2% era ácido glutámico libre. Este rendimiento representó una conversión molecular del 73,1%, en contraste con la conversión molecular del 56,1% obtenida en el Ejemplo 1.

### Ejemplo 3

Se efectuó una fermentación discontinua, empleando Corynebacterium lilium, NRRL-B-2243, en 39,8 litros del siguiente medio.

<u>Medio de fermentación</u>	<u>% en peso sobre el medio</u>
$K_2HPO_4$	0,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$(NH_4)_2SO_4$	0,1
Sólidos de maceración de grano	0,2
$FeSO_4$	0,01
$CaCl_2$	0,025
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,02
Acetato de cinc	0,0005
Melazas de remolacha	30

La fermentación se efectuó a un pH de aproximadamente 7,0 durante un total de 45 horas. Las melazas de remolacha

contenían 50% de sacarosa y 0,043 gammas/g de biotina, de forma que el fermentador contenía 15% de azúcar y 13,0 gammas/litro de biotina.

5 Al terminar la fermentación, el medio contenía 8,8 g/ml de ácido glutámico, del cual solo el 14,8% estaba presente como ácido glutámico libre.

#### Ejemplo 4

10 Se efectuó una segunda fermentación de Corynebacterium lilium, NRRL-B-2243, utilizando una alimentación por incrementos de melazas de remolacha. La composición del medio nutriente inicial fue la siguiente:

	<u>Medio de fermentación</u>	<u>% en peso sobre el medio</u>
	$K_2HPO_4$	0,2
15	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
	$(NH_4)_2SO_4$	0,1
	Sólidos de maceración de grano	0,2
	$FeSO_4$	0,01
	$CaCl_2$	0,025
20	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,02
	Acetato de cinc	0,0005
	Sacarosa (como Cerelese)	0,5

25 Después de un período inicial de inducción, de 5 horas, se inició la alimentación por incrementos de las melazas de remolacha. Entre las 5 y las 25 horas se introdujeron en el medio 475 cc/hora de melazas de remolacha. Entre las 27 y las 41 horas se alimentaron por incrementos al medio 285 cc/hora adicionales de melazas de remolacha.

30 La alimentación se terminó después de 41 horas, y la fer-

326105



mentación se terminó después de 45 horas.

Las melazas empleadas como materia prima contenían aproximadamente 0,04 gammas/g, de forma que la biotina total añadida a la fermentación fue aproximadamente  
5 igual a 10,38 gammas/litro.

El caldo final de fermentación contenía 50,9 mg/ml de ácido glutámico, de los cuales esencialmente el 100% era ácido glutámico libre. Este rendimiento representa una conversión molecular del 73,6%. Durante todo el  
10 procedimiento se introdujo un total de 13,06% de azúcar.

#### Ejemplo 5

Para poner más en evidencia las ventajas de la invención, se efectuó una fermentación empleando 10,75  
15 litros de lo que sigue, como medio inicial:

<u>Medio de fermentación</u>	<u>% en peso sobre el medio</u>
Melazas de remolacha	3,0
Pharmamedia	0,3
Sólidos de maceración de grano	0,1
20 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,4
Biotina	2 gammas/litro

El medio se esterilizó e inoculó con Brevibacterium divaricatum, NRRL-2312. El medio se mantuvo a un pH de aproximadamente 7,5, con amoníaco, durante toda la fermentación.  
25

Entre las 5 y las 25 horas se introdujeron por incrementos 475 cc/hora de melazas de remolacha. Entre  
30 las 27 y las 45 horas se introdujeron en el medio 285



cc/hora adicionales de melazas de remolacha. La alimentación se detuvo a las 45 horas, y la fermentación se terminó a las 55 horas.

5 Durante toda la fermentación, hubo presente y se consumió en el medio de fermentación un total de 15,2% de azúcar. El medio final de fermentación contenía 68,3 mg/ml de ácido glutámico, de los cuales el 53,8% era ácido glutámico libre. Este rendimiento representó una conversión molecular del 58,7%.

10

Ejemplo 6

Se efectuó una fermentación empleando 10,75 litros de lo que sigue, como medio inicial:

	<u>Medio de fermentación</u>	<u>% en peso sobre el medio</u>
15	Sólidos de maceración de grano	0,2
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
	CaCl <sub>2</sub>	0,025
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,02
	Acetato de cinc	0,0005
20	Glucosa (dextrosa)	0,5
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
	MgSO <sub>4</sub>	0,2
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1

25 El medio se esterilizó e inoculó con Micrococcus glutamicus, ATCC 13032. El medio se mantuvo a un pH de aproximadamente 7,5, con amoníaco, durante toda la fermentación.

30 Entre las 5 y las 25 horas, se introdujeron por incrementos en el medio 475 cc/hora de melazas de remolacha. (Entre las 27 y las 41 horas se introdujeron en el me

326105



dio 285 cc/hora adicionales de melazas de remolacha). La alimentación se detuvo a las 41 horas, y la fermentación se terminó a las 55 horas.

5 Durante toda la fermentación, hubo presente y se consumió en el medio de fermentación un total de 13,2% de azúcar. El medio final de fermentación contenía 56,7 mg/ml de ácido glutámico, de los cuales el 88,3% era ácido glutámico libre. Este rendimiento representó una conversión molecular de 56,0%.

10

Ejemplo 7

Se efectuó una fermentación empleando 10,75 litros de lo que sigue, como medio inicial:

	<u>Medio de fermentación</u>	<u>% en peso sobre el medio</u>
15	Melazas de remolacha	3,0
	Pharmamedia	0,3
	Sólidos de maceración de grano	0,1
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,4
20	Biotina	2 gammas/litro

El medio se esterilizó e inoculó con Micrococcus glutamicus, ATCC 13058. El medio se mantuvo a un pH de aproximadamente 7,5, con amoníaco, durante toda la fermentación.

25 Entre las 5 y las 25 horas, se introdujeron por incrementos en el medio 475 cc/hora de melazas de remolacha (Entre las 27 y las 45 horas, se introdujeron en el medio 285 cc/hora adicionales de melazas de remolacha). La introducción se detuvo a las 45 horas, y la fermentación se terminó a las 55 horas.

30



Durante toda la fermentación, hubo presente y se consumió en el medio de fermentación un total de 15,2% de azúcar. El medio final de fermentación contenía 72,7 mg/ml de ácido glutámico, de los cuales el 73,3% era ácido glutámico libre. Este rendimiento representó una conversión molecular del 62,5%.

#### Ejemplo 8

Se efectuó una fermentación empleando 10,75 litros de lo que sigue, como medio inicial:

<u>Medio de fermentación</u>	<u>% en peso sobre el medio</u>
Melazas de remolacha	3,0
Pharmamedia	0,3
Sólidos de maceración de grano	0,1
15 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4
Biotina	2 gammas/litro

El medio se esterilizó e inoculó con Micrococcus glutamicus, ATCC 13032. El medio se mantuvo a un pH de aproximadamente 7,5, con amoníaco, durante toda la fermentación.

Entre las 5 y las 25 horas, se introdujeron por incrementos en el medio 475 cc/hora de melazas de remolacha. Entre las 27 y las 45 horas, se introdujeron en el medio 285 cc/hora adicionales de melazas de remolacha. La introducción se detuvo a las 45 horas, y la fermentación se terminó a las 55 horas.

Durante toda la fermentación, hubo presente y se consumió en el medio de fermentación un total de 15,2% de azúcar. El medio final de fermentación contenía 56,7

326105

241



mg/ml de ácido glutámico, de los cuales el 75,9% era ácido glutámico libre. Este rendimiento representó una conversión molecular del 48,6%.

Ejemplo 9

5

Se efectuó una fermentación empleando 10,75 litros de lo que sigue, como medio inicial:

<u>Medio de fermentación</u>	<u>% en peso sobre el medio</u>
Melazas de remolacha	11,0
10 Pharmamedia	0,3
Sólidos de maceración de grano	0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,4

15 El medio se esterilizó e inoculó con Corynebacterium lilium, NRRL-B-2243. El medio se mantuvo a un pH de aproximadamente 7,5, con amoníaco, durante toda la fermentación.

20 Entre las 10 y las 15 horas, se introdujeron por incrementos en el medio 514 cc/hora de melazas de remolacha. Entre las 16 y las 44 horas, se introdujeron en el medio 152 cc/hora adicionales de melazas de remolacha. La introducción se detuvo a las 44 horas, y la fermentación se terminó a las 63 horas.

25 Durante toda la fermentación, hubo presente y se consumió en el medio de fermentación un total de 17,9% de azúcar. El medio final de fermentación contenía 78,0 mg/ml de ácido glutámico, de los cuales el 83,1% era ácido glutámico libre. Este rendimiento representa una con-  
30 versión molecular del 56,9%.



Las conversiones obtenidas en cada uno de los Ejemplos 5 a 9 son significativamente mayores que las obtenidas en las experiencias efectuadas añadiendo todo el carbohidrato nutriente al respectivo medio inicial.

5

## N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

10

1.- Un método de producir ácido glutámico en el cual, un medio de carbohidrato acuoso que contiene una fuente de nitrógeno es fermentado aerobiamente con un sistema de catalizador biológico producido por un microorganismo productor de ácido glutámico, comprendiendo las mejoras de, durante las últimas etapas de la fermentación, añadir carbohidrato por incrementos al medio para mantener un nivel de carbohidrato en el medio de no más que al rededor del 2% en peso.

15

20

2.- El método de la reivindicación 1, en el cual el carbohidrato es añadido por incrementos al medio para mantener un nivel de carbohidrato de no más de alrededor de 1% en peso.

25

3.- El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en el cual dicho microorganismo es un microorganismo productor de ácido glutámico sensible a la biotina, y el cual

326105

24 DIB



comprende la adición de un carbohidrato que contiene biotina conteniendo no más de alrededor de 0,3 unidades gamma por gramo de biotina por incrementos al medio para mantener un nivel de carbohidrato en el medio de no más de alrededor de un 1 % en peso.

5

4.- El método de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el cual un total de por lo menos alrededor de 7,5 % en peso de carbohidrato es añadido durante la fermentación.

10

5.- El método de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4, en el cual un total de alrededor del 10 a alrededor del 20 % en peso de carbohidrato es añadido al medio.

15

6.- El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el microorganismo empleado es seleccionado a partir de los géneros *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium* y *Bacillus*.

20

7.- El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en el cual el carbohidrato es añadido incrementalmente al medio para mantener un nivel de carbohidrato de no más de alrededor de 0,5 % en peso.

8.- El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en el cual el carbohidrato contiene desde alrededor de 0,02 a alrededor de 0,3 unidades gamma por gramo de biotina.

25

9.- El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en el cual el carbohidrato contiene de alrededor de 0,03 a alrededor de 0,17 unidades gamma por gramo de biotina.

10.- El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el carbohidrato es melaza de remolacha.

3P

11.- Un método de producir ácido glutámico.

326105



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

Esta Memoria consta de veintitrés hojas escritas a máquina por una sola cara.

24012 1886

Madrid,

P. A.

*Alvarez*  
Oficio de...  
Por...