

P - 46-651
380831
Case 59484

386831

24 DIC 1971



Memoria descriptiva

SECCION	TRONCA
CLASIFICACION	C
CLASE	C12
SUBCLASE	D
CLASE	C07
SUBCLASE	C

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

entidad / de nacionalidad japonesa

con domicilio en 27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka,

por: "PERFECCIONAMIENTOS EN UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR ACIDO L-GLUTAMICO POR CULTIVO" (Clase Internacional C12d C07c)



La presente invención se refiere a perfeccionamientos en la producción de ácido L-glutámico mediante cultivo de un microorganismo productor de ácido L-glutámico. Más en particular, se refiere a la producción microbio-
5 lógica de ácido L-glutámico usando ácido acético como principal fuente de carbono.

Antes de ahora, respecto a la producción de ácido L-glutámico, algunos metales han sido descritos como capaces de promover notablemente la fermentación, usando
10 sacáridos como materia prima. Es decir, se sabe que el manganeso o cinc son eficaces para promover la producción del ácido a partir de azúcares. Sin embargo, nadie ha sugerido hasta ahora el cobre para tal fin.

Los autores de la presente invención han hallado ahora que el cobre, cuando está dispersado en concentración adecuada en los medios de cultivo, promueve específicamente la producción de ácido L-glutámico, y también que el efecto del cobre es particularmente extraordinario cuando se emplea ácido acético como fuente principal
15 de carbono para el microorganismo productor de ácido L-glutámico.

Por tanto, el principal objeto de la invención es proporcionar un perfeccionamiento en el procedimiento para producir ácido L-glutámico por fermentación con un rendimiento elevado y constante del ácido.
25

Dicho objeto se consigue incorporando una cantidad prescrita de cobre en el medio de cultivo para la producción de ácido L-glutámico por fermentación mediante el microorganismo. Dicha incorporación se efectúa usualmente añadiendo al medio de cultivo una cantidad ajustada
30

22.12.70

386831



24 DIC 1974

de la fuente de cobre, y dejando luego que se disperse el cobre en el medio.

Aunque se conocen hasta ahora muchos microorganismos productores de ácido L-glutámico, según se describe en las patentes EE.UU. nº 3.096.252 y 3.220.929, y en las patentes francesas nº 1.546.260 y 1.580.214, etc, y aunque cualquiera de estos microorganismos puede ser empleado, eminentemente el efecto de la invención se verá cuando se emplee un microorganismo que sea capaz de producir ácido L-glutámico usando ácido acético como fuente principal de carbono. Así, se pueden mencionar a título de ejemplo los microorganismos de los géneros *Brevibacterium*, *Corynebacterium* y *Micrococcus*. Más específicamente, las cepas conocidas que se pueden emplear en la invención se ejemplifican como sigue:

	<i>Brevibacterium thiogenitalis</i> No.594	(ATCC 19240)
	<i>Brevibacterium thiogenitalis</i> D-248	(IFO 12331)
	<i>Brevibacterium thiogenitalis</i> D-253	(IFO 12400)
	<i>Brevibacterium thiogenitalis</i> D-254	(IFO 12401)
20	<i>Brevibacterium flavum</i>	(ATCC 14067)
	<i>Brevibacterium flavum</i> BN-11	(IFO 12525)
	<i>Brevibacterium</i> sp. 111-S09	(IFO 12332)
	<i>Corynebacterium</i> sp. No.1602	(IFO 12399)
	<i>Corynebacterium</i> sp. No.186	(IFO 12398)
25	<i>Micrococcus glutamicus</i>	(ATCC 13032)
	<i>Micrococcus glutamicus</i> No.534-MS-023	(IFO 12523)
	<i>Micrococcus glutamicus</i> No.541-MS-117	(IFO 12524)

Las abreviaturas "ATCC" e "IFO" de los paréntesis significan "American Type Culture Collection", Maryland, EE.UU., e "Institute for Fermentation, Osaka", Osaka, Japón, res-

30
22.12.70



24

pectivamente. Los números unidos a las abreviaturas son los números de acceso de las cepas en los lugares especificados en que estén depositadas, y por tanto aquellos organismos están disponibles para cualquiera que esté interesado en y calificado para el campo de esta técnica.

5

Para incorporar cobre en el medio de cultivo se emplea cobre metálico y, más en general, compuestos de cobre, siempre que sean solubles en agua a la concentración deseada, dentro del intervalo especificado más adelante. Tales compuestos pueden ser compuestos cuprosos (es decir, monovalentes) o cúpricos (es decir, divalentes). Entre esos compuestos se encuentran los compuestos de cobre, inorgánicos u orgánicos, tan variados como el sulfato de cobre, cloruro de cobre bromuro de cobre, yoduro de cobre, 10 tiocianato de cobre, óxido de cobre, hidróxido de cobre, cloruro de cobre amónico, sulfuro de cobre, fosfato de cobre, carbonato de cobre, carbonato hidróxido de cobre, etilendiaminotetraacetato de cobre, oxalato de cobre, citrato de cobre, acetato de cobre y similares. Se pueden emplear, 15 si se desea, materiales que contienen cobre presente en la naturaleza, tales como grados de líquido de maceración de grano que contienen cobre, productos secundarios de destilación ricos en cobre, y similares, con precauciones respecto a la concentración resultante de cobre dispersado en el medio de cultivo. Desde luego, esos materiales 20 y/o esos compuestos pueden ser empleados en combinación.

La concentración de cobre a ajustar para la producción de ácido L-glutámico, como cobre o catión cobre en el medio de cultivo principal, es aproximadamente de 30 0,005 a 1 ppm, y preferiblemente de aproximadamente 0,01

22.12.70

386831

24 DIC



a aproximadamente 0,5 ppm.

Esos compuestos de cobre y/o materiales que contienen cobre pueden ser añadidos al medio de cultivo principal en su preparación o en el curso del cultivo. Alternativamente, se pueden tomar medidas tales que el cobre sea transferido junto con el organismo, desde el medio de cultivo de siembra al medio de cultivo principal. Así, se pueden emplear para la adición cualquier medio de incorporación adecuado y cualquier momento adecuado, pero la adición debe hacerse antes de que haya producción sustancial de ácido L-glutámico en el medio de cultivo principal.

Entre los ingredientes del medio a emplear en la práctica de la invención, además de los iones cobre, están las fuentes de carbono y nitrógeno, así como otros nutrientes. Entre las fuentes de carbono, el ácido acético es particularmente beneficioso en cuanto al efecto de los iones cobre. Aunque el mecanismo exacto implicado está aún por dilucidar, parece que los iones cobre promueven la actividad del sistema de enzimas responsable de la producción de ácido L-glutámico a partir de tal fuente de carbono. Entre las fuentes de nitrógeno que se pueden utilizar ventajosamente están el amoníaco gaseoso, amoníaco acuoso, sales amónicas, urea y similares. Entre las sales inorgánicas que se pueden emplear se incluyen, entre otras, las sales de K, Mg, Mn, Fe, Ca y ácido fosfórico. Si es necesario, también se pueden incorporar otros nutrientes tales como extracto de levadura, levadura seca, líquido de maceración de grano, etc.

Otras condiciones de cultivo, tales como el pH del medio de cultivo, la temperatura de cultivo o el perio

22.12.70

386831



do de cultivo, dependen más del microorganismo empleado, pero generalmente son aproximadamente de pH 6,5 a 9,5, 25°C a 37°C, y 20 a 60 horas, respectivamente.

La invención se describirá más por referencia a los siguientes ejemplos, que en forma alguna deben ser considerados como limitativos del ámbito de la invención. En los ejemplos, así como en lo que antecede, las abreviaturas "ml", "g", "mg", "γ", "rpm", "ppm" y "%" significan mililitro(s), gramo(s), miligramo(s), gamma(s), revoluciones por minuto, parte(s) por millon y tanto por ciento, respectivamente. Los tantos por ciento relativos a los componentes del medio de cultivo tienen como base el peso por volumen, es decir gramos por decilitro, y los tantos por ciento relativos a otros conceptos son en peso, a no ser que se indique otra cosa.

Ejemplo 1

Unas porciones de 20 ml de un medio de cultivo de siembra consistente en glucosa (2,0%), urea (0,5%), KH_2PO_4 (0,1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01%), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,001%), monoestearato de polioxietilén-sorbitán[®] (0,02%), CaCO_3 (0,1%), oleato sódico (200 mg/litro) y agua fueron distribuidas en matraces cónicos de 200 ml, que luego fueron esterilizados de manera usual. Cada matraz fué inoculado con una de las cepas relacionadas en la tabla 1, y el matraz inoculado fué incubado en un agitador rotatorio a 200 rpm y 28°C durante 24 horas.

Independientemente, unas porciones de 50 ml de un medio de cultivo principal, consistente en acetato amónico (1,2%), KH_2PO_4 (0,1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,001%), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01%), una cantidad -



24 Lit

variable de cobre que se muestra en la tabla 1 (añadido como $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), vitamina B_1 (100 γ /litro), biotina (30 γ /litro), oleato sódico (200 mg/litro), rojo fenol^{***} (10 mg/litro) y agua, fueron distribuidas en matraces cónicos tapados de 200 ml de capacidad, que luego fueron esterilizados. 5
Unas porciones de 3,5 ml del cultivo de siembra antes obtenido fueron transferidas a aquellos matraces, e incubadas a 32°C con agitación durante 48 horas. La fuente principal de carbono, ácido acético, fué introducida en cada matraz 10
en 30 porciones a intervalos de 1 hora, empezando a la 10ª hora de incubación, siendo cada porción de 0,5% de ácido acético en relación al volumen inicial del medio de cultivo. En total, el ácido acético así añadido ascendió al 15% en peso, en relación al volumen inicial del medio. Durante 15
el cultivo, el medio fué mantenido a pH de 7 a 8,5, con adición de una solución de amoniaco acuoso al 14%.

Los resultados así obtenidos se muestran en la tabla 1.

* Disponible en el comercio, por ejemplo con la 20
marca registrada Tween 60, distribuida por Atlas Powder Company, Wilmington, Delaware, EE.UU.

** Como indicador del pH. Conocido como fenol-sulfoftaleína.

22.12.70

386831

Tabla I
 Efectos de diferentes concentraciones de cobre sobre los rendimientos ~~XXXX~~ de ácido glutámico

Organismo	0	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	2,5
<i>Brevibacterium thiogenitalis</i> D-248 (IFO 12331)	8	26	35	40	49	52	46	35	21	5
<i>Brevibacterium flavum</i> BN-II (IFO 12525)	5	13	19	38	46	43	40	33	15	5
<i>Micrococcus glutamicus</i> No.534 MS-023 (IFO 12523)	10	17	23	35	41	43	37	32	15	0
<i>Corynebacterium</i> sp.No.186 (IFO 12398)	10	20	29	41	50	51	49	35	25	8

~~XXXX~~ Todos los organismos usados requieren ácido graso insaturado superior para su crecimiento.
~~XXXX~~ Todos los rendimientos son en tanto por ciento en peso, en relación al ácido acético usado.

386831



24 JUL 19



Ejemplo 2

Unas porciones de 20 ml de un medio de cultivo de siembra consistente en glucosa (2,0%), urea (0,5%), KH_2PO_4 (0,1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01%), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,001%), biotina (5 γ /litro), vitamina B_1 (100 γ /litro) y agua fueron distribuidas en matraces cónicos de 200 ml de capacidad, que luego fueron esterilizados. Cada matraz fué inoculado con *Brevibacterium thiogenitalis* n° 594 (ATCC 19240), e incubado a 28°C en un agitador rotatorio a 200 rpm durante 24 horas.

Independientemente, unas porciones de 50 ml de un medio de cultivo principal consistente en acetato amónico (1,2%), KH_2PO_4 (0,1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,001%), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01%), cobre (0,05 ppm, añadido en forma de acetato cúprico), biotina (2 γ /litro), vitamina B_1 (100 γ /litro), rojo fenol (10 mg/litro) y agua fueron distribuidas en matraces cónicos tapados de 200 ml de capacidad, que luego fueron esterilizados. Cada uno de los matraces fué inoculado con 3,5 ml del cultivo de siembra preparado antes, e incubado por el método descrito en el ejemplo 1.

El rendimiento obtenido usando cobre fué 42%, basado en el ácido acético usado. En contraste, el rendimiento conseguido sin adición de acetato de cobre fué 5%. Una porción de 1 litro del caldo de cultivo obtenido con adición de acetato de cobre fué centrifugada, para separar los sólidos. Luego se trató el caldo de manera usual para cristalizar ácido L-glutámico, con lo que se obtuvieron 50 g de cristales crudos de ácido L-glutámico.

22.12.70

386831



24.11.70
Ejemplo 3

5 Se siguieron los métodos del ejemplo 1, salvo en que no se añadió sal de cobre al medio de cultivo principal, sino que se incorporaron 2 ppm de cobre en el medio de cultivo de siembra (añadido en forma de sulfato cúprico), y que se usó *Brevibacterium thiogenitalis* D-248 (IFO 12331) como microorganismo elaborador, con lo cual se obtuvo ácido glutámico en rendimiento del 50%, basado en el ácido acético usado. Se centrifugó 1 litro del caldo de cultivo resultante, para separar los sólidos, y fué tratado de manera usual para cristalizar ácido L-glutámico; con lo que se obtuvieron 58 g de cristales crudos de ácido L-glutámico.

Ejemplo 4

15 Se siguieron métodos similares a los descritos en el ejemplo 1, salvo en que el medio de cultivo de siembra consistió en glucosa (2,0%), urea (0,5%), líquido de maceración de grano (1,0%), KH_2PO_4 (0,1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), CaCO_3 (0,1%), oleato sódico (200 mg/litro) y -
20 agua, y en que se usó *Brevibacterium thiogenitalis* D-248 (IFO 12331) como microorganismo, y en que no se añadió cobre al medio de cultivo principal. El rendimiento resultante de ácido L-glutámico fué 51%, en relación al ácido acético usado. Los caldos fueron mezclados, y una porción de 1 litro de ellos fué tratada según el método habitual para cristalizar ácido L-glutámico, con lo que se obtuvieron 60 g de cristales crudos de ácido L-glutámico.

30 La concentración de cobre en el líquido de maceración de grano antes empleado fué 75 ppm, lo que equi

22.12.70



vale a concentraciones de 0,75 ppm y 0,049 ppm en los -
medios de cultivo de siembra y de cultivo principal, res-
pectivamente.

Ejemplo 5

5 Los efectos del cobre fueron estudiados por los
métodos expuestos en el ejemplo 4, salvo en que el conte-
nido de cobre en el líquido de maceración de grano usado
fué considerablemente menor. Así, se incorporó en el medio
de cultivo de siembra un líquido de maceración de grano
10 que contenía 5 ppm de cobre, y los rendimientos de ácido
L-glutámico fueron comparados entre el caldo de cultivo
obtenido sin adición de cobre al medio de siembra y el
caldo obtenido con adición de 1 ppm de cobre (añadido co-
mo cloruro cúprico). Se halló que los rendimientos, en re-
15 lación al ácido acético usado, fueron 18% frente a 50%,
respectivamente.

Ejemplo 6

Se siguieron los métodos del ejemplo 2, salvo
en que se usó como microorganismo el *Brevibacterium flavum*
20 (ATCC 14067). Los rendimientos resultantes de ácido L-glu-
támico, en relación al ácido acético usado, fueron 29% con
el caldo de cultivo obtenido con adición de acetato cúpri-
co, y 4% con el caldo de cultivo obtenido sin adición de
cobre, respectivamente.

Ejemplo 7

25 Se siguieron los métodos del ejemplo 2, salvo
en que se usó como microorganismo el *Micrococcus glutami-
cus* (ATCC 13032). Los rendimientos resultantes de ácido
L-glutámico, en relación al ácido acético usado, fueron
30 33% para el caldo de cultivo obtenido con adición de acé-

22.12.70

386831



tato cúprico, y 5% para el caldo de cultivo sin constituyente de cobre, respectivamente.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Japón, el 25 de Diciembre de 1.969, bajo el N^o 10 4578/1969 se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial

REIVINDICACIONES

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:

1. Perfeccionamientos en un procedimiento para producir ácido L-glutámico por cultivo de un microorganismo productor de ácido L-glutámico en un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, los cuales perfeccionamientos comprenden añadir cobre al medio de cultivo, y dejar que el cobre se disperse en el medio de cultivo a una concentración de aproximadamente 0,005 a 1 parte por millón del medio.

2. Perfeccionamientos según la reivindicación 1, donde la fuente de carbono es principalmente ácido acético.

3. Perfeccionamientos según la reivindicación 1, donde la concentración del catión cobre en el medio es de 0,01 a 0,5 partes por millon.

4. Perfeccionamientos en un procedimiento para

Handwritten signature and date: 22.12.70

386831

24 DIC.



producir ácido L-glutámico por cultivo.

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

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

5

Madrid,

24 DIC. 1970

P.A.

FOR POST
FOR POST
[Handwritten signature]

22.12.70
MSG

386831