



**CONCEDIDA**

**PATENTE DE INVENCION**

10	ES	11	NUMERO	10	A 1
		21	463.569		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			26-10-1977		

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C 12 D		

54 TITULO DE LA INVENCION

"UN METODO DE PRODUCIR ACIDO L-GLUTAMICO"

71 SOLICITANTE (S)

AJINOMOTO CO., INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

No. 6, 1-chome, Kyobashi, Chuo-ku, Tokyo, Japon

72 INVENTOR (ES)

Sumio Inoue  
Kunimori Niwa

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-67.252)

JGA

POOR  
QUALITY

1                   Esta invención se refiere a un método para producir ácido L-glutámico por fermentación y, en particular, se refiere a un método para producir ácido L-glutámico, utilizando el azúcar de las melazas como fuente de carbono.

5                   En el método de producción de ácido L-glutámico por fermentación, en el que se utilizan melazas de remolacha o de caña de azúcar como fuente de carbono, la biotina, que está contenida con exceso en las melazas, disminuye considerablemente el rendimiento de ácido L-glutámico.

10                  Con el fin de suprimir la influencia de la biotina en exceso sobre la producción de ácido L-glutámico, se añaden al medio de fermentación agentes tensioactivos o penicilinas, durante la fase logarítmica de crecimiento de la bacteria productora del ácido L-glutámico.

15                  Por otra parte, usualmente la fuente de carbono se alimenta al medio de fermentación durante el cultivo, para aumentar la cantidad de fuente de carbono utilizada y, por consiguiente, la cantidad de ácido L-glutámico acumulada. Sin embargo, cuando se alimentan melazas al medio de fermentación, se lleva también al medio de fermentación la biotina de las melazas y la biotina de nueva aportación influye también sobre la producción de ácido L-glutámico.

25                  Por las razones anteriores, cuando se alimentan melazas al medio de fermentación, son necesarias cantidades adicionales de agentes tensioactivos o penicilinas, para suprimir la biotina de nueva aportación, o se suplementan los agentes tensioactivos o las penicilinas cuando se alimentan las melazas. El uso adicional de agentes tensioactivos o penicilinas, caros, cuesta muchísimo.

30                  El objeto más importante de esta invención

1 es, por lo tanto, encontrar un nuevo procedimiento mediante el cual puedan alimentarse melazas que contienen una ex  
 cesiva cantidad de biotina, al medio de fermentación, sin  
 hacer disminuir los rendimientos de ácido L-glutámico y sin  
 5 utilizar los agentes tensioactivos o penicilinas de alto  
 precio.

Se encuentra ahora que se pueden alimentar  
 las melazas al medio de fermentación, sin disminuir el ren-  
 dimiento de ácido L-glutámico y sin utilizar adicionalmente  
 10 los caros agentes tensioactivos o penicilinas, iniciando el  
 cultivo de una bacteria productora de ácido L-glutámico en  
 un medio de fermentación que contiene azúcar de melazas en  
 una cantidad del 5 al 10% en peso y a una temperatura de 30  
 a 33°C, añadiendo a dicho medio de fermentación una cantidad  
 15 eficaz de agente tensioactivo o penicilinas durante la fase  
 logarítmica de crecimiento de dicha bacteria, alimentando  
 azúcar de melazas al medio de fermentación en una concentra-  
 ción del 2 al 8% en peso de azúcar, cuando la concentración  
 del azúcar en el medio de fermentación cae por debajo del 2%  
 20 en peso, y aumentando la temperatura de dicho medio de fer-  
 mentación, después de o durante la alimentación del azúcar,  
 en 1 a 2°C.

Las bacterias productoras de ácido L-glutámi-  
 co utilizadas en esta invención, son bacterias aerobias, que  
 25 no forman esporas, grampositivas y en forma de bastoncillos,  
 denominadas bacterias coryneformes y necesitan, además, bio-  
 tina para su crecimiento, incluyendo, por ejemplo:

Brevibacterium divaricatum	ATCC 14020
Brevibacterium flavum	ATCC 13826
30 Brevibacterium lactofermentum	ATCC 13869

1	Brevibacterium roseum	ATCC 13825
	Brevibacterium saccharolyticum	ATCC 14066
	Corynebacterium acetoacidophilum	ATCC 13870
	Corynebacterium glutamicum	ATCC 13032 y
5	Corynebacterium lilium	ATCC 15990

Los medios de fermentación en los que se inicia el cultivo de la bacteria, son los convencionales, a excepción de que los medios contienen melazas, como fuente de carbón, en una proporción de 5 a 10% en peso de azúcar de melazas.

Las melazas utilizadas como fuente de carbono de esta invención, son las melazas de remolacha y de caña de azúcar.

Durante el cultivo, se añaden al medio de fermentación agentes tensioactivos o penicilinas, para suprimir la influencia de la biotina excesiva. Aunque las cantidades de agentes tensioactivos y de penicilinas añadidas al medio de fermentación, varían con la concentración de biotina del medio de fermentación y con otras condiciones de la fermentación, las cantidades de agentes tensioactivos son usualmente entre 0,00 y 0,4 g/dl, la cual cantidad es menos de la mitad que en el método conocido, y las cantidades de penicilina están comprendidas entre 1 y 3 UI/ml.

Los agentes tensioactivos preferidos son los agentes tensioactivos no iónicos, tales como ésteres alcohólicos de ácidos grasos superiores. La palabra penicilinas se utiliza en su sentido más amplio en esta invención, incluyendo las penicilinas biosintéticas y las sintéticas.

Cuando la concentración de azúcar en el medio de fermentación cae hasta un nivel inferior al 2% en peso,

1 se alimentan melazas al medio de fermentación con una con-  
 centración del 2 al 8% en peso de azúcar. La alimentación  
 de melazas se efectúa repetidamente hasta que se han alimen-  
 5 tado de 14 a 22 gramos de azúcar por volumen final del me-  
 dio de fermentación.

Inicialmente, la temperatura del medio de fer-  
 mentación se ajusta hasta un nivel de 30 a 33°C. Después,  
 cuando se alimentan las melazas, se aumenta la temperatura  
 en 1 a 3°, durante o después de la alimentación del azúcar  
 10 de melazas. Preferiblemente, la temperatura no excede de 39°C,  
 cuando se ha completado la alimentación de azúcar.

La fermentación se realiza como es usual, en  
 condiciones aerobias, ajustando el pH a 7-8, preferiblemente  
 con amoníaco gaseoso.

15 La fermentación se termina cuando se han ali-  
 mentado y consumido de 14 a 22 gramos de melazas, en forma  
 de glucosa, por volumen final de medio de fermentación, y  
 del caldo de cultivo resultante se recoge el ácido L-glutá-  
 mico acumulado, por un método convencional.

20 De acuerdo con el método de esta invención,  
 no solamente se reducen las cantidades de agentes tensioacti-  
 vos o de penicilinas necesarias para suprimir la biotina en  
 exceso, sino que también se puede obtener un rendimiento muy  
 elevado de ácido L-glutámico.

25 Ejemplo 1 (Comparativo)

	Medio de cultivo de siembra	Medio de fermentación
Sacarosa	2,5 (como glucosa)	-
Azúcar de me- lazaras de caña	-	6,0

1	Urea	0,2 % (en peso)	-
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1 " ( " )	0,2 % (en peso)
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04 % ( " )	0,08 % ( " )
	$\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,001" ( " )	0,002" ( " )
5	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,001" ( " )	0,002" ( " )
	Hidrolizado de proteína de soja	0,2 " ( " )	0,5 " ( " )
	Tiamina.HCl	200 $\mu\text{g}/\text{l}$	200 $\mu\text{g}/\text{l}$
	Biotina	300 "	-

10 En 300 ml de medio de fermentación colocados en un fermentador de 1 litro, se incubó *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, cultivado previamente en el medio de cultivo de siembra mencionado arriba, a 31°C, durante 18 horas.

15 La fermentación se realizó por vía aerobia, ajustando el pH del medio a 7,9 con amoníaco gaseoso, y la temperatura a 31,5°C. Cuando la densidad óptica a 562 m $\mu$  de una dilución de 26 veces del medio de fermentación alcanzó el valor de 0,60, se añadió monopalmitato de polioxiethylensorbitán, hasta un contenido de 0,6 g/dl, al medio de fermentación.

20 La concentración de azúcar en el medio de fermentación cayó a 0,5 g/dl y se alimentaron al fermentador 40 ml de melazas de caña (conteniendo 17 g de azúcar).

25 Después, la concentración de azúcar cayó dos veces hasta 0,5 g/dl, y se alimentaron, dos veces, 40 ml de melazas de caña de azúcar.

30 El volumen del medio de fermentación resultó finalmente de 420 ml; y la cantidad total de azúcar utilizada fue de 68,9 g.

1 Al cabo de 30 horas de cultivo desde la iniciación, se produjeron 33,1 g de ácido L-glutámico.

#### Ejemplo 2.

5 En el método descrito en el Ejemplo 1, se utilizaron 0,2 g/dl de monopalmitato de polioxietilensorbitán, en lugar de 0,6 g/dl.

Se alimentó al medio de fermentación, de la misma manera, la misma cantidad de azúcar de melazas de caña, a excepción de que cuando se alimentaron las melazas de caña, se aumentó la temperatura hasta 33,5°C, 35,5°C y, finalmente, 37,5°C.

15 Al cabo de 29 horas de cultivo desde la iniciación, se produjeron 37,0 g de ácido L-glutámico. Del caldo de fermentación se recogieron 33,3 g de ácido L-glutámico, por un método convencional.

#### Ejemplo 3

(Comparativo)

20 En el medio de fermentación mostrado en el Ejemplo 1, se utilizaron 10 g/dl de azúcar de melazas de remolacha, en lugar de 6 g/dl de azúcar de melazas de caña.

En 300 ml del medio de fermentación, colocados en un fermentador de 1 litro, se inoculó *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, previamente cultivado en el medio de cultivo de siembra indicado en el Ejemplo 1, a 31°C durante 18 horas.

25 La fermentación se realizó por vía aerobia, ajustando el pH del medio a 7,9 con amoníaco gaseoso, y la temperatura a 30°C.

30 Se añadió al medio penicilina G (2 UI/ml) cuando la densidad óptica a 562 mμ en una dilución de 26 veces del medio, alcanzó el valor de 0,70.

1 La concentración de azúcar en el medio de  
fermentación llegó a ser de 1,0 g/dl, y se alimentaron al  
fermentador 38 ml de melazas de remolacha (conteniendo 14,5  
g de azúcar). Después, la concentración de azúcar llegó a  
5 ser nuevamente de 1,0 g/dl, y se alimentaron al fermentador  
37 ml de melazas de remolacha (conteniendo 14,0 g de azúcar).

Al cabo de 42 horas de cultivo desde la ini-  
ciación de la fermentación, se acumulan en el caldo de fer-  
mentación 8,7 g/dl de ácido L-glutámico (siendo el rendimien-  
10 to de 55,7%).

#### Ejemplo 4.

En el método que se ha descrito en el Ejemplo  
3, se utilizó una UI/ml de penicilina, en lugar de 2 UI/ml, y  
cuando se alimentaron las melazas de remolacha, se aumentó  
15 en 1,5°C la temperatura de fermentación.

Al cabo de 40 horas de cultivo desde la ini-  
ciación de la fermentación, se acumularon 10 g/dl de ácido  
L-glutámico (siendo el rendimiento del 64%).

#### Ejemplo 5.

20 En el método mencionado en el Ejemplo 2, se  
ajustó la temperatura de cultivo inicialmente a 32,5°C, y la  
alimentación de las melazas de caña se realizó de la manera  
siguiente: Una porción de 20 ml de melaza de caña, conteniendo  
3,5 g de azúcar, se alimentó en el fermentador, 6 veces,  
25 cuando la concentración de azúcar en el medio de fermentación  
cayó a 0,5 g/dl. Y cuando se alimentaron las melazas de caña,  
se aumentó la temperatura de cultivo en 1,0°C. Finalmente,  
la cantidad total de azúcar utilizada fue de 77 g, el volu-  
men total del medio de fermentación resultó de 420 ml, y la  
30 temperatura llegó a los 37,5°C.

1 Al cabo de 30 horas de cultivo desde la iniciación, se produjeron 37,8 g de ácido L-glutámico.

Ejemplo 6.

5 En el método mencionado en el Ejemplo 2, se ajustó inicialmente la temperatura de cultivo a 33°C, y la alimentación de melazas de caña se realizó de la manera siguiente: una porción de 60 ml de melazas de caña, conteniendo 25,4 g de azúcar, se alimentó al fermentador, dos veces, desde que la concentración de azúcar en el medio de fermentación cayó, dos veces, hasta 0,5 g/dl, al tiempo que se aumentaba la temperatura en 2°C.

10 Al cabo de 30 horas de cultivo, se produjeron 36,5 g de ácido L-glutámico.

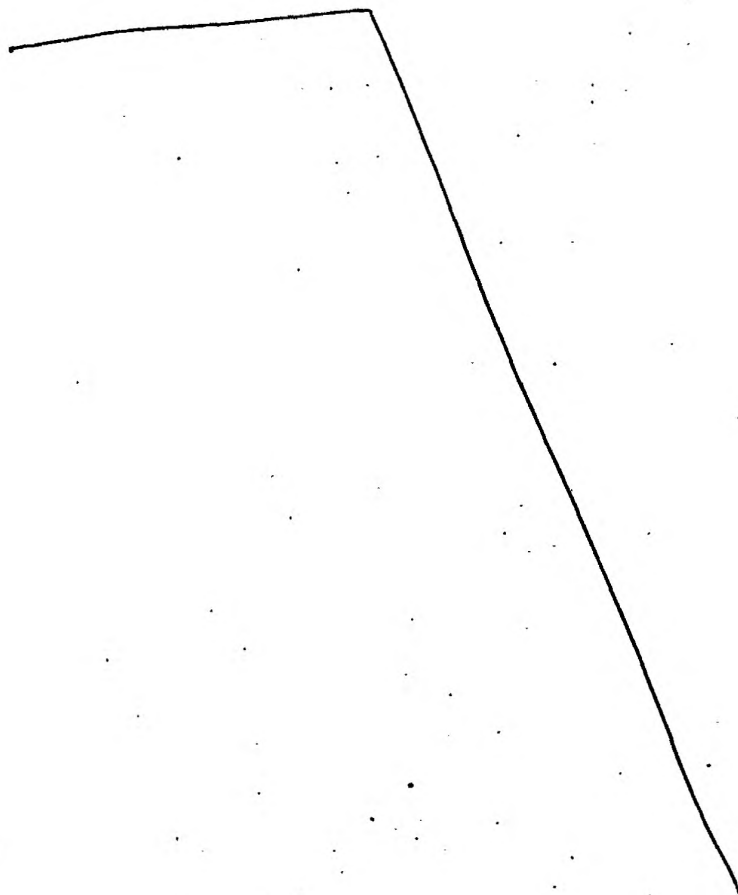
15

20

25

30

24117



1

REIVINDICACIONES

5

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1.<sup>a</sup>.- Un método para producir ácido L-glutámico, que comprende: (1) iniciar el cultivo de una bacteria productora de ácido L-glutámico, en un medio de fermentación que contiene el azúcar de melazas en una cantidad del 5 al 10% en peso y a una temperatura de 30 a 33°C; (2) añadir a dicho medio de fermentación una cantidad eficaz de agente tensioactivo o de penicilina, durante la fase logarítmica de crecimiento de dicha bacteria; (3) alimentar repetidamente a dicho medio de fermentación el azúcar de melaza, en una concentración del 2 al 8% en peso en dicho medio de fermentación, cuando la concentración de azúcar en dicho medio de fermentación cae por debajo del 2% en peso; (4) elevar la temperatura de dicho medio de fermentación, después o durante cada una de las alimentaciones del azúcar de melazas, en 1 a 2°C, y (5) recoger el ácido L-glutámico acumulado en dicho medio de fermentación.

25

2.<sup>a</sup>.- "UN METODO PARA PRODUCIR ACIDO L-GLUTAMI-

CO".

30

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

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

5 Madrid, 30. NOV. 1977

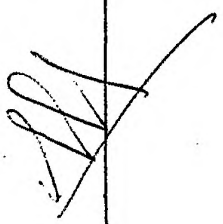
P.A. **Alberto de Elizaburu**  
Por Poder. *Alte*

10

15

20

25



30