

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial

20 SET. 1978

ES

NUMERO

467.712

AI



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los . . . e fig. . . en la presente de . . . n y según el contenido de la memoria adjunta.

FECHA DE PRESENTACION

9-3-1978

PATENTE DE INVENCION

A1 467.712 781016 C12D 13/06

50 PRIORIDADES:	52 FECHA	53 PAIS
51 NUMERO		
26758/77	10-3-1977	Japón

43 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	

54 TITULO DE LA INVENCION

"UN METODO PARA PRODUCIR ACIDO L-GLUTAMICO POR FERMENTACION"

71 SOLICITANTE (S)

AJINOMOTO CO., INC. (Case A-417)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

No. 5-8, Kyobashi 1 chome, Chuo-ku, Tokyo, Japón

72 INVENTOR (ES)

Yasutsugu YAMADA, Eiji ONO, Nobukazu KASHIMA y Koichi TAKINAMI

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-68.426)

jga

POOR QUALITY

1 Esta invención se refiere a un método para producir ácido L-glutámico por fermentación.

5 En el método de producción de ácido L-glutámico por fermentación, es necesario que haya d-biotina, o sustancias que tienen la actividad de d-biotina (en adelante la d-biotina y las sustancias se denominan en general "biotina") en el medio de cultivo. Sin embargo, es sabido que cuando la cantidad de biotina es excesiva en el medio disminuye muchísimo el rendimiento de ácido L-glutámico, a pesar del abundante desarrollo de bacterias productoras de ácido glutámico. El intervalo de biotina óptimo para la producción de ácido L-glutámico es usualmente de 2 a 4 $\mu\text{g/l}$.

15 Por otra parte, cuando se usan como fuente de carbono melazas de remolacha o de caña que contienen altas cantidades de biotina, hay demasiada cantidad de ésta contenida en el medio, y el rendimiento de ácido L-glutámico disminuye de modo importante. Para eliminar el efecto indeseable de la cantidad excesiva de biotina, se añaden a los medios de cultivo sustancias que suprimen la actividad de biotina, tales como agentes tensioactivos o antibióticos (denominada en adelante sustancia anti-biotina).

20 Se ha encontrado ahora que cuando se añade biotina hasta un contenido de más de 30 $\mu\text{g/l}$ incluso al medio de cultivo que contiene una cantidad excesiva de biotina como de 20 $\mu\text{g/l}$ por ejemplo, el rendimiento de ácido glutámico es más alto que en el caso de no añadir biotina al medio que contiene la cantidad excesiva de biotina. Además, el tiempo necesario de cultivo es más corto que el caso ordinario citado antes.

30 Se proporciona ahora un método para producir

1 ácido L-glutámico, que comprende:

(a) añadir una sustancia que tiene la actividad de d-biotina para que contenga más de 30 $\mu\text{g/l}$ a un medio de cultivo que contiene hidratos de carbono como fuente de carbono y menos de 20 $\mu\text{g/l}$ teniendo la sustancia la actividad de d-biotina, siendo el peso de sustancia igual al de biotina que muestra la misma actividad con la sustancia,

(b) cultivar un microorganismo productor de ácido L-glutámico del genero Brevibacterium o Corynebacterium en el medio de cultivo preparado en la operación (a),

(c) añadir al medio de cultivo agente tensioactivo o penicilina durante la etapa exponencial de desarrollo del microorganismo, y

15 (d) recuperar ácido L-glutámico acumulado en el medio de cultivo.

Los medios de cultivo empleados en esta invención son los que contienen una cantidad excesiva de biotina pero menos de 20 $\mu\text{g/l}$, y contienen hidratos de carbono como fuente de carbono, tales como glucosa y sacarosa, y materiales que contienen tales hidratos de carbono (melazas de remolacha, melazas de caña o hidrolizado de almidón). Como fuentes de nitrógeno, los medios de cultivo contienen fuentes de nitrógeno ordinarias, tales como sales de amonio, amoníaco gaseoso, amoníaco acuoso o urea. Cuando se requiere se añaden como suplemento al medio de cultivo iones inorgánicos tales como iones magnesio, iones ferroso, iones fosfato o iones manganeso, y nutrientes orgánicos en pequeña proporción, tales como aminoácidos.

30 La biotina (d-biotina y las sustancias que

1 tienen la actividad de biotina) incluye la d-biotina, destio
biotina, ácido 7,8-diaminopelargónico y sulfóxido de d-bioti
na, y tienen la actividad de biotina en el método de evalua
ción usando *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. El método de
5 evaluación es según "Seikagaku-jikken-koza" Vol 13, 351,
Tokyo-kagakudoninsha (Japón) (1975). El peso de la sustan
cia que tiene la actividad de d-biotina usada en esta inven
ción es igual al de d-biotina que muestra la misma actividad
en el método de evaluación citado antes con la sustancia.

10 Las sustancias anti-biotina son aquéllas que
suprimen la actividad de biotina, y son por ejemplo las pe
nicilinas G, F, K, O, V y X, y un agente tensioactivo tal
como monopalmitato de sacarosa y monoestearato de sacarosa,
monomiristato de sacarosa, monopalmitato de polioxietilen-
15 sorbitán, monopalmitato de ácido N-palmitoilglutámico-sorbi
tán, monopalmitato de polioxietilenglicol, ácido palmítico,
ácido esteárico o ácido mirístico.

Las sustancias anti-biotina se añaden al me
dio de cultivo preferiblemente durante la etapa exponencial
20 del desarrollo del microorganismo. La cantidad de sustancias
anti-biotina añadida al medio de cultivo no varía tanto con
el contenido de biotina en el medio, según esta invención.

Los microorganismos usados en la invención son
los llamados bacterias productoras de ácido glutámico de for
25 ma Coryno, y son por ejemplo:

Brevibacterium flavum ATCC 14067,

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869,

Brevibacterium devaricatum ATCC 14020,

Brevibacterium saccharoliticum ATCC 14066,

30 *Corynebacterium glutamicum* (*Micrococcus glutamicus*),

1 ATCC 13032, y

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870.

Según esta invención, el rendimiento de ácido L-glutámico se aumenta notablemente, y se acorta de modo significativo el período de fermentación necesario.

Ejemplo 1

Se preparó un medio de cultivo acuoso que contenía 50 mg/ml de sacarosa de melazas de remolacha, 1,0 mg/ml de KH_2PO_4 , 0,4 mg/ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 240 $\mu\text{g/ml}$ (en forma de nitrógeno total) de hidrolizado de proteína de soja, y se ajustó a un pH de 7,0 con sosa cáustica, y además estaba contenida en el medio la cantidad de d-biotina mostrada en la Tabla 1. Se colocaron porciones de 30 ml del medio de cultivo acuoso en matraces agitados de 500 ml, y se calentaron a 115°C durante 10 minutos.

Se cultivó *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 a 31,5°C con agitación en el medio de cultivo citado anteriormente. El pH del medio se ajustó a 6,5-8,0 añadiendo 450 mg/ml de urea durante el cultivo. Al cabo de 5 horas de cultivo se añadió a cada porción la cantidad de monopalmitato de sacarosa mostrada en la Tabla 1.

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

d-biotina añadida al medio ($\mu\text{g/l}$)	Conc. total de d-biotina ($\mu\text{g/l}$)	Monopalmitato de sacarosa añadida ($\mu\text{g/ml}$)	Rendimiento de ácido L-glutámico (%)	Tiempo de cultivo (horas)
0	3	0,8	59	35
5	8	0,8	59	35
10	13	0,8	59	35

1

Tabla 1 (continuación)

	15	18	0,9	59	35
	20	23	0,9	59	35
	25	28	0,9	59	35
5	30	33	1,0	61	32
	35	38	1,5	62	31
	40	43	2,0	63	30
	60	63	2,0	64	29
	90	93	3,0	65	28
10	140	143	3,0	66	27
	190	193	4,0	67	27
	290	293	4,0	68	26

Ejemplo 2

Se preparó un medio de cultivo acuoso que contenía 150 mg/ml de sacarosa de melazas de remolacha, 1,0 mg/ml de KH_2PO_4 , 1,0 mg/ml de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y 100 microg/l de tiamina.HCl, y se ajustó a pH 7,0. Dos porciones de 300 ml del medio de cultivo acuoso se colocaron en fermentadores de 1 l, se calentaron a 115°C durante 10 minutos, y se inoculó *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869.

Se efectuó el cultivo a 31,5°C con agitación. Al cabo de 5 horas de cultivo se añadieron 0,8 mg/ml de monopalmitato de sacarosa a una de las porciones del medio de cultivo. Durante el cultivo, el pH del medio se ajustó a 7,2 con amoníaco gaseoso.

Al cabo de 42 horas de cultivo, se acumuló ácido L-glutámico en el medio de cultivo con un rendimiento de 60% (en peso).

Al mismo tiempo, se añadieron 150 µg/l de d-biotina a la otra porción del medio de cultivo. El cultivo

1 se efectuó del mismo modo que anteriormente, pero al cabo de 5 horas de cultivo, se añadieron 3 mg/ml de monopalmitato de sacarosa al medio de cultivo en lugar de 0,8 mg/ml.

Al cabo de 31 horas de cultivo se obtuvo un
5 rendimiento de 66% de ácido L-glutámico.

Ejemplo 3

Se preparó un medio de cultivo acuoso que contenía 100 mg/ml de sacarosa de hidrolizado de almidón, 1,0 mg/ml de KH_2PO_4 , 1,0 mg/ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 mg/ml de
10 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 mg/ml de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 $\mu\text{g/l}$ de tiamina, HCl, 240 μg (como nitrógeno total) de hidrolizado de proteína de soja, 15 $\mu\text{g/l}$ de biotina y 4,5 mg/ml de urea, y se ajustó a pH 7,0 con NaOH.

Dos porciones de 20 ml del medio de cultivo
15 se colocaron en matraces agitados de 500 ml, se calentaron a 120°C durante 10 minutos, y se inoculó *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13370. Se efectuó el cultivo a 31,5°C, y se añadieron a uno de las dos porciones del medio de cultivo 0,8 mg/ml de monopalmitato de sacarosa, y 4,0 mg/ml de monopalmitato de sacarosa a otra porción del medio de cultivo,
20 en ambos casos al cabo de 5 horas de cultivo. Durante los cultivos, el pH de los medios se ajustó a 6,5-8,0 con 450 mg/ml de urea en disolución.

En el primer caso se obtuvo un rendimiento
25 de 46% de ácido L-glutámico al cabo de 42 horas de cultivo, mientras que en el último caso se obtuvo un rendimiento de 49% de ácido L-glutámico al cabo de 34 horas de cultivo.

Ejemplo 4

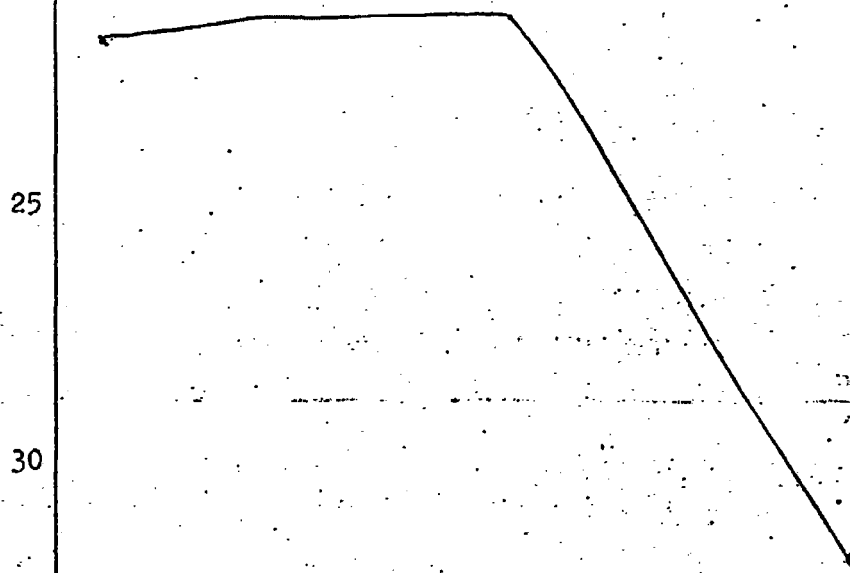
Se preparó un medio de cultivo acuoso que con
30 tenía 60 mg/ml de sacarosa de melazas de remolacha, 2 mg/ml

1 de KH_2PO_4 , 2 mg/ml de $NH_4H_2PO_4$, 1,0 mg/ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
 200 μ g/l de tiamina.HCl, y se ajustó a pH 7,0.

5 Dos porciones de 300 ml del medio de cultivo se colocaron en fermentadores de 1 litro, se calentaron a 120°C durante 10 minutos, y se inoculó *Brevibacterium lactofermentum* AT 3612 FERM-P 2308. (esta cepa es una mutante sensible al ácido N-palmitoil-L-glutámico (Solicitud de patente Japonesa publicada, no examinada, nº 64486/1975).

10 Se efectuó el cultivo en condiciones aerobias a 31,5°C. El pH del medio se llevó a un valor de 7,8 con amoníaco gaseoso, y se añadieron al medio melazas de remolacha (que contenían 500 mg de sacarosa/ml), para mantener la concentración de sacarosa del medio en 40 mg/ml.

15 A una de las dos porciones del medio de cultivo se le añadieron 0,5 mg/ml de monopalmitato de sacarosa, y a la otra porción 2,0 mg/ml del mismo, al cabo de 5 horas de cultivo. En el primer caso se obtuvo un rendimiento de 59% de ácido L-glutámico al cabo de 45 horas de cultivo, mientras que en el último caso se obtuvo un rendimiento de
 20 65% de ácido L-glutámico al cabo de 35 horas de cultivo.



29038

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10 1ª.- Un método para producir ácido L-glutámico por fermentación que comprende: (a) añadir sustancia que tiene la actividad de d-biotina en un contenido de más de 30 $\mu\text{g}/\text{l}$ a un medio de cultivo que contiene hidratos de carbono como fuente de carbono, y teniendo menos de 20 $\mu\text{g}/\text{l}$ de actividad de d-biotina la sustancia; siendo el peso de la sustancia igual al de la d-biotina que muestra la actividad que la sustancia, (b) cultivar un microorganismo productor de ácido L-glutámico del género Brevibacterium o Corynebacterium en el medio de cultivo preparado en la operación (a),
15 (c) añadir al medio de cultivo un agente tensioactivo o penicilina durante la etapa exponencial de desarrollo del microorganismo, y (d) recuperar ácido L-glutámico acumulado en el medio de cultivo.

25 2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que el hidrato de carbono es sacarosa de melazas de remolacha.

3ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que el microorganismo es un mutante del género Brevibacterium sensible al ácido N-palmitoil-L-glutámico.

30 4ª.- "UN METODO PARA PRODUCIR ACIDO L-GLUTA-


1 MICO POR FERMENTACION".

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

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

Madrid, 19 MAY 1978
P.A.

10 **Alberto de Elzaburu**
For Podes



10

15

20

25

30

29038 MLJ