

227865

227865

MEMORIA DESCRIPTIVA DE LA PATENTE DE INTRODUC  
CION QUE SOLICITA DON CARLOS ZULUETA DE HAZDO  
MICILIADO EN MADRID; CALLE CONDE DE PEÑALVER.  
NUMERO 68 POR UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTEN-  
CION DE ACIDOS ORGANICOS.-



227865

MEMORIA DESCRIPTIVA  
=====

De la Patente de introducción que solicita Don Carlos Zulueta de Haz, domiciliado en Madrid, calle Conde de Peñalver número 68 por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE ACIDOS ORGANICOS".

5 En el pasado, los ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, itacónico y Oxietilendicarboxílicos, habían sido producidos por la acción de cultivos de mohos por fermentación en un medio conteniendo fuentes fermentables de carbono, fuentes a  
10 similares de nitrógeno junto con varias sustancias inorgánicas nutrientes conocidas y elementos trazos. El primer mecanismo de producción de estos ácidos por fermentación con mohos resultaba con un rendimiento muy bajo considerablemente menor que el basado teóricamente sobre la fuente de carbón metabolizada por  
15 los mohos. Esta desventaja puede ser causada en parte por la formación de otros ácidos orgánicos, los cuales no sólo reducen el rendimiento de los ácidos deseados, sino que dificultan al mismo tiempo los procesos de recuperación y separación.

15 Un objeto de esta invención es suministrar un proceso donde se aumentan los rendimientos de los ácidos deseados y la producción de producto no deseado sea en su mayor parte inhibida. Otro objeto es suministrar un proceso donde las dificultades en recuperar tales ácidos encontradas por investigadores  
20 anteriores son reducidas o eliminadas y aún los ácidos pueden ser producidos más económicamente por el uso de fuentes de nutrición más impuras. El objeto de esta invención es conseguido por



227865

el uso de acetato de metilo o un alcohol monohídrico de bajo peso molecular que se añaden al medio de fermentación. El objeto de este alcohol es estimular un mayor rendimiento en los ácidos  
25 deseados. La exacta naturaleza del mecanismo es hasta ahora desconocida. Yo he aprendido sin embargo, que no depende del metabolismo de los alcoholes; esto no se puede tomar como una regla; de hecho, en unas pocas muestras el etanol es metabolizado  
30 ligeramente y por esta razón no es tan efectivo como otros alcoholes, sin embargo, produce un aumento en el rendimiento.

De acuerdo con esta invención el acetato de metilo, metanol y etanol son añadidos al medio de fermentación en cantidad entre 1 y 5% por volumen, preferentemente de 1 a 3%. Las  
35 fermentaciones son de todos modos llevadas en general de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo el mismo tipo general del medio nutriente es ahora empleado conteniendo las fuentes corrientes fermentables de carbón, medio nutriente, etc., con las excepciones que serán descritas más adelante. Los mismos organismos son empleados como ya son conocidos en el arte de producir los ácidos deseados. Las fermentaciones pueden ser llevadas  
40 ya por métodos superficiales o sumergidos.

El efecto de esta adición en producir mayores rendimientos de ácidos, no es general para toda clase de fermentaciones que producen ácidos. Sin embargo, yo he descubierto que no  
45 es posible predecir los efectos en la producción de ácidos en el crecimiento vegetativo de los mohos o en la estimulación o inhibición de productos de metabolismos no deseados, por ejemplo, ni el metanol, etanol o propanol aumentarán el rendimiento de ácido Kojico apreciablemente. El rendimiento de ácido glucónico es actualmente reducido por adición de alcoholes.  
50

Por este invento se ha descubierto durante los cursos



227865

de las investigaciones, que la relación entre el crecimiento ve-  
getativo de un organismo y la producción óptima de ácido, de a-  
cuerdo con el proceso, es contraria a la que normalmente debe es-  
55 perarse en general. El efecto de esta adición es disminuir el  
crecimiento del micelio cuando son comparados con una fermenta-  
ción control. En muy pocos casos aislados se ha notado una li-  
gera o temporal estimulación del crecimiento del micelio, pero  
esto ha desaparecido cuando la fermentación continua obteniendo  
60 un resultado neto de reducción en el desarrollo del microbio. El  
efecto fisiológico de estas adiciones parece ser el de un tóxico  
que reduce la vegetación y la tendencia a la esporulación. Si se  
emplea en cantidad excesiva a las cantidades señaladas, el efec-  
to es que reduce materialmente el crecimiento del organismo y la  
65 producción de ácidos. Sin embargo, dentro de los límites especi-  
ficados aun se obtiene una pequeña reducción en el crecimiento  
del micelio y los ácidos deseados son producidos con sorpresa  
con rendimientos mayores y la producción de sub-productos no de-  
seados es reducida.

70 Las ventajas de la invención no son limitadas a un cre-  
cimiento en rendimiento de los ácidos, sino que comprende otras  
valiosas características, por ejemplo, empleando la invención,  
la fermentación puede ser llevada con éxito sin necesidad de u-  
tilizar medios nutrientes puros o la eliminación de elementos  
75 trazas, tales como manganeso en el caso del ácido cítrico. Ade-  
más las fermentaciones no son tan sensibles en los valores del  
pH como en los métodos anteriores. De acuerdo con este proceso  
la fermentación puede ser llevada con pH inicial entre 1'5 y 3'5.  
Este último dato es de valor particular utilizando melazas con  
80 fuentes de carbón en la producción de ácido cítrico, en las que  
es difícil bajar el pH a un nivel de condiciones óptimas hasta  
ahora conocidas.



227865

El ácido cítrico puede ser producido de acuerdo con esta invención, empleando organismos conocidos que producen ácido cítrico, por ejemplo son los *Aspergillus niger*, *A. Wentii*, *A. Schiemanni*, *Penicillium Implicatum* y otros. Las fuentes de carbón pueden ser glucosa, sacarosa, melazas tales como melaza de remolacha y Blackstrap molasses, alcohóles polihídricos, almidón o almidones modificados, granos molidos y otros. En el caso del ácido itacónico, el organismo empleado puede ser variedades del *Aspergillus terreus* con medios nutrientes similares a los empleados en el caso del ácido cítrico. Acido oxietilen dicarboxílico es producido por tales organismos como el *Aspergillus fumigatus*. La fuente de carbón puede ser glucosa comercial u otros materiales hidrocarbonos útiles para producir este ácido particular. Los siguientes ejemplos son ilustraciones de mi invención:

Ejemplo núm. 1. - Este ejemplo ilustra el efecto del metanol, etanol, isopropanol, en la producción de ácido oxietilendicarboxílico preparado con sal cálcica. Porciones de 50 ml. de un medio de fermentación fueron preparadas en serie de frascos Erlenmeyer de 200 ml. El medio tiene los siguientes ingredientes añadidos hasta un litro:

	<u>Grams</u>
Glucose monohydrate.....	150'0
Beet molasses.....	20'0
Corn steep liquor.....	10'0
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	0'25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0'70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0'30
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	0'044

A cada cultivo se añadirá 1'5 gramos de carbonato cálcico. Justo antes de empezar la inoculación fueron añadidas cantidades variables de varios alcoholes, al medio estéril. La inoculación fué llevada a cabo con la adición de esporas no germinadas del *Aspergillus fumigatus*.



227865

110

Los frascos fueron incubados por doce días a 30°. Los resultados están resumidos en la siguiente tabla:

Alkanol Adjuncts, by volume	Calcium salt of ethylene oxide dicarboxylic acid perculture
	G r a m s
None	0'45
2% methanol	0'74
4% methanol	0'83
2% ethanol	0'65
3% ethanol	0'61
1% isopropanol	0'74

115

Ejemplo núm. 2.- Este ejemplo ilustra el efecto del metanol en la producción de ácido oxietilendicarboxílico en una serie de experimentos empleando varias fuentes de carbón. El organismo de fermentación era el *Aspergillus fumigatus*. Porciones de 50 ml. de un medio de fermentación fueron preparadas en una serie de frascos Erlenmeyer de 200 ml. El medio tiene los siguientes ingredientes hasta un litro:

Carbón source - as designated in table II

	<u>Grams</u>
Beet molasses .....	20'0
Corn steep liquor.....	15'0
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	0'250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0'300
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	0'088
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0'700

120

Los frascos fueron inoculados con *Aspergillus fumigatus*. Inmediatamente antes de la inoculación las adiciones fueron realizadas en la mitad de los frascos. Los frascos fueron incubados diez días a 30°. Los resultados son resumidos en la tabla número 2.



227865

Fermentable carbón source used	Methanol added	Dry wt. of micelium per culture	Dry wt. of calcium salt of ethylene oxide dicarboxylic acid per culture
	Volume Percent	Grams	Grams
Glucose monohydrate 140'0 g. per 1 .....	0	1'16	0'44
Sucrose, 135'0 g. per 1..	3	1'16	1'12
	0	1'18	0'39
Xylose, 130'0 g. per 1...	3	1'41	1'14
	0	0'58	0'12
Glycerine, 130'0 g. per 1	4	0'83	0'30
	0	1'13	0'10
Sorbitol, 70%, 185'0 g. per 1	3	1'47	0'39
	0	0'97	0'30
	3	1'38	0'89

125

Ejemplo núm. 3. - Este ejemplo ilustra el efecto del alcohol etílico en la producción de ácido itáconico por *Aspergillus terreus*.

Porciones de 50 ml. de un medio de fermentación fueron preparadas en series de frascos de 200 ml. El siguiente medio base fué empleado:

Glucose monohydrate.....	g...	110'0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	g...	0'100
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	g...	0'500
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	g...	1'50
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	g...	0'044
Argo comm steep liquor.....	g...	3'0

130

El medio de la fermentación tiene un pH inicial de 4'1. Los frascos fueron inoculados con *Aspergillus terreus*. Inmediatamente antes de la inoculación las adiciones fueron realizadas como se designa en la tabla que va a continuación. Los frascos fueron incubados durante siete días. Los resultados son resumidos en la tabla núm. 3

Ethanol volume percent	N/10 Itaconic Acid per culture	Dry weigh of mycelium	Glucose consumed per culture	Yield of itaconic acid based on glucose consumed	Theory yield based on glucose consumed (1)
	ml.	Grams	Grams	Weight Percent	Percent
0.....	2	1'42	4'8	0'2	2'8
2.....	194	1'05	4'95	25'4	35'2
3.....	319	0'78	4'8	43'2	59'7
4.....	305	0'64	4'3	46'1	64'1

(1) 1 mole glucose ----- 1 mole itaconic acid.



227865

135

Ejemplo núm. 4.- Este ejemplo ilustra efectos del metanol e Isopropanol en la producción de ácido itacónico. Porciones de 50 ml. de medio de fermentación fueron preparadas según los siguientes ejemplos. El medio consistía en los siguientes componentes diluidos hasta un litro:

Sucrose.....	g....	121'0
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	g....	0'250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	g....	0'100
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	g....	1'00
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O.....	g....	1'00
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	g....	0'044
Corn steep liquor....	g....	2'0

140

El pH inicial del medio era de 4. Los frascos fueron inoculados con esporas no germinadas de *Aspergillus terreus*. Inmediatamente antes de la inoculación las adiciones fueron realizadas como se designa en la siguiente tabla.

145

Los frascos fueron incubados durante nueve días. Los resultados son resumidos en la tabla número 4.

Adjunct, by volume	N/10	Dry weight of mycelium
	itaconic acid perculture	
	ML	Grams
None .....	8	1'25
2% Methanol.....	340	0'77
3% Methanol.....	204	0'64
1'5% Isopropanol.	264	0'99

150

Ejemplo núm. 5.- Este ejemplo ilustra el efecto del metanol en la producción de ácido itacónico en cultivo sumergido. Porciones de 100 ml. de un medio de fermentación fueron preparadas en frascos de 300 ml. El medio contenía los siguientes componentes disueltos hasta un litro:

Glucose monohydrate.....	g ....	165'0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	g ....	0'100
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	g ....	0'500
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	g ....	1'50
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	g ....	0'044
Argo corn steep liquor.....	ml....	3'0

El pH inicial del medio era 4'1. Los frascos fueron inoculados con esporas no germinadas de *Aspergillus terreus*. Inmediatamente antes de la inoculación las adiciones fueron



227865

155 realizadas a una mitad de los cultivos. Una fermentación sumergida fue llevada a cabo durante nueve días. Los resultados están esquematizados en la tabla núm. 5.

Methanol, volume percent	N/10 itaconic acid perculture	Dry weight of mycelium
0 .....	138 ml.	2'30 grams
2 .....	242 ml.	2'15 grams

160 Ejemplo núm. 6.- Este ejemplo ilustra el efecto del metanol como adición en la producción de ácido cítrico con sacarosa con varios *Aspergillus* en cultivo de superficie. Porciones de 50 ml. de un medio de fermentación fueron preparadas como en los ejemplos 1 a 4. El medio contenía los siguientes componentes diluidos hasta un litro:

Sucrose .....	g ....	164'0
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O .....	g ....	0'50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	g ....	0'15
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	g ....	1'50
ZnSO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O .....	g ....	0'044
Corn steep liquor.....	ml.....	6'0

165 El pH inicial del medio era 4'2. Los frascos fueron inoculados con varios *Aspergillus* inmediatamente después de efectuar las adiciones a una mitad de los cultivos y fueron incubados a 30° C., ocho días. Los resultados son resumidos en la tabla núm. 6.

Mold used	Methanol	N/10 citric acid per culture	Yield of citric acid based on sucrose consumed
	Volume percent	Ml.	Weight percent
A. niger.....	0	184	19'3
	3	696	58'9
A. wentii.....	0	204	15'9
	3	574	44'8
A. schiemanni	0	232	18'1
	3	616	48'1

170 Ejemplo núm. 7.- Maiz finalmente dividido (140 gramos) fué empleado en un medio de sales nutrientes y cinco gramos de carbonato cálcico. Porciones de 100 ml. fueron distribuidas en Erlenmeyer de 300 ml. Después fueron esterilizadas con vapor



227865

175

los frascos e inoculados con una suspensión de 3 ml. de esporas germinadas. A una mitad de los cultivos se le añadieron 4% de alcohol metílico. Los frascos fueron incubados durante nueve días en un agitador Ross-Kirshaw. Los resultados están sintetizados en la tabla núm. 7.

Methanol, volume percent	N/10 citric acid per culture	Oxalic acid present	Gluconic acid present
0 .....	MI. 181	None	Trace
4 .....	628	None	None

180

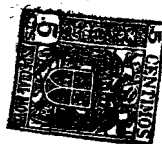
Ejemplo núm. 8.— Once gramos de almidón de maiz fueron colocados en frascos de Erlenmeyer de 300 ml. A cada frasco se le añadieron 90 ml. de un medio de cultivo nutriente que tenía la siguiente composición:

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	g....	0'03
KCl .....	g....	0'03
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	g....	0'075
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (0'5 N) .....	ml....	3'0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0'5 N) .....	ml....	2'0
Corn steep liquor .....	ml....	0'7
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	g....	0'004
Glucose monohydrate .....	g....	0'1

185

Los frascos fueron calentados en baños de agua con agitación hasta que el almidón había gelatinizado. Los frascos fueron entonces esterilizados en un auto-clave a 20 libras de vapor de presión dentro de 30 minutos. Después de la esterilización el medio tenía un pH inicial de 3 y 0'21% de glucosa. Para determinar la glucosa en potencia del medio, una muestra fué hidrolizada con ácido fuertemente y el análisis dió 10'84% de glucosa. Cada frasco fué mantenido a la temperatura de la habitación e inoculado con una pequeña porción de esporas germinadas de *Aspergillus niger*. Suficiente agua estéril se añadió hasta un volumen de 100 ml. por cultivo, a la mitad de los cultivos. A la otra mitad de los cultivos se le añadieron 3% en volumen de metanol basado en 100 ml. volúmenes. Estos cultivos fueron

190



227865

diluidos hasta 100 ml. en agua esterilizada.

195

Los frascos fueron incubados durante ocho días a 30° en un agitador Ross-Kirshaw. Los resultados están sintetizados en la tabla núm. 8.

A. niger strain	Methanol	N/10 citric acid per culture	Glucose remaining per culture	
			Before hydrolysis	After a strong acid hydrolysis
	Volume Percent	Ml.	Grams	Grams
N R R L 330..	{ 0	36	3'60	3'60
	{ 3	308	3'03	3'11
N R R L 337..	{ 0	58	4'07	4'35
	{ 3	408	2'61	2'83
N R R L 604..	{ 0	41	3'36	3'36
	{ 3	491	2'36	2'61

200

Ejemplo núm. 9.- Suficiente cantidad de ácido clorhídrico se añadió a 200 gr. de melazas de remolacha para obtener un pH de 7'2. La melaza había sido tratada con ferrocianuro potásico para eliminar elementos trazas de hierro y manganeso y tenía una concentración inicial en sacarosa del 54%. La melaza acidificada fué llevada con agua hasta un litro y porciones de 50 ml. fueron colocadas en Erlenmeyer de 200 ml. esterilizadas con vapor. Entonces se enfriaron y se añadieron diferentes cantidades de metanol, después de lo cual los frascos fueron inocu-  
205 lados con esporas no germinadas de *Aspergillus niger*. Los frascos fueron incubados durante ocho días a 30° C. Los resultados están resumidos en la tabla núm. 9.

Methanol, volume percent	N/10 citric acid per culture	Dry weight of micellium per culture
	Ml	Grams
0'0 .....	212	1'12
1'0 .....	310	1'34
2'0 .....	408	1'28
3'0 .....	506	0'97



227865

210

Ejemplo núm. 10.- El siguiente medio fué empleado diluyendo hasta un litro:

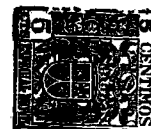
Glucose .....	g.....	126'0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	g.....	1'75
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	g.....	0'232
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	g.....	0'400
Zn <sup>4</sup> SO <sub>2</sub> - 7H <sub>2</sub> O .....	g.....	0'044
Ferric tartrate.....	g.....	0'005
Corn steep liquor.....	ml.....	0'5

215

Porciones de 50 ml. de este medio fueron colocadas en Erlenmeyer de 200 ml. las adiciones como se designa en la tabla núm. 10 fueron realizadas en el medio base exactamente antes de la inoculación con esporas no germinadas de *Aspergillus niger*. Todos los cultivos fueron incubados a 30° durante seis días. Los resultados están sintetizados en la tabla núm. 10.

Adjuncts to the base medium, by volume	N/10 citric acid per culture	Dry weight of mycelium per culture	Yield of anhydrous citric acid based on glucose consumed
	Ml.	Grams	Weight percent
None.....	54	1'25	7'4
Isopropanol			
1%.....	62	1'23	8'2
2%.....	118	0'99	20'0
3%.....	10	0'48	- -
Methyl acetate			
1%.....	64	1'12	8'3
2%.....	132	1'14	15'4
3%.....	182	1'02	23'7
Methanol			
1%.....	106	1'17	11'5
2%.....	374	0'99	40'0
3%.....	630	0'84	66'1
Ethanol			
1%.....	90	1'20	9'6
2%.....	250	1'16	31'1
3%.....	333	1'03	52'9
N-propanol			
0'5%.....	97	1'24	10'0
1'0%.....	284	0'97	45'0
2'0%.....	206	0'83	41'0

Ejemplo núm. 11.- Dos mitades diferentes se prepararon con los siguientes ingredientes:



	<u>Grams</u>
Glucose.....	11'32
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O.....	0'020
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0'020
KCl .....	0'010
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	0'005
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0'004
Ferric tartrate.....	0'001
MnSO <sub>4</sub> -4H <sub>2</sub> O.....	0'005
Corn steep liquor.....	0'020
NaNO <sub>3</sub> .....	0'162
NH <sub>4</sub> Cl.....	0'013
Distilled water to make 100 ml.....	

220

A una mitad se le añadieron 3 ml. de metanol ambas partes fueron inoculadas con dos ml. de una suspensión de esporas germinadas de *Aspergillus niger*. El Medio fué fermentado en un agitador Ross-Kyrshaw a 30° C. por diez días. Los resultados están resumidos en la tabla núm. 11.

Methanol volume percent	N/10 citric acid per culture	Anhydrous citric acid per culture	Glucose consumed per culture	Yield of anhydrous citric acid based on	
				Glucose consumed	Glucose supplied
	ML	Grams	Grams	Weight percent	Weight percent
0'0...	97	0'62	6'30	9'8	5'5
3'0...	1'144	7'33	10'15	72'1	63'7

225

Ejemplo núm. 12.- Este ejemplo ilustra el efecto del metanol a distintas concentraciones sobre la producción de ácido cítrico a partir de glucosa comercial (glucosa monohidratada) por *Aspergillus niger*. El pH inicial del medio en este ejemplo fué obtenido añadiendo ácido clorhídrico de 0'482 N. El siguiente medio fué preparado diluyendo hasta un litro.

230

Glucose monohydrate.....	g....	160'0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	g....	1'750
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	g....	0'232
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	g....	0'400
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	g....	0'250
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	g....	0'044
Ferric tartrate.....	g....	0'005
Corn steep liquor.....	ml....	0'5



227065

235

Seis cultivos cada unos de 50 ml. de este medio fueron colocados en Erlenmeyer de 200 ml. Acido clorhídrico se añadió en cinco cantidades suficientes para obtener una concentración de ion hidrógeno indicado en la tabla 12 (a). Después de la fermentación se obtuvo el siguiente resultado:

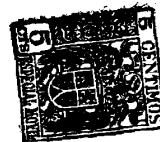
Initial pH value	CC. HCl aded	N/10 citric acid per culture	Dry weight of mycelium per culture	Yield based on glucose consumed
		ML.	Grams	Weight percent
4,00.....	0	42	1,28	6,7
2,51.....	10	34	1,23	---
2,10.....	20	38	1,21	---
1,90.....	30	52	1,34	---
1,75.....	40	58	1,35	8,0
1,65.....	50	64	1,23	9,0

El procedimiento inicial de este ejemplo fué repetido con la adición de 1% de metanol por volumen al medio antes de empezar la inoculación los resultados están sintetizados en la tabla 12. (b).

Initial pH, value	CC. HCl aded	N/10 citric acid per culture	Dry weight of mycelium per culture	Yield based on glucose consumed
		ML.	Grams	Weight percent
4'00.....	0	258	1'18	31'2
2'51.....	10	258	1'28	30'6
2'10.....	20	350	1'24	40'0
1'90.....	30	392	1'24	44'1
1'75.....	40	424	1'27	45'1
1'65.....	50	532	1'14	63'2

240

El procedimiento inicial de este ejemplo fué repetido excepto que se añadió el 2% de volumen de metanol al medio justamente antes de iniciar la inoculación. Los resultados están sintetizados en la tabla núm. 12 (c).



227365

Initial pH, value	c.c.HCl added	N/10 citric acid per culture	Dry weight of micelium per culture	Yield based on glucose consumed
		Ml.	Grams	Weight percent
4,00.....	0	476	1'12	47'5
2'51.....	10	510	1'13	54'1
2'10.....	20	542	1'08	57'5
1'90.....	30	508	1'09	56'2
1'75.....	40	496	1'02	55'6
1'65.....	50	494	0'96	56'8

245 El procedimiento inicial de este ejemplo fué repetido exepcto que se añadió un 3% en volumen del metanol justamente antes de empezar la inoculación. Los resultados están sintetizados en la tabla 12 (d).

Initial pH, value	c.c.HCl added	N/10 citric acid per culture	Dry weight of mycelium per culture	Yield based on glucose consumed
		Ml.	Grams	Weight percent
4'00.....	0	518	1'03	56'3
2'51.....	10	454	0'87	59'9
2'10.....	20	444	0'87	60'0
1'90.....	30	434	0'80	59'8
1'75.....	40	418	0'72	60'2
1'65.....	50	312	0'62	54'8

250 Como previamente se menciona el invento hace posible el uso de materias primas no puras en el medio de fermentación obteniendo una satisfactoria producción de ácidos. Los altos rendimientos en los productos deseados caracterizan el invento y no disminuyen por la presencia de elementos trazas que se pensaba que eran molestos. Esto es particularmente verdad en la producción de ácido cítrico, utilizando melazas crudas. Las melazas varían grandemente en el contenido de elementos trazas: por ejemplo, el contenido en manganeso puede variar de cinco a cien

255



27865

partes por millón dependiendo de su origen y tratamiento previo. Este elemento es bien conocido por interferir el proceso de formación de ácido cítrico en la producción de ácido cítrico por fermentación. En este proceso se evita la necesidad de purificación y eliminación de manganesos a partir de las melazas crudas.

El ejemplo once, ilustra la tolerancia para cantidades de manganeso relativamente altas y los siguientes ejemplos ilustran la invención empleando cantidades controladas de manganeso y también la cantidad relativamente grande de estos elementos que pueden tolerar sin disminución en la producción de ácido cítrico.

El ejemplo trece, ilustra la producción de ácido cítrico a partir de un medio de sacarosa con alta concentración de manganeso bajo la forma de sulfato de manganeso empleando 3% de metanol como adición. El efecto de todas estas cinco adiciones sobre los límites de uno a cinco volúmenes por cien es similar a los resultados de estos ejemplos. El ejemplo catorce, ilustra la producción de ácido cítrico a partir de melazas de remolacha. Las melazas crudas fueron tratadas con ferrocianuro potásico para eliminar toda traza de elementos de manganeso y hierro. El sulfato de manganeso fué añadido al medio en las cantidades designadas.

Ejemplo núm. 13.- Porciones de 50 ml. de un medio de fermentación fueron preparadas. El medio contenía los siguientes componentes diluidos hasta un litro:

Sucrose.....	g....	160'0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	g....	1'50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	g....	0'150
Corn steep liquor....	ml....	3'0
ZNSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	g....	0'044

El pH inicial del medio era 4'1. Cada frasco fué esterilizado y entonces inoculado con esporas de *Aspergillus niger*



285 e incubados a 30° por ocho días. Los resultados están sintetizados en la tabla núm. 13.

Manganese per liter	N/10 citric acid per culture	Dry weight of mycelium per culture	Yield of anhydrous citric based on sucrose consumed
Mg.	Ml.	Grams	Weight percent
0	690	0'96	60'3
55	748	1'05	64'5
110	704	1'20	62'7
220	706	1'22	62'9
330	712	1'13	63'4

290 Ejemplo núm. 14.- Doscientos gramos de melaza de remolacha fueron ajustados a un pH6 con ácido clorhídrico y entonces tratados con 0'5 gramos de ferrocianuro potásico. El precipitado que se obtuvo fué eliminado y porciones de 50 ml. de estas melazas fueron colocadas en Erlenmeyer de 300 ml. Los frascos fueron esterilizados e inoculados con esporas de *Aspergillus niger*.

295 Adiciones de metanol y manganeso (como sulfato manganeso), fueron hechas según la tabla núm 14. Los frascos fueron incubados a 30° C., por seis días y los resultados están resumidos en la tabla núm. 14.

Manganese per liter	Methanol	N/10 citric acid per culture	Spore crop	Gluconic acid present
Mg.	Volume percent	Ml.		
0	0	402	None	Fair
0	0	545	None	Trace
10	0	209	Heavy	Good
10	2	455	None	Trace

300 En este ejemplo la adición de manganeso en ausencia de metanol causó una pesada esporulación y pronunciada disminución en la producción de ácidos. Sin embargo, la adición de



227865

metanol aumenta la producción de ácido cítrico y reduce la cantidad de ácido glucónico formado.

305

Los ejemplos 15 y 16, ilustran la invención empleando melazas Blackstrape o de caña como fuente de carbón. El procedimiento 15 ilustra este ejemplo usando métodos sumergidos mientras que el ejemplo 16 ilustra un método de superficie.

310

Ejemplo núm. 15.- Este ejemplo ilustra el efecto del metanol y cloruro amónico en la producción de ácido cítrico a partir de melazas Blackstrape o de caña por *Aspergillus niger* en método sumergido. El medio consistió en 288 gramos de melazas blackstrape o de caña conteniendo 150 gramos de azúcar invertido y 0'044 gramos de sulfato de cinc por litro. Las melazas tenían un pH inicial de 5'4. Cada cultivo consistía en eién ml. de este medio inoculados con dos ml., de una suspensión de esporas germinadas en erlenmeyer de 200 ml. Los frascos fueron incubados a 28° en un agitador Gump a 200 revoluciones por minuto durante diez días. El metanol fué añadido exactamente antes de la inoculación.

315

320

En experimentos comparativos sólo trazas de ácido cítrico fueron formadas sin la adición de alcoholes.

Methanol added percent	NH <sub>4</sub> Cl per L	N/10 acid per culture	Dry weight of mycelium	Weight yield of acid on sugar consumed	Ca oxalate precipitate with Ca Cl <sub>2</sub>
2'5	g.	Ml.	g.	Percent	
3'0	0	924	2'4	57	medium
2'5	67	1196	2'1	69	Do.
3'0	67	940	2'5	52	trace
		1212	2'3	62	none

325

Ejemplo núm. 16.- Este ejemplo ilustra el efecto del metanol en la producción de ácido cítrico a partir de melazas de caña o blackstrape por cultivo en superficie de *aspergillus niger*. Los cultivos consistieron en una adición de 50 ml. de medio nutriente en erlenmeyer de 200 ml. inoculadas con esporas secas no germinadas.



227865

330

El material nutriente sólo tenía 288 gramos de melazas de caña o blackstrape (150 gramos de azúcar invertido) por litro. La germinación fué llevada durante ocho días con los resultados que se señalan continuación:

	Percent methanol added at start				
	0	1'5	2'0	2'5	3'0
N/10 acid per culture, ml.	176	460	620	706	698
Dry weight of mycelium per culture, g.....	1'10	1'06	1'14	1'09	1'11
Weight yield of citric acid based on sugar consumed, per cent.....	28	59	64	70	72
Espores on mycelium.....	Heavy	Trace	Trace	None	None

REIVINDICACIONES

335

1ª.- Procedimiento para la obtención de ácidos orgánicos caracterizado porque el aumento del rendimiento de ácidos orgánicos del grupo del ácido cítrico, itacónico y ácido oxietilendicarboxílico se obtiene por fermentación de fuentes de carbón fermentables llevando la fermentación en presencia de uno a cinco por ciento en volumen de un grupo de sustancias de bajo peso molecular de alcoholes monohidricos y de acetato de metilo en condiciones sumergidas y aireadas y en cultivo superficial.

340

2ª.- Procedimiento para la obtención de ácidos orgánicos caracterizado por el cultivo de un moho conocido, que produce el ácido en un medio que contiene fuente de carbón fermentables y adición de uno a cinco por ciento en volumen de un grupo de adiciones que consisten en metanol, etanol, propanol normal, isopropanol y acetato de metilo para la producción de un ácido orgánico del grupo de la clase de ácido cítrico, itacónico y ácido oxietilendicarboxílico.

345

350

3ª.- Procedimiento para la obtención de ácidos orgánicos caracterizado por el cultivo del moho que produce ácido cítrico, se obtiene en un medio que contiene fuente de carbón con adición de uno a cinco por ciento en volumen del grupo de sustan



27865

cias que consiste en metanol, etanol, propanol normal, isopropanol y acetato de metilo.

355 4<sup>a</sup>.- Procedimiento para la obtención de ácidos orgánicos, caracterizado porque la fermentación es llevada entre los límites de 1'5 a 8'5 de pH y en el que la fuente de carbón fermentable puede ser glucosa, sacarosa, melaza de caña o blackstrap, almidón y maiz molido, llevado bajo condiciones sumergidas y aireadas y por cultivo en superficie con adición metanol u otro alcohol .

360 5<sup>a</sup>.- Procedimiento para la obtención de ácidos orgánicos caracterizado porque el moho es tomado del grupo de aspergillus niger, aspergillus wetii, aspergillus schieman y penicillium im- placatum.

365 6<sup>a</sup>.- Método para la producción de ácido itacónico que comprende el cultivo de aspergillus terreus e un medio que contiene fuente de carbón fermentable que se añade de 1 a 5 volúmenes por ciento del grupo de metanol, etanol, propanol normal, isopropanol y acetato de metilo.

370 7<sup>a</sup>.- Método para la producción de ácido oxietilendicarboxílico el cual comprende el cultivo con aspergillus fumigatus e un medio que contiene fuente de carbón fermentable añadiendo de 1 a 5 volúmenes por ciento de metanol, etanol, propanol normal, isopropanol y acetato de metilo.

375 8<sup>a</sup>.- Método para la producción de ácido cítrico por fermentación con mohos, los cuales comprenden mohos que producen ácido cítrico en un medio que contiene una fuente de carbón fermentable con apreciable cantidad de manganeso, como por ejemplo de cinco a cien partes por millón de manganeso y añadiendo adiciones de 1 a 5 volúmenes por ciento de un grupo de sustancias de 380 bajo peso molecular de alcoholes monohídricos, metanol, etanol, etc. , y acetato de metilo



227865

385 Procedimiento para la obtención de ácidos orgánicos,  
tal y como se describe en el cuerpo de esta Memoria, que consta  
de veinte páginas mecanografiadas por una sola cara y con un to-  
tal de trescientas ochenta y cinco líneas.

Madrid a veintidos de junio de mil novecientos cincuen-  
ta y seis.