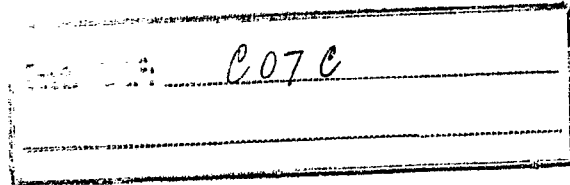
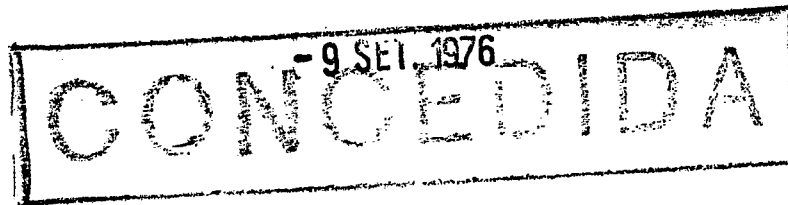


S/Ref.: TM-54309

N/Ref.: O.G. 30.023.-MY.

PATENTE DE INVENCION

437347



MEMORIA DESCRIPTIVA

Sobre:

"UN METODO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO D-TARTARICO"

Solicitante: La Compañía japonesa: TORAY INDUSTRIES INC., con
domicilio en: 2 Nihonbashi-Muromachi 2-chome
Chuo-ku, TOKYO (103 Japón).--

Inventores: Eiji Sato y
Akira Yanai, ambos japoneses.

La invención se refiere a la producción de ácido d-tartárico por conversión microbiológica del ácido cis-epoxisuccínico. La actividad hidrolizante de los microorganismos de los géneros "Achromobacter" y "Alcaligenes", y las enzimas producidas por los mismos, provoca la conversión por una hidrólisis selectiva tal que se obtiene fácilmente el producto en forma pura y con buen rendimiento.

El ácido cis-epoxisuccínico puede ser preparado de manera fácil y poco costosa a partir de anhídrido maleico por disolución en agua y reacción del ácido maleico resultante con peróxido de hidrógeno en presencia de un catalizador epoxidante tal como el tungstato sódico.

De acuerdo con la invención se hidroliza el ácido cis-epoxisuccínico en presencia de un microorganismo del género "Achromobacter" o "Alcaligenes". Los ejemplos de tales microorganismos incluyen las siguientes cepas bacterianas: *Achromobacter tartarogenes* n. sp. TORAY 1246, FERM-P 2507; *Achromobacter epoxylyticus* n. sp. TORAY 1270, FERM-P 2508; *Achromobacter acinus* n. sp. TORAY 1366, FERM-P 2509; *Achromobacter sericatus* n. sp. TORAY 1190, FERM-P 2510; *Alcaligenes epoxylyticus* n. sp. TORAY 1128, FERM-P 2511; *Alcaligenes margaritae* n. sp. TORAY 1110, FERM-P 2512. ("FERM-P" es el nombre de depósito oficial de cada organismo en el Instituto de Investigaciones de Fermentación del Japón).

Resulta apropiado tanto un medio de cultivo sintético como natural para cultivar tales microorganismos con tal que contenga los nutrientes esenciales para el crecimiento del microorganismo empleado. Debería añadirse una pequeña cantidad de ácido cis-epoxisuccínico, una sal del mismo, ácido d-tartárico o una sal del mismo a título de inductor para la enzima antes del cultivo o en el curso del mismo.

- Como fuente de carbono para el medio de cultivo, se puede utilizar como ingredientes, por ejemplo, azúcares tal como glucosa o sacarosa, alcoholes, ácidos orgánicos, licor de maíz macerado o melazas, ácido cis-epoxisuccínico, ácido d-tartárico o sus sales. Como fuente de nitrógeno, puede utilizarse, por ejemplo, amoníaco, sales amónicas, tal como sulfato amónico o cloruro amónico, una amida, nitrato, urea, aminoácido o proteínas tal como peptona, soja en polvo o extracto de carne. Puede añadirse fosfatos, sulfatos, sales de magnesio, potasio, cinc, hierro, manganeso y/u otros metales, extractos de levadura, vitaminas y/o nucleótidos entre otros ingredientes. El cultivo es preparado preferentemente de forma aeróbica entre 20 y 35°C, más preferiblemente entre 26 y 30°C, estando comprendido el pH preferiblemente entre 6 y 8. La enzima denominada "epoxidasa de d-tartrato" se acumula en las células al avanzar el proceso.

- La hidrólisis del ácido cis-epoxisuccínico puede ser efectuada con un cultivo de crecimiento, un caldo de cultivo, células vivas, un extracto celular, células tratadas tales como células secadas con acetona, células secadas con tolueno, células liofilizadas, o enzima denominada "epoxidasa de d-tartrato". La enzima puede ser usada en el estado de una "enzima insolubilizada" tal como enzima absorbida con celulosa DEAE, TEAE, o GE o bien enzima absorbida con DEAE-"Sephadex".

- La mezcla de reacción comprende preferentemente una solución acuosa de ácido cis-epoxisuccínico que puede añadirse a la mezcla de reacción como el ácido libre o como una sal. Se puede utilizar cualquier sal pero, desde el punto de vista económico, se prefiere una sal de un metal alcalino o un metal alcalino-térreo tal como el sodio, potasio, calcio o amonio. No existe limitación sobre la gama de concentración del ácido cis-

epoxisuccínico. Usualmente, se introduce entre el 10 y el 25% (en peso) de ácido (o sal) cis-epoxisuccínico en la mezcla de reacción al comienzo de la reacción.

5. El pH de la mezcla de reacción es mantenido preferentemente entre 6,5 y 9,0, más preferiblemente entre 7,0 y 8,0. Para ajustar el pH de la mezcla de reacción, puede emplearse un hidróxido de metal alcalino. La reacción puede ser conducida a cualquier temperatura a la que la enzima sea suficientemente estable, por ejemplo entre 20 y 50° C. La temperatura puede ser de 10. 50° C durante 2 a 3 horas de reacción, o de 40° C para una reacción mayor de 20 horas en la que el ácido cis-epoxisuccínico se convierta prácticamente de manera estequiométrica en ácido d-tartárico.

15. La mezcla de reacción o el filtrado resultante de su filtración, puede ser pasada a través de una columna llena de una resina de intercambio aniónico para absorber el ácido d-tartárico. Después de lavar la columna, el ácido d-tartárico absorbido puede ser eluido con un ácido tal como ácido fórmico. El ácido d-tartárico puede ser obtenido a partir del eluado resultante por evaporación y cristalización.

20. La recuperación del ácido d-tartárico puede ser efectuada alternativamente por la adición de una sal de calcio a la mezcla de reacción. Se prefiere el sulfato cálcico, cloruro cálcico o carbonato cálcico. Después de añadir uno de estos productos a la mezcla de reacción, el ácido d-tartárico es recuperado a partir de la mezcla de reacción como d-tartrato cálcico por 25. filtración (usualmente con $4H_2O$). La sal puede ser convertida en el ácido libre por métodos convencionales.

30. Los seis microorganismos mencionados más arriba presentan las características indicadas en las Tablas 1 y 2. Para estas investigaciones taxonómicas, se recurre al "Manual of Determina-

tive Bacteriology" de Bergey, 7a edición (1957) (al que se hará referencia en lo que sigue como "el Manual"). Las cuatro cepas de microorganismos indicadas en la Tabla 1 son clasificadas como nuevas especies del género "Achromobacter". Todas ellas son cocos

5. Gram-negativos o varillas cortas, aeróbicos, inmóviles y acromogénicos. No se observó formación de gas con los azúcares. Los microorganismos que tienen las mencionadas características pertenecen también al género "Neisseria".

No obstante, de acuerdo con el Manual, todos los microorganismos que pertenecen al género "Neisseria" son parásitos animales y tienen una temperatura de crecimiento óptima de 37°C. Sin embargo, los microorganismos que pueden ser usados de acuerdo con la invención fueron aislados originalmente del suelo y no pueden crecer a 37°C. Por consiguiente, no consideramos apropiado clasificarlos como "Neisseria".

10.

15.

Ha habido muchas opiniones sobre los microorganismos que son Gram-negativos, acromogénicos e inmóviles. Por ejemplo, Prevost propuso establecer un nuevo género de "Acinetobacter" para incluir estos microorganismos. ("Traité de Systématique Bactérienne", 1961, 2, 156 a 164). Los microorganismos que pueden ser usados de acuerdo con la invención tienen las características del "Acinetobacter" de Prevost. No obstante, para evitar confusiones, hemos adoptado el sistema de clasificación del Manual en el que los "Acinetobacter" de Prevost están clasificados como "Achromobacter". Entre las especies de Achromobacter del

20. Manual, tres aparecen como inmóviles y desprovistas de licuefacción de gelatina. Entre estas tres, la "Achromobacter eurydice" no tiene acción sobre la leche de tornasol o sobre los azúcares con excepción de la glucosa. El "Achromobacter delmarvae" no produce sulfuro de hidrógeno y provoca el ennegrecimiento de la leche. El "Achromobacter parvulus" forma colonias fuertemente pun-

25.

30.

tiformes y forma amoniaco. Los microorganismos que pueden ser usados de acuerdo con la invención no son idénticos a los "Achromobacter" conocidos en estos aspectos. Por consiguiente, hemos llegado a la conclusión de que estos microorganismos son nuevas especies de "Achromobacter".

5.

Dos cepas de microorganismos indicados en la Tabla 2 se distinguen del "Achromobacter" por el hecho de que muestran una reacción alcalina sobre la leche de tornasol y no producen ácido alguno a partir de azúcares. Basándonos en estas consideraciones, hemos clasificado estos microorganismos como "Alcaligenes".

10.

Dois especies conocidas de "Alcaligenes", "Alcaligenes viscolactis" y "Alcaligenes metal-caligenes" tienen algunas similitudes con los microorganismos que pueden ser usados de acuerdo con la invención. No obstante, la primera está caracterizada por su tendencia a volver la leche muy viscosa, y la última es un habitante del tracto intestinal y tiene una temperatura óptima de crecimiento de 22°C. Por consiguiente, hemos llegado a la conclusión de que los microorganismos que pueden ser usados de acuerdo con la invención son nuevas especies de "Alcaligenes".

15.

20.

Además de los microorganismos descritos más arriba, es posible utilizar otras especies de "Achromobacter" o "Alcaligenes" que produzcan la enzima denominada epoxidasa de d-tartrato. La invención no se limita al uso de los microorganismos del tipo salvaje. Se desea y se pretende incluir el uso de los mutantes producidos a partir de los microorganismos descritos, tal como por ejemplo, mediante la irradiación ultravioleta, exposición fagedénica y tratamiento con nitrosoguanidina.

25.

Tabla 1

Nombre de la especie Nº FERM-P	Achromobacter tartarogenes nov. sp. TORAY 1245 FERM-P 2507	Achromobacter epoxylyticus nov. sp. TORAY 1270 FERM-P 2508	Achromobacter acinus nov. sp. TORAY 1366 FERM-P 2509	Achromobacter seri- catus nov. sp. TORAY 1190 FERM-P 2510
Propiedades morfológicas	0,8-1,2 μ x 0,8-1,8 μ cocoide a varillas cortas. Células acompañadas por material limoso. Se presentan individualmente, inmóviles, asporogénicos, Gram negativos.	Igual	Igual	Igual
Colonias de agar nutritivo	Circular, entera, protuberante a convexa, lisa, viscosa, marrón, blanquecino, opaco.	Circular, entera, convexa, líquida, blanca tirando a marrón, translúcido,	Circular, entera, protuberante a convexa, lisa, viscosa, marrón blanquecino, opaco.	Circular, entera, lisa, convexa, marrón blanquecino, opaco.
Agar nutritivo Slant	Filliforme, crecimiento moderado, marrón blanquecino, sin cromogénesis.	Igual	Igual	Igual
Caldo nutritivo	Moderadamente turbio, sedimento viscoso, sin película.	Moderadamente turbio, sedimento viscoso, película blanquecina delgada.	Moderadamente turbio, sedimento viscoso, sin película.	Moderadamente turbio, sedimento viscoso, película delgada.
Agar y cisepoxisuccinato Slant	Filliforme, blanco, translúcido, crecimiento moderado, opalescente. Sin cromogénesis.	Igual	Igual	Igual
Agar y patata Slant	Filliforme, blanco ligeramente marrón, opaco, crecimiento abundante, sin cromogénesis.	Igual (color más blanquecino que otros)	Igual	Igual

Tabla 1 (continuación)

Cultivo en un medio de gelatina	Sin licuefacción	Igual	Igual	Igual
Leche BCP	Se vuelve azul pálido en 2-3 días. Vuelve a neutro en una semana. Al cabo de 15 días la leche se coagula y se vuelve amarilla. Sin peptonización.	-	-	-
Propiedades fisiológicas				
1. Reducción de nitrato	-	-	-	-
2. Desnitricación	-	-	-	-
3. Prueba del rojo de metilo	-	-	-	-
4. Prueba de Voges Proskauer	-	-	-	-
5. Indol	-	-	-	-
6. H ₂ S (medio cisteína)	-	-	-	-
7. Hidrólisis del almidón	-	-	-	-
8. Utilización de citrato	-	-	-	-
9. Medio de Christensen	-	-	-	-
10. Ureasa	-	-	-	-
11. Oxidasa	-	-	-	-
12. Catalasa	-	-	-	-
13. Gas de azúcar	-	-	-	-
13. Acido de azúcar	-	-	-	-
Relaciones de pH	6-9	5-10	5-10	6-9
Relaciones de temperatura	Temperatura óptima 26-30°C Crecimiento escaso a 37°C	Igual	Igual	Igual

Tabla 2

Nombre de la especie Nº FERM-P	Alcaligenes epoxylytica nov. sp. TORAY 1128 FERM-P 2511	Alcaligenes margaritae nov. sp. TORAY 1110 FERM-P 2512
Propiedades morfológicas	0,8 - 1,2 μ x 0,8 - 2,0 μ . Cocolide a varillas cortas. Las células, acompañadas por el material limoso, se producen individualmente. Inmóviles, asporogénicas, gram-negativas.	Igual
Colonias de agar nutriente	Circular, entera, protuberante a convexa, lisa, butirosa, opaca.	Circular, entera, convexa, lisa, viscosa a butirosa, opaca, puntiforme.
Agar nutriente Slant	Filiforme, crecimiento moderado, blanco tirando a marrón, sin cromogénesis.	Igual
Caldo nutriente	Moderadamente turbio, sedimento granular, muy delgado, película oleosa.	Igual
Agar y cis-epoxisuccinato Slant	Filiforme, blanco, translúcido, crecimiento moderado, opalescente, sin cromogénesis.	Igual.
Agar y patata Slant	Filiforme, blanco, opaco con crecimiento abundante, liso, resplandeciente, viscoso, sin cromogénesis.	Igual
Cultivo en un medio de gelatina	Sin licuefacción.	Igual
Leche BCP	Se vuelve azul en 2-3 días, No más cambio. No hay coagulación ni peptonización.	Igual

Tabla 2 (continuación)

Propiedades fisiológicas

1.- Reducción de nitrato	+		
2.- Desnitrificación	-		
3.- Prueba del rojo de metilo	-		
4.- Prueba de Voges Proskauer	-		
5.- Indol	-		
6.- H ₂ S (medio cisteína)	-	Producido intensamente	Producido intensamente
7.- Hidrólisis del almidón	-		
8.- Utilización de citrato	-		
Medio de Koser	-		
Medio de Christensen	-		
9.- Ureasa	+	Débilmente positivo	Débilmente positivo
10.- Oxidasa	+		
11.- Catalasa		Ninguno	Ninguno
12.- Gas de azúcar		Ningún ácido a partir de glucosa, fructosa, manosa, xilosa o arabinosa.	Igual
13.- Acido de azúcar			

Relaciones de pH

6-9

6-10

Relaciones temperatura-crecimiento

Igual

Temperatura óptima 26-30°C.
No se produce crecimiento a 37°C.

Se ilustra la invención mediante los siguientes Ejemplos en los que todos los porcentajes son en peso a menos que se especifique lo contrario, una actividad enzimática que forma 1 micro mol de ácido d-tartárico en 1 hora es expresada como 1 unidad, se ensaya el ácido d-tartárico usando metavanadato amónico por el método de Maurer (Weinberg and Keller, (1967) 14, páginas 323 a 328), se sintetiza el ácido cis-epoxisuccínico por el método de Payne & Williams (Journal of Organic Chemistry, 1959, 24, páginas 54 a 55) y se abrevia "Achromobacter" por "Ach" así como "Alcaligenes" por "Alc."

5.

Se ensaya el ácido d-tartárico usando metavanadato amónico por el método de Maurer (Weinberg and Keller, (1967) 14, páginas 323 a 328), se sintetiza el ácido cis-epoxisuccínico por el método de Payne & Williams (Journal of Organic Chemistry, 1959, 24, páginas 54 a 55) y se abrevia "Achromobacter" por "Ach" así como "Alcaligenes" por "Alc."

10.

EJEMPLO 1

Se inoculó "Ach. tartarogenes" n. sp. TORAY 1246 en un medio consistente en 0,5% de cis-epoxisuccinato disódico, 0,2% de sulfato amónico, 0,14% de fosfato de hidrógeno potásico, 0,31% de fosfato de hidrógeno disódico (H_2O)₁₂, 0,05% de sulfato magnésico (H_2O)₇ y 0,05% de extracto de levadura (Difco) - Marca Registrada. Se ajustó el pH del medio a 7,2 antes de la esterilización a 120°C durante 15 minutos. Las células crecieron aeróbicamente a 30°C durante 36 horas, y fueron recogidas por centrifugación cuando se había alcanzado una fase estacionaria. Después del lavado con agua destilada, las células fueron congeladas a -20°C y descongeladas a temperatura ambiente. Se obtuvieron aproximadamente 108 mg. (peso en seco) de células con 1.270 unidades de actividad de epoxidasa de d-tartrato a partir de 120 ml. del caldo de cultivo.

15.

20.

25.

A la suspensión acuosa de las células, se añadieron 3,0 g. de cis-epoxisuccinato disódico y 75 mM de agente tampón de tris-(hidroximetil)-amino-metano-HCl (pH 8,0) para formar un volumen total de 20 ml. Se dejó esta mezcla en reposo a 37°C durante 21,0 horas. Después de completar la reacción, se añadieron 18,2 ml. de 1N cloruro cálcico. Los precipitados resul-

30.

- tantes de tartrato cálcico fueron recogidos sobre un filtro de vidrio después de ser mantenidos durante una noche a 5°C. Los precipitados fueron suspendidos en un pequeño volumen de agua destilada y la suspensión fue mezclada con aproximadamente 40 ml. de Amberlite (Marca Registrada) IR 120 B (tipo H⁺) y agitados a temperatura ambiente hasta volverse transparente. La resina fue separada por filtración y lavada con agua. Los filtrados combinados fueron evaporados hasta la sequedad por debajo de 60°C bajo presión reducida. Se añadieron aproximadamente 50 ml. de etanol al 99,5% al material sólido resultante, y el material insoluble fue retirado por filtración. El filtrado fue secado nuevamente para producir 2,33 g. de ácido d-tartárico cristalino con un rendimiento del 91% y teniendo una rotación específica $[\alpha]_D^{20} = + 12,4^{\circ}$ (c = 20 en agua) que es igual a la del ácido d-tartárico auténtico.

EJEMPLO 2

- Se inoculó "Alc. epoxylyticus" n. sp. TORAY 1128 en el medio del Ejemplo 1 enriquecido con 0,5% de glucosa. Las células crecieron aeróbicamente a 30°C durante 38,5 horas, y fueron recogidas, lavadas y re-suspendidas en un quinto del volumen anterior de agua destilada. La actividad de epoxidasa de d-tartrato de la suspensión fue de 209 unidades por ml. Se mezclaron 6 ml. de la suspensión con 4 g. de cis-epoxisuccinato disódico y 50 mM de agente tampón de tris-(hidroxi metil)-aminoetano-HCl (pH 8,0) para lograr un volumen final de 30 ml. Esta mezcla fue incubada a 40°C durante 24 horas sin agitación. A la mezcla de reacción, se añadieron 6 ml. de 4,5 M cloruro cálcico para recuperar el ácido d-tartárico como sal de calcio. Los precipitados resultantes fueron purificados como en el Ejemplo 1 para dar 3,0 g. de ácido d-tartárico con un rendimiento del 88%.

EJEMPLO 3

Se inocularó cada una de las cuatro cepas de organismos indicadas en la siguiente Tabla 3 en el medio del Ejemplo 2 y crecieron aeróbicamente durante 36 horas a 30°C. Las células fueron recogidas, lavadas y congeladas-descongeladas como en el Ejemplo 1. Se llevó a cabo la reacción usando estas suspensiones y se añadió a cada una de ellas 0,4 g. de cis-epoxisuccinato disódico en 50 mM de agente tampón de tris-HCl (pH 8,0) a 40°C. El volumen total de la mezcla fue de 3,0 ml. El ácido d-tartárico fue recuperado y purificado como en el Ejemplo 1.

5.

Tabla 3

	<u>Actividad enzimática (unidad/ml)</u>	<u>Tiempo de reacción (h.)</u>	<u>Rendimiento g. (%)</u>
Ach. epoxylyticus, n. sp. TORAY 1270	43,6	7,5	0,30 (88)
Ach. acinus n. sp. TORAY 1366	32,2	8,5	0,30 (89)
Ach. sericatus n. sp. TORAY 1190	38,1	10,0	0,29 (86)
Alc. margaritae n. sp. TORAY 1110	29,8	9,0	0,28 (81)

EJEMPLO 4

Las células de "Ach. tartarogenes" n. sp. TORAY 1246 obtenidas a partir de 3 litros del caldo de cultivo preparado en el Ejemplo 1, fueron suspendidas en 10 mM de agente tampón de tris-HCl (pH 7,6) para formar 200 ml. La suspensión contenía 5,3 g. de las células y 34.200 unidades de actividad de epoxidasa de d-tartarato. Se trataron 100 ml. de la suspensión en una prensa francesa con un oscilador sónico. Al fluido flotante, resultante de la

25.

30.

- centrifugación de la suspensión de células tratada a 7.000 r.p.m. durante 15 minutos, se añadieron 16,2 g. (30% de saturación) de sulfato amónico. Después de dejarla en reposo a 5°C durante una noche, los precipitados fueron retirados por centrifugación y dese-
5. chados. Al fluido flotante y transparente resultante, se añadieron 25,9 g. (0,70% de saturación) de sulfato amónico. Después de 7 horas, los precipitados fueron recogidos por centrifugación y disueltos en agente tampón de tris-HCl (10 mM, pH 7,6) para formar 46 ml. La solución fue dializada con el agente tampón durante
10. una noche a 4°C usando un tubo de celofana Visking para retirar las sales dializables. 81 ml. de la solución enzimática parcialmente purificada así obtenida contenían 1,07 g. de proteína y 13.500 unidades de actividad de epoxidasa de d-tartrato. Se mezclaron 50 ml. de solución de cis-epoxi-succinato disódico al 20%
15. en peso, tamponada por el agente tampón de 50 mM tris-HCl al pH de 8,0, con 17 ml. de la solución enzimática y agua para formar un volumen total de 100 ml. La mezcla fue incubada a 40°C durante 24 horas sin agitación. Después de completar la reacción, se añadieron 14 ml. de 4,5 M cloruro cálcico. Los precipitados fueron
20. recogidos después de permanecer en reposo durante una noche y se obtuvieron 7,77 g. de ácido d-tartático como en el Ejemplo 1, rendimiento 91-92%

EJEMPLO 5

- Se inoculó "Ach. tartarogenes" n. sp. TORAY 1246 en
25. un medio consistente en 1,0% de glicerina, 0,2% de NH_4Cl , 0,31% de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,14% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02% de extracto de levadura y 0,2% de licor de maíz macerado. El pH del medio fue ajustado a 6,7 al comienzo del cultivo y mantenido por encima de 6,7 durante el período de cultivo por adición de
30. hidróxido amónico acuoso al 7%.

Las células crecieron a 30°C con aireación (20 litros/

minuto) y agitación (300 rpm) en un fermentador por sacudidas de 30 litros equipado con un controlador de pH automático. Cuando se alcanzó una fase estacionaria, se añadió cis-epoxisuccinato disódico para dar una concentración final de 0,7% en peso.

5. 6 horas después de la adición del cis-epoxisuccinato, la actividad de epoxidasa de d-tartrato alcanzó su valor máximo de aproximadamente 160 unidades por ml. El caldo de cultivo fue enfriado a temperatura ambiente, y se mezclaron 4,9 litros de caldo de cultivo con 15,1 litros de 1,32 M cis-epoxisuccinato disódico.
10. La mezcla fue calentada a 40°C y se ajustó el pH de la mezcla a 7,5 por adición de ácido clorhídrico diluido. Se condujo la reacción a 40°C y se mantuvo el pH entre 7,5 y 7,7 durante 27 horas. Después de completar la reacción, se ajustó el pH de la mezcla a 6,0 por adición de ácido 6N clorhídrico, y se añadieron 2,79 kg. de dihidrato de sulfato cálcico a 13,8 litros de la mezcla. La mezcla fue agitada durante 1 hora. El tartrato cálcico fue recogido por filtración y lavado con agua destilada. La torta lavada resultante de tartrato cálcico (aproximadamente 4,6 kg) fue suspendida en agua. Se liberó d-tartrato por la adición de una cantidad equivalente de ácido sulfúrico a la mezcla pastosa.
- 15.
- 20.

La solución de ácido d-tartárico crudo obtenida por medio de la filtración fue pasada a través de una columna llena de resina cambiadora de cationes SKLB (tipo H⁺) para retirar el ión calcio y otros cationes. La solución descationizada fue purificada adicionalmente por la adición de carbonato de bario para retirar el ión sulfato, y por la adición de carbón activo para retirar otras impurezas.

- 25.
30. Después de retirar el sulfato de bario y el carbón activo por filtración, se obtuvo una solución transparente

- de ácido 2-tartárico purificado. Esta solución contenía 94% de ácido d-tartárico en comparación con el presente en la torta de tartrato cálcico de la primera etapa del procedimiento de purificación. La concentración de la solución producida fue de 1,65 kg. de ácido d-tartárico.
- 5.

N O T A

- La patente de invención que se solicita por veinte años para España, de acuerdo con la vigente Legislación, deberá recaer sobre: "UN METODO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO D-TARTARICO", con Prioridad de la Solicitud de Patente en Japón número 47525/74 de fecha 30 de abril de 1974, según las características esenciales de las siguientes:
- 10.

R E I V I N D I C A C I O N E S

- 1ª.- Un método para la producción de ácido d-tartárico que consiste en hidrolizar el ácido cis-epoxisuccínico con un microorganismo del género *Achromobacter* o *Alcaligenes*.
- 15.
- 2ª.- Un método para la producción de ácido d-tartárico de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que se conduce la hidrólisis a un pH de 6,5 a 9.
- 20.
- 3ª.- Un método para la producción de ácido d-tartárico, de acuerdo con la reivindicación 2ª, en el que el pH está comprendido entre 7,0 y 8,0.
- 4ª.- Un método para la producción de ácido d-tartárico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la temperatura de hidrólisis está comprendida entre 20 y 50°C.
- 25.
- 5ª.- Un método para la producción de ácido d-tartárico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microorganismo es el *Achromobacter tartarogenea* n. sp.
- 30.

- 6^a.- Un método para la producción de ácido d-tartárico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microorganismo es el *Achromobacter epoxylyticus* n. sp.
5. 7^a.- Un método para la producción de ácido d-tartárico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microorganismo es el *Achromobacter acinus* n. sp.
- 8^a.- Un método para la producción de ácido d-tartárico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microorganismo es el *Achromobacter sericatus* n. sp.
10. 9^a.- Un método para la producción de ácido d-tartárico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microorganismo es el *Alcaligenes epoxylyticus* n. sp.
- 10^a.- Un método para la producción de ácido d-tartárico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microorganismo es el *Alcaligenes margaritae*.
15. 11^a.- UN METODO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO D-TARTARICO. Según queda sustancialmente descrito en la presente memoria, que consta de diecisiete hojas, escritas a máquina por una sola cara.
- 20.

Madrid, 16 de mayo de 1975

TORAY INDUSTRIES INC.

P. P.

FRANCISCO GARCIA CENIZO
P.P.

Firmado en:  Francisco Cenizo