

16 ENE. 1976

444374

P.- 62.161

Case No. F-2228B
L(+)-TARTARIC
ACID

EXAMINER: C12D//AGIK

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD.

entidad japonesa

establecida en 27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku,
Osaka, Japón

por: "UN METODO PARA PRODUCIR ACIDO L(+)-TARTARICO"

8.1.76

- 1 -

Esta invención se refiere a un método nuevo para producir ácido L(+)-tartárico de tipo natural a partir de ácido cis-epoxisuccínico, mediante la utilización de microorganismos.

5 Existe una gran demanda de ácido L(+)-tartárico, que se utiliza como acidulante en alimentos; y ha sido práctica convencional en el campo de la técnica obtener el ácido tartárico como subproducto en el curso de los procedimientos de la fermentación del vino. Tal subproducto está limitado en cuanto a suministro, lo que constituye un inconveniente para la producción estabilizada de grandes cantidades de ácido L(+)-tartárico. Para vencer esta deficiencia, se han considerado o examinado diversos métodos para su producción, tales como los métodos de síntesis química a partir de ácido fumárico, ácido maleico, ácido 5-cetoglucónico, etc., o los métodos de fermentación directa del ácido tartárico por utilización de microorganismos. Sin embargo, todos estos métodos presentan desventajas embarazosas tales como que se producen los isómeros de tipo no natural como subproductos inútiles, o que se obtienen rendimientos sólo deficientes de ácido tartárico, hechos éstos que han desafiado totalmente su utilización para la producción industrializada de ácido tartárico.

10

15

20

25

8.1.76

Teniendo presentes estas circunstancias,
los autores de la presente invención han dedicado es-
tudios profundos a un método enteramente nuevo en el
que se utiliza como materia prima ácido cis-epoxisuccí-
nico que puede suministrarse en grandes cantidades,
después de lo cual se hacen actuar los microorganismos,
de tal modo que pueda tener lugar eficazmente la
hidrólisis estereoespecífica, obteniéndose así ácido
L(+)-tartárico exclusivamente con rendimiento elevado;
y así, los estudios han llevado finalmente a la culmi-
nación de esta invención.

Así pues, el primer objeto de esta invención
es proporcionar un nuevo procedimiento microbiano pa-
ra producir ácido L(+)-tartárico.

El segundo objeto de esta invención es pro-
porcionar microorganismos que son capaces de hidrolizar
el ácido cis-epoxisuccínico a ácido L(+)-tartárico.

Objetos ulteriores se explicarán en las descripciones
siguientes.

El método presente para producir ácido L(+)-
-tartárico comprende: disponer el cultivo de microor-
ganismos, o la materia elaborada de los mismos, que es
capaz de hidrolizar el ácido cis-epoxisuccínico, perte-
neciente al género Pseudomonas, Agrobacterium, o

Rhizobium, produciéndose así el ácido L(+)-tartárico; ponerlo en contacto con el ácido cis-epoxisuccínico, y recuperar el ácido L(+)-tartárico así producido.

5 Los microorganismos a emplear en esta invención pueden aislarse con ventaja notable de entre los microorganismos que son capaces de desarrollarse en el medio de cultivo que contiene ácido cis-epoxisuccínico como única fuente de carbono. Puede citarse como ejemplo un tal procedimiento de aislamiento en el que, en
10 primer lugar, se prepara un medio de cultivo (pH 7,0) añadiendo 0,5-2% de ácido cis-epoxisuccínico, como fuente exclusiva de carbono, al medio de cultivo básico que contiene nitrato de sodio (0,2%), fosfato dipotásico (0,1%), sulfato magnésico (0,05%), cloruro de potasio (0,05%) y sulfato ferroso (0,001%); y
15 en segundo lugar, debe añadirse a dicho medio de cultivo una cantidad adecuada de muestra tal como tierra vegetal, tallos de plantas, nódulos de raíces, u otra sustancia análoga; y en tercer lugar, el todo resultante de lo anterior se somete a cultivo en agitación durante 3-5 días en un intervalo de temperatura de 24°C-37°C; y finalmente, se realiza el aislamiento con respecto al
20 microorganismo que se ha desarrollado en el cultivo.

Entre los microorganismos que se han obtenido como se ha indicado arriba, se utilizan las cepas

8.1.76

microbianas que los autores de la presente invención designan con números tales como KB-86, -91, -97, -105 y -106, garantizándose que sirven para la finalidad de esta invención.

5 Las particularidades de las características bacteriológicas de estos microbios se describen a continuación:

1. Propiedades taxonómicas de la cepa KB-86:

(a) Morfología de la célula:

- 10 (1) Bastoncillos, 0,6-0,8 por 1,5-3,0 micras,
(2) No pleomórfica,
(3) Motilidad por flagelo monotríquico polar,
(4) No formadora de esporas,
(5) Gram-negativa,
15 (6) No resistente a los ácidos.

(b) Características del cultivo:

- (1) Placa de agar nutriente: Circular, entera, convexa, translúcida, blanca como la nata, brillante,
20 (2) Cultivo de agar en pico de planta: Desarrollo moderado, filiforme, suave, blanco como la nata, brillante.
(3) Caldo: Ligeramente turbio; ausencia de desarrollo en la superficie; sedimento.
25 (4) Perforación de gelatina: Ausencia de licuefacción.

(5) Leche de tornasol: Inalterada.

(c) Propiedades fisiológicas:

- 5 (1) Los nitratos no se reducen en el caldo de nitrato.
- (2) No tiene lugar desnitrificación,
- (3) El ensayo con rojo de metilo es negativo.
- (4) No se produce acetilmetilcarbinol.
- (5) No se produce indol.
- 10 (6) No se produce sulfuro de hidrógeno.
- (7) No se hidroliza el almidón.
- (8) Se utiliza citrato.
- (9) Se utilizan nitratos y sales de amonio como fuentes de nitrógeno.
- 15 (10) No se producen pigmentos solubles en agua.
- (11) Se produce ureasa.
- (12) Oxidasa: positivo.
- (13) Catalasa: positivo.
- 20 (14) Desarrollo nulo a pH 6,0 y 10,5. pH óptimo, a aproximadamente 7. Desarrollo nulo a 40°C. Desarrollo a 10°C. Temperatura óptima, entre 25°C y 30°C.
- (15) Aerobio.
- 25 (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidante.

8.1.76

- 5 (17) Acido pero no gas a partir de L-ara
binosa, D-xilosa, D-glucosa, D-manosa,
D-fructosa, D-galactosa, maltosa, sa-
carosa, trehalosa, D-sorbita, D-manita,
y glicerina. Ni ácido ni gas a partir
de lactosa, inosita, y almidón.
- (d) Otras propiedades taxonómicas:
- (1) No se produce fijación de nitrógeno.
- 10 (2) No son necesarios aminoácidos y vita-
minas para el cultivo.
- (3) Aislada a partir de la tierra vegetal.
2. Propiedades taxonómicas de la cepa KB-91:
- (a) Morfología de la célula:
- (1) Bastoncillos, 0,5-0,7 por 1,0-3,0 micras.
- 15 (2) No pleomórfica.
- (3) Motilidad por uno a tres flagelos peritrí-
quicos.
- (4) No formadora de esporas.
- (5) Gram-negativa.
- 20 (6) No resistente a los ácidos.
- (b) Características del cultivo:
- (1) Placa de agar nutriente: Circular, que
se esparce, convexo, transparente, ama-
rillo, brillante.
- 25 (2) Cultivo de agar en pico de flauta: Desarro

llo moderado, que se esparce, suave, amarillo, brillante.

(3) Caldo: Turbio; ausencia de desarrollo en la superficie; sedimento.

5

(4) Perforación de gelatina: Licuefacción estratiforme.

(5) Leche de tornasol: Neutra a ligeramente alcalina, sin zona de suero.

10

Ausencia de peptonización. Color pardo grisáceo al cabo de 2 semanas.

(c) Propiedades fisiológicas:

(1) Los nitratos no se reducen en el caldo de nitrato.

(2) No tiene lugar desnitrificación.

15

(3) El ensayo con rojo de metilo es negativo.

(4) No se produce acetilmetilcarbinol.

(5) No se produce indol.

(6) No se produce sulfuro de hidrógeno.

20

(7) No se hidroliza el almidón.

(8) Se utiliza citrato.

(9) Se utilizan nitratos y sales de amonio como fuentes de nitrógeno.

25

(10) Cromógeno.

(11) Se produce ureasa.

8.1.76

- (12) Oxidasa: positivo.
- (13) Catalasa: positivo.
- 5 (14) Desarrollo nulo a pH 4,5 y 10,5. pH óptimo, a aproximadamente 7. Desarrollo nulo a 40°C. Desarrollo a 10°C. Temperatura óptima, a aproximadamente 30°C.
- (15) Aerobio.
- (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidante.
- 10 (17) Acido pero no gas a partir de L-arabinosa, D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, D-galactosa, lactosa, trehalosa, D-sorbita, D-manita, inosita. Ni ácido ni gas a partir de D-xilosa, maltosa, sacarosa, glicerina, y almidón.
- 15 (d) Otras propiedades taxonómicas:
- (1) Ensayo de producción de 3-cetolactosa: positivo.
- (2) No son necesarios aminoácidos y vitaminas para el cultivo.
- 20 (3) Desarrollo sobre agar de glucosa-azul de anilina. No se absorbe el colorante.
- (4) No se descompone la celulosa.
- (5) Aislada a partir de la tierra vegetal.
- (6) No es parásita para las plantas de acuerdo con las comprobaciones efectuadas.
- 25

3. Propiedades taxonómicas de la cepa KB-105:

(a) Morfología de la célula:

- (1) Bastoncillos, 0,5-0,7 por 1,0-3,0 micras.
- (2) No pleomórfica.
- 5 (3) Motilidad por uno a tres flagelos peritríquicos.
- (4) No formadora de esporas.
- (5) Gram-negativa.
- (6) No resistente a los ácidos.

10

(b) Características del cultivo:

- (1) Placa de agar nutriente: circular, entera, convexa, suave, opaca, blanca amarillenta, brillante.
- (2) Cultivo de agar en pico de flauta:
15 Desarrollo moderado, filiforme, blanco amarillento, brillante.
- (3) Caldo: Sedimento, película.
- (4) Perforación con gelatina: Ausencia de licuefacción.
- 20 (5) Leche de tornasol: Alcalina, con zona de suero.

(c) Propiedades fisiológicas:

- (1) Los nitratos no se reducen en el caldo de nitrato.
- 25 (2) No se produce desnitrificación.

8.1.76

- (3) Ensayo con rojo de metilo: negativo.
- (4) No se produce acetilmetilcarbinol.
- (5) No se produce indol.
- (6) No se produce sulfuro de hidrógeno.
- 5 (7) No se hidroliza el almidón.
- (8) Se utiliza citrato en el medio de Christensen, pero no en el medio de Koser.
- (9) Se utilizan nitratos y sales de amonio como fuentes de nitrógeno.
- 10 (10) Acromógeno.
- (11) Se produce ureasa.
- (12) Oxidada: positivo.
- (13) Catalasa: positivo.
- 15 (14) Desarrollo nulo a pH 4,5 y 10,5. pH óptimo, a aproximadamente 7. Desarrollo nulo a 40°C. Desarrollo a 10°C. Temperatura óptima, a aproximadamente 30°C.
- (15) Aerobio.
- 20 (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidante.
- (17) Acido, pero no gas a partir de L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, D-fluctosa, D-galactosa, maltosa, sacaarosa, trehalosa, D-sorbita, D-manita, y glicerina. Ni ácido ni gas a partir de lactosa, inosita, y almidón.
- 25

8.1.76

(d) Otras propiedades taxonómicas:

- 5
- (1) Ensayo de producción de 3-cetolactosa: positivo.
 - (2) Son necesarias vitaminas para el desarrollo.
 - (3) Desarrollo sobre agar de glucosa-azul de anilina. No se absorbe el colorante.
 - (4) Se forman colonias viscosas sobre medios de azucar.
 - 10 (5) No se descompone la celulosa.
 - (6) Aislada a partir de la tierra vegetal.
 - (7) No es parásita para las plantas de acuerdo con las comprobaciones efectuadas.

15 4. Propiedades taxonómicas de las cepas KB-97 y KB-106.

(a) Morfología de la célula.

- (1) Bastoncillos cortos, 0,8-1,0 por 1,0-1,5 micras.
- 20 (2) En los cultivos jóvenes se encuentran grandes células irregulares.
En cultivos más viejos, las células se convierten en bastoncillos cocoideos.
- (3) Ausencia de motilidad.
- (4) No formadora de esporas.
- 25 (5) Gram-negativa.

(6) No resistente a los ácidos.

(b) Características del cultivo.

5

(1) Placa de agar nutriente: circular, entera, convexa, suave, blanca grisácea, opaca, brillante.

(2) Cultivo de agar en pico de flauta: Desarrollo moderado, filiforme, suave, blanco grisáceo, brillante.

10

(3) Caldo: Ligeramente turbio; ausencia de desarrollo en la superficie; sedimento.

(4) Perforación de gelatina: Ausencia de licuefacción.

15

(5) Leche de tornasol: Ligeramente alcalina; ausencia de peptonización; ausencia de zona de suero.

(c) Propiedades fisiológicas.

20

(1) Reducción de nitratos: KB-106 es positiva, pero KB-97 es negativa en el caldo de nitrato.

(2) No se produce desnitrificación.

(3) Ensayo con rojo de metilo: negativo.

(4) No se produce acetilmetilcarbinol.

(5) No se produce indol.

(6) No se produce sulfuro de hidrógeno.

25

(7) No se hidroliza el almidón.

8.1.76

- (8) No se utiliza citrato.
- (9) Se utilizan nitratos y sales de amonio como fuentes de nitrógeno.
- (10) Acromógeno.
- 5 (11) Se produce ureasa.
- (12) Oxidasa: positivo.
- (13) Catalasa: positivo.
- (14) Desarrollo nulo a pH 4,5 y 8,6. pH óptimo, a aproximadamente 7. Desarrollo nulo a 40°C. Desarrollo a 10°C. Temperatura óptima, a aproximadamente 30°C.
- 10 (15) Aerobio.
- (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidante.
- (17) Acido, pero no gas, a partir de L-arabinosa, y D-fructosa, Ligeramente ácido, pero no gas, a partir de D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, y glicerina. Ni ácido ni gas a partir de maltosa, sacarosa, lactosa, trehalosa,
- 15 D-sorbita, D-manita, inosita, y almidón.
- 20 (d) Otras propiedades taxonómicas.
- (1) No se produce 3-cetolactosa.
- (2) Desarrollo sobre medios de extracto de levadura en 3 días.
- 25 (3) Aislada a partir de nódulos de raíces de trébol.

Las propiedades taxonómicas de estas cinco cepas fueron consultadas con descripciones que aparecen en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ª edición (1974), y se identificaron posiciones taxonómicas de estas cepas.

La cepa KB-86 se identifica como una especie del género Pseudomonas, porque este organismo es un bastoncillo gram-negativo, positivo a la oxidasa, aerobio, provisto de motilidad, posee un flagelo polar monotríquico, y no se desarrolla a pH 6,0.

Las cepas KB-91 y KB-105 se identifican como especies del género Agrobacterium, porque estos dos organismos son bastoncillos gram-negativos, aerobios, positivos a la oxidasa, positivos a la catalasa, y provistos de motilidad, utilizan citrato, y dan reacción positiva en el ensayo de producción de 3-cetolactosa. Pero no se ha encontrado que estos organismos sean parásitos para las plantas en las comprobaciones realizadas, y no reducen los nitratos en el caldo de nitrato. Además, la cepa KB-91 es cromógena, y la cepa KB-105 requiere vitaminas para su desarrollo, y ambos organismos son, según se ha determinado, especies nuevas del género Agrobacterium. Así, la cepa KB-91 se denomina Agrobacterium aureum, y KB-105 se denomina Agrobacterium viscosum, respectivamente.

Las cepas KB-97 y KB-106 se aislaron a partir de los nódulos de la raíz del trébol. Estos dos organismos son bastoncillos gram-negativos, aerobios, no producen 3-cetolactosa, y no utilizan citrato. Las células jóvenes son irregulares y grandes, y en cultivos más viejos las células se convierten en bastoncillos cocoideos. A partir de estas propiedades, las cepas KB-97 y KB-106 se identifican como una especie del género Rhizobium. Pero ambos organismos están desprovistos de motilidad, se desarrollan sobre medios de extracto de levadura en 3 días y causan reacción alcalina en la leche de tornasol sin zona de suero. Así, se ha determinado que las cepas KB-97 y KB-106 son nuevas especies del género Rhizobium, y se denominan ambas Rhizobium validum.

Los microbios arriba indicados están depositados actualmente bajo la custodia de:

"Institute for Fermentation" (Fundación Judicial; nombre abreviado: IFO); Osaka, Japón.

"Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology" (nombre abreviado: FERM), Chiba-City, Japón; y

"American Type Culture Collection" (nombre abreviado: ATCC), Maryland, EE.UU.

Y los números de identificación que se asig-

nan a cada uno de los microorganismos son como se indica a continuación:

	<u>Microorganismo</u>	<u>Nº IFO</u>	<u>Nº Accesoión FERM</u>	<u>Nº ATCC</u>
5	KB-86	13645	2855	31106
	KB-91	13647	2857	31108
	KB-97	13648	2858	31109
	KB-105	13652	2862	31113
	KB-106	13653	2863	31114

10 El método que representa esta invención debe llevarse a cabo poniendo los cultivos de los microbios arriba descritos o el material tratado de los mismos en contacto con ácido cis-epoxisuccínico, que es la materia prima a emplear. En el caso en que ha de ponerse en contacto el cultivo, por lo que respecta a este cultivo, se puede emplear el producto per se que se ha obtenido a partir de la incubación del microbio de que se trata, en un procedimiento; mientras que como procedimiento alternativo puede añadirse el ácido

15 cis-epoxisuccínico al medio de cultivo durante el curso del procedimiento de incubación del microbio, teniendo lugar así una realización paralela y simultánea de ambos fenómenos, la incubación del microbio y la reacción.

25 La materia elaborada del cultivo que se mencio-

na en esta memoria representa las muestras que contienen el sistema de enzima que se relaciona con la reacción en la que se hidroliza el ácido cis-epoxisucínico, dando como resultado la formación de ácido L(+)-tartárico. Para ilustrar dichas muestras, pueden citarse células microbianas vivas, células microbianas secas, células microbianas ocluidas, células microbianas trituradas, enzimas crudas o refinadas, enzimas insolubilizadas, o análogas, que se obtienen sometiendo dicho cultivo a tratamientos adecuados, p.ej., aislamiento por centrifugación, filtración, lavado, secado, trituración, extracción, insolubilización, o procedimientos similares.

Después de llevar a la práctica dicho tratamiento de incubación, el medio de cultivo puede encontrarse en estado líquido o sólido; pero una forma comúnmente aplicable y al propio tiempo más conveniente es recurrir al cultivo con sacudidas o cultivo en agitación aireado a realizar referido al medio de cultivo en estado líquido. No existe ninguna limitación o condición particular alguna en la determinación de la clase del medio de cultivo, esto es, que puede emplearse cualquier clase de medio de cultivo en el grado en que dicho medio de cultivo pueda acomodar a dichos microbios dejándolos que se desarrollen normalmente, y que

5 pueda formarse adecuadamente en aquél el sistema
de enzimas capaz de convertir el ácido cis-epoxisuc-
cínico en ácido L(+)-tartárico. Por ejemplo, como la
fuente de carbono a emplear, se pueden utilizar el
ácido cis-epoxisuccínico, glucosa, lactosa, glicerina,
sacarosa, melazas, ácidos orgánicos, hidrocarburos,
y análogos; y como la fuente de nitrógeno pueden uti-
lizarse diversas clases de sales de amonio, nitratos,
u otros compuestos de nitrógeno; y ulteriormente, en
10 cuanto a las sales inorgánicas, pueden añadirse diver-
sas clases de fosfatos, sulfato de magnesio, cloruro
de sodio, etc. Asimismo, con el fin de estimular el
desarrollo de microorganismos, pueden añadirse diver-
sas vitaminas, compuestos asociados con ácido nucleico
15 o análogos. Cualquiera que sea el método de incubación
que pueda adoptarse en el caso de trabajo real, es
aconsejable añadir, en el momento de iniciarse la in-
cubación, el ácido cis-epoxisuccínico al medio de cul-
tivo, aun cuando sea en pequeña cantidad, en el senti-
do de que es eficaz para llegar a un resultado mejor.
20 Además, dependiendo de la clase del método
de cultivo y de las condiciones de incubación, puede
encontrarse en algunos casos efectiva la adición de
algún agente desespumante, tal como silicona, aceite
de soja o análogos, al medio de cultivo para mejorar
25

la tasa de rendimiento de la producción de ácido L(+)-tartárico. Asimismo, cuando se plantea la operación de incubación, es preferible inocular en el medio de cultivo alguna cantidad adecuada del caldo de cultivo obtenido mediante el pre-cultivo que se ha llevado a cabo previamente en una escala más reducida. Las condiciones de incubación, que implican la temperatura de cultivo, la duración del tiempo de cultivo, y la acidez-alcalinidad del medio de cultivo, están sujetas a variaciones de acuerdo con la clase de microbios empleada o con la composición o elementos del medio de cultivo; pero si sólo se realizan una selección y ajuste adecuados enfocados simplemente al objetivo último de la máxima producción de dicho sistema de enzimas, ello justificaría que las condiciones de trabajo bastasen para el objetivo. En muchos casos de la práctica, pueden obtenerse resultados satisfactorios realizando la incubación en condiciones aerobias, a alrededor de 20-40°C, y durante 1-7 días, manteniendo entretanto el caldo de cultivo a un pH aproximado de 5-9.

En el caso de que la materia prima de ácido cis-epoxisuccínico haya de añadirse al medio de cultivo en el curso del procedimiento de incubación, por lo que respecta al momento de la adición del material, ge-

neralmente se elige entre antes del momento de iniciarse la incubación, o en el momento adecuado durante el transcurso de la incubación. En este caso, dicho material a añadir debe hallarse en forma pulverizada de, por ejemplo, sales de sodio, potasio u otras sales análogas; o bien, en forma de solución o suspensión que se funde o disuelve en un disolvente apropiado tal como agua; y dicha solución o suspensión se añadirá toda de una vez, o continuamente a lo largo de un período de tiempo definido, o intermitentemente.

En el caso en que se desee producir ácido L(+)-tartárico por el método de poner las materias primas en contacto con el cultivo del microorganismo, o con la sustancia tratada de aquél, ordinariamente es preferible hacer dicha inoculación en un medio acuoso. En tal caso, puede obtenerse un resultado más ventajoso haciendo que la concentración del ácido cis-epoxisuccínico en el líquido reactivo sea lo más alta posible, con tal que dicha concentración se mantenga dentro de los límites que no impidan la actividad del cultivo microbiano o de la materia elaborada del mismo. Si las circunstancias lo requieren, es factible que el ácido cis-epoxisuccínico se añada por partes, a intervalos de un cierto período defini-

do de tiempo.

La reacción puede iniciarse por uno cualquiera de los métodos de reposo, sacudidas o agitación.

5 Adicionalmente, en el caso de que se utilicen las células microbianas ocluidas o la enzima insolubilizada, es también aplicable un método en el que la solución de ácido cis-epoxisuccínico se deja fluir a través de la columna en la que se encuentra en forma de relleno dicha sustancia utilizada. En cuanto a la temperatura
10 de reacción, en los casos ordinarios se utiliza alrededor de 5-50°C. La velocidad de reacción varía de acuerdo con factores variables tales como la clase de microbios utilizada, la cantidad de enzima que está contenida en el cultivo o su materia elaborada,
15 la concentración de ácido cis-epoxisuccínico, el modo de reacción así como las condiciones de reacción; y por consiguiente, el tiempo de reacción vendrá determinado por la selección adecuada según las circunstancias lo exijan.

20 El ácido L(+)-tartárico que se ha formado en el caldo de cultivo o en el medio de reacción por los mecanismos que se han descrito arriba, puede aislarse fácilmente por una combinación adecuada de diversos métodos, que están basados en las características químicas específicas del ácido L(+)-tartárico. A modo de
25

ejemplos, se utilizan la precipitación en forma de sales de calcio o análogas, o el método de eliminación de impurezas por medio de resina de intercambio de iones, carbón vegetal activado y análogos, cada uno de los cuales da resultados efectivos.

Si bien las realizaciones preferidas de los métodos a que se refiere esta invención se muestran en los ejemplos que siguen, debe entenderse que los ejemplos siguientes se describen sólo para fines de ilustración, y que es evidente que los métodos descritos en detalle no deben interpretarse como limitaciones del contenido de esta invención.

Ejemplo 1

Se utiliza una cepa de Rhizobium validum KB-97 para inocular 500 ml de medio de cultivo líquido (pH 7,0) contenido en dos series de frascos de Sakaguchi de 2 litros de capacidad, estando constituido el medio por glucosa (0,5%), nitrato de amonio (0,5%), fosfato dipotásico (0,1%), más sulfato de magnesio (0,05%); y este medio de cultivo líquido se somete a incubación en condiciones de cultivo con sacudidas alternativas a 30°C durante 24 horas, obteniéndose a partir de aquél alrededor de 1 litro de caldo de cultivo. El caldo así obtenido se transfiere a un depósito de 50 litros de capacidad que contiene

8.1.76

30 l. de medio de cultivo líquido (pH 7,0) que está compuesto por cis-epoxisuccinato disódico (0,6%), nitrato de amonio (0,5%), fosfato dipotásico (0,1%), y sulfato magnésico (0,05%); y el contenido del depósito se somete a cultivo con agitación aireado a 30°C durante 30 horas. El caldo de cultivo obtenido a partir de lo anterior (15 l.) se transfunde a un depósito de 200 l. de capacidad que contiene 100 l. de medio de cultivo (pH 7,0) que está compuesto de nitrato amónico (0,5%), fosfato dipotásico (0,1%), cloruro potásico (0,05%), sulfato magnésico (0,05%), y sulfato ferroso (0,001%); y simultáneamente, se añaden 2,7 kg de los cristales de cis-epoxisuccinato disódico. La mezcla se somete a cultivo con agitación aireado a 30°C. Este cultivo se lleva a cabo continuamente durante 7 días consecutivos; y en el transcurso de la duración ininterrumpida se añaden 2,0 kg de los cristales de cis-epoxisuccinato disódico el día 3º y el día 5º, respectivamente. Aproximadamente 95 l del caldo de cultivo obtenido como se ha indicado arriba se filtran por medio de un filtro-prensa; y mientras que se agita el filtrado a fondo, se añaden 5,8 kg de los cristales de cloruro de calcio (dihidratado) poco a poco; y el resultado de lo anterior se deja en reposo durante una noche, a continuación de lo cual se lleva a

cabo filtración por medio de un filtroprensa; y se recuperan así los cristales de L(+)-tartrato de calcio. La cantidad producida asciende a 5,7 kg (como anhídrido).

5

Ejemplo 2

Se utiliza una cepa de Agrobacterium aureum KB-91 para inocular frascos, que contienen cada uno 500 ml de medios de cultivo líquidos (pH 7,0), dispuestos respectivamente en cuatro frascos Sakaguchi de 2 l. de capacidad, estando compuesto cada medio de cis-epoxisuccinato disódico (0,6%), nitrato amónico (0,5%), fosfato dipotásico (0,1%), cloruro potásico (0,05%), sulfato magnésico (0,05%), y sulfato ferroso (0,001%); y este medio de cultivo líquido se somete a incubación en condiciones de cultivo con sacudidas alternativas, a 28°C durante 48 horas. Alrededor de 1,9 l. del caldo de cultivo obtenido de lo anterior se someten a separación centrífuga, recogién dose así células microbianas, y así alrededor de 5 g de células húmedas. Las células húmedas se suspenden luego en 200 ml de agua destilada, a la que se añaden 5,2 g de los cristales de cis-epoxisuccinato disódico. La mezcla se hace reaccionar luego a 37°C durante 4 horas, imprimiéndose sacudidas o agitación a la misma una y otra vez a intervalos. El líquido reaccionante obteni-

10

15

20

25

8.1.76

do de lo anterior se somete a separación centrífuga para eliminar las células; y se añaden al líquido sobrenadante de lo anterior 4,5 g de cloruro de calcio (dihidratado) poco a poco, ejerciéndose agitación todo el tiempo. Después de haber dejado en reposo en el refrigerador durante una noche, los precipitados formados en él se recogen en un filtro de vidrio, precipitados que se enjuagan luego a fondo con agua; y así se obtienen 5,1 g de los cristales (en forma de anhídrido) de I(+)-tartrato de calcio.

Ejemplo 3

Se utiliza una cepa de Agrobacterium viscosum KB-105 para inocular de la misma manera que en el Ejemplo 2, excepto en lo que se refiere a la adición de 100 microgramos/ml de piridoxal, obteniéndose así 6,0 g de células húmedas. Las células se suspenden en 50 ml de agua destilada, y se somete la suspensión a tratamiento por ondas ultrasónicas (140 W; 1,7 A) durante 15 minutos. Una cantidad del líquido tratado obtenido después de la acción de las ondas ultrasónicas se somete a separación centrífuga (20.000 x g) durante 15 minutos, obteniéndose así 47 ml de líquido sobrenadante. A este líquido sobrenadante se añaden 50 ml de una solución acuosa al 4,0% de cis-epoxisuccinato disódico, y la mezcla se somete a reacción a 37°C du-

5 rante 2 horas. Una vez terminada la reacción, el líquido reaccionante se diluye dos veces con agua, dejándose luego que el todo fluya a través de la columna de carbón vegetal activado (1,5 x 10 cm), recogién-
10 se de este modo el producto eluido. Mientras que se ejerce la agitación, se añaden gota a gota 15 ml de una solución al 12% de cloruro de calcio. El resultado de lo anterior se deja en reposo a 5°C durante 3 horas, y durante ello se recogen los precipitados sobre el filtro de vidrio. Se recuperan así los cristales de L(+)-tartrato cálcico, ascendiendo el rendimiento a 2,0 g (como anhídrido).

Ejemplo 4

15 Una cepa de Pseudomonas sp. KB-86 se utiliza para inocular y se incuba de la misma manera que en el Ejemplo 2; y de 4 l. del caldo de cultivo se recuperan alrededor de 11 g de células húmedas. Las células así recuperadas se suspenden en 200 ml de agua destilada, y se añaden a lo anterior 100 ml de solución acuosa que contiene acrilamida (30 g), N,N'-metilen-bis-acri-
20 lamida (0,8 g), N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina (0,2 ml), junto con 100 ml de una solución acuosa al 0,3% de persulfato amónico. El líquido resultante se somete a reacción a 0-5°C durante alrededor de 1 hora,
25 a fin de que pueda formarse el gel. El gel así forma-

do se tritura luego sustancialmente por medio de un homogenizador, seguido luego por enjuagado con 2 l. de agua destilada. El gel enjuagado se suspende a continuación en 900 ml de agua destilada. A este líquido de suspensión resultante que contiene células ocu^lidas, se añaden 100 ml de una solución al 30% de cis-epoxisuc^ucinato disódico; y mientras que se está ejerciendo la agitación más suave, se somete el líquido en suspensión a reacción a 30°C durante 10 horas. El líquido reaccionante se filtra a través de una columna en la que se ha dispuesto un relleno constituido por una pequeña pieza de algodón o guata absorbentes; e inmediatamente después de lo anterior, se dejan fluir a través de la columna 2 l. de agua destilada, en orden a efectuar el enjuagado del gel. El filtrado-reaccionante obtenido de lo anterior se reúne con el líquido de enjuagado, sometiéndose luego esta mezcla a desalado que se verificará por paso a través de resina Amberlite IR-120 (tipo H⁺); y el producto eluido se somete a concentración a presión reducida. El concentrado resultante se deja en reposo a 5°C durante una noche. Los cristales formados en aquél durante la noche se recogen sobre el filtro de vidrio, en tanto que las aguas madres se concentran adicionalmente. Por repetición de la concentración y cristalización, se re-

cuperan aproximadamente 23 g de los cristales de ácido L(+)-tartárico.

Ejemplo 5

Se utiliza una cepa de Rhizobium validum
5 KB-106 para inocular 500 ml de medio de cultivo líquido (pH 7,0) contenido en un frasco Sakaguchi de 2 l de capacidad, que se compone de cis-epoxisuccinato disódico (0,6%), sulfato amónico (0,5%), sulfato dipotásico (0,1%), más sulfato magnésico (0,05%); y
10 este medio de cultivo líquido se incuba a 30°C durante 48 horas, en condiciones de cultivo con agitación por sacudidas alternativas, con lo que se obtienen 500 ml de caldo de cultivo. El caldo de cultivo así obtenido se transfiere a un depósito de 50 l de capacidad
15 que contiene 30 l del medio de cultivo justamente idéntico en composición al descrito arriba; y el medio de cultivo líquido contenido en dicho depósito se somete a incubación a 28°C durante 48 horas en condiciones de cultivo con agitación aireado. Alrededor de 30 l del
20 caldo de cultivo obtenido de lo anterior se someten a la acción de una centrífuga Sharples para separar las células microbianas, con lo que se obtienen alrededor de 80 g de células húmedas. Estas células húmedas se suspenden en 1,5 l de agua, y utilizando un Fraccionador
25 de Células Refrigerado, Sorval Rf-1 Ribí, las células

se destruyen por completo. Después de ello, se ejerce además una separación centrífuga (20.000 x g) durante 20 minutos, haciéndose posible así la obtención de alrededor de 1,4 l de un líquido sobrenadante. Además de lo anterior, se emplea aquí otra sustancia específica, a saber β -1,3-glucano (fabricado por TAKEDA Chemical Industries, Ltd.; una Patente Japonesa está concedida y registrada con esta sustancia, y está publicada con el número de serie 32673/1973). Esta sustancia específica es producida por TAKEDA basándose en la cepa NTK-u (IFO 13140) que es una cepa mutante que pertenece al género Alkaligenes faecalis var mixogenes 10 C 3 K (A esta sustancia se denomina de aquí en adelante PS, para abreviar). Se suspenden 300 g de PS en 6 l de agua destilada, y se añaden a ello 6 l de solución acuosa al 5% de bromocianato; y mientras que se está ejerciendo agitación, se añade gota a gota hidróxido de sodio 2N a tal velocidad que el pH se eleve aproximadamente 0,5 por minuto; y lo anterior se somete a reacción a fin de lograr un pH de 11. Además, el líquido reaccionante se mantiene en reposo a dicho valor de pH arriba indicado durante 15 minutos. Se filtra luego el líquido reaccionante; y la parte sólida se enjuaga cuidadosamente con agua destilada; obteniéndose como resultado de ello un producto

PS activado. A este PS activado, obtenido como se ha descrito arriba, se añaden 1,4 l. del extracto de células previamente obtenido, junto con 3 l. de solución tris-tampón de ácido clorhídrico 0,2M (pH 8,0). Se
5 añade adicionalmente agua destilada en orden a lograr que el volumen total ascienda a 6 l., haciéndose luego que el todo reaccione a 5°C durante 4 horas. Una vez terminada la reacción, se utiliza un filtro de vidrio para la filtración, recogiendo así las partes sólidas. Después de ello, se lleva a cabo un en-
10 juaado con glicocola 0,2M, cloruro sódico 0,5M y agua destilada, por este orden, en cantidad de 8 l. de cada uno, con los ingredientes respectivos anteriores. La enzima insolubilizada obtenida a partir de lo anterior se suspende en agua destilada, y luego se introduce como relleno en la columna (8 x 50 cm).
15 Mientras que se mantiene la columna arriba citada a 30°C, se hace pasar solución acuosa al 1,5% de cis-epoxisuccinato disódico, que se ha precalentado hasta 30°C previamente, a una velocidad de 1,5 l. por hora. A 72 l. de producto eluido de la columna, que se ha acumulado durante los dos últimos días, se añaden poco a poco 900 g de cloruro cálcico (dihidratado), ejerciéndose agitación todo el tiempo. La mezcla re-
20 sultante se deja en reposo a la temperatura ambiente

25

8.1.76

durante una noche. El precipitado formado en el seno de aquélla se filtra y se deseca; y se recuperan así 1100 g de L(+)-tartrato cálcico (como anhídrido).

5 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Japón, con fecha 17 de Enero de 1975, bajo el Nº 8149/75, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

REIVINDICACIONES

15 Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención, en España, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20 1ª.- Un método para producir ácido L(+)-tartárico, que comprende (1) poner un cultivo o la materia elaborada del mismo a partir de un microorganismo que pertenece al género Pseudomonas, Agrobacterium o Rhizobium y es capaz de hidrolizar el ácido cis-epoxisuccínico, formándose así ácido L(+)-tartárico, en contacto con ácido cis-epoxisuccínico, y (2) recuperar el

25

8.1.76

ácido L(+)-tartárico así formado.

2ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el microorganismo es Rhizobium validum.

5 3ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el microorganismo es Agrobacterium aureum.

10 4ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el microorganismo es la especie de Pseudomonas IFO 13645.

5ª.- Un método para producir ácido L(+)-tartárico.

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

15 Esta Memoria consta de treinta y tres hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

16 ENE. 1976

P.A.

Alberto de Elizalde
Por Poder

8.1.76

IAG/