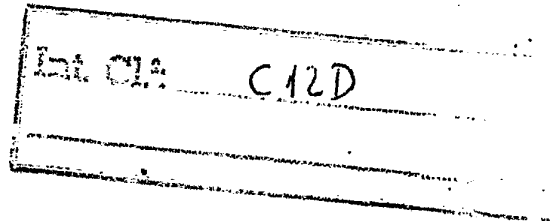


444576

23 ENE. 1976

P.- 62.162

Case F-2229 B



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 MEJORADO PARA PRODUCIR ACIDO L(+)-TARTA-
RICO"

Esta invención se refiere a un método para producir ácido L(+)-tartárico. Más concretamente, esta invención se refiere a un método mejorado para producir ácido L(+)-tartárico, que comprende, en un procedimiento para la preparación de ácido tartárico por hidrólisis microbiológica de ácido epoxisuccínico, incorporar el cis-epoxisuccinato cálcico como materia prima en el medio de cultivo, incubar el microorganismo y producir con él el L(+)-tartrato cálcico.

Hasta ahora, el método para producir ácido meso-tartárico por hidrólisis microbiológica del ácido trans-epoxisuccínico ha sido conocido públicamente (Journal of Bacteriology 70, 405 (1955)). Asimismo, los presentes inventores habían completado ya el método para producir ácido L(+)-tartárico por la hidrólisis microbiológica de ácido cis-epoxisuccínico; y con el cual presentaron una solicitud de Patente española Nº 444.374 . . ., presentada el 16 de enero, 1976).

Para la mejora del método anterior, los inventores han hecho estudios profundizados adicionales en los aspectos de las condiciones de la preparación microbiológica de ácido L(+)-tartárico a partir de ácido cis-epoxisuccínico, y han llegado a descubrimientos tales como que la solución de cis-epoxisuccinato, un material de partida, tiene la propiedad de inhibir el desarrollo de mi-

croorganismos; y que dicha solución, cuando se encuentra en concentración mayor de 3-5%, es apta para causar un retardo notable del desarrollo, u ocasionalmente conduce a un estado totalmente prohibitivo del desarrollo de los microbios. De acuerdo con ello, es difícil alimentar una gran cantidad de las sales de alta solubilidad en agua toda de una vez al medio de cultivo, por ejemplo, sales tales como la sal sódica, potásica, amónica, o sales análogas.

En contraste con lo anterior, el cis-epoxisuccinato cálcico es de una solubilidad en agua tan baja como sólo 1% o de este orden a la temperatura ambiente, de tal modo que incluso si una masa del cis-epoxisuccinato cálcico se añade en su totalidad de una sola vez, ni se observa el retardo en el desarrollo de los microbios en el cultivo, ni se observa tampoco retardo alguno en la hidrólisis.

Además de lo anterior, cuando se utiliza el cis-epoxisuccinato cálcico como materia prima para producir L(+)-tartrato cálcico, la solubilidad del L(+)-tartrato cálcico en agua es tan baja que el producto reaccionante se precipita fácilmente, el cual se separa del sistema de reacción con toda facilidad. No se produce ya inhibición de la hidrólisis debida al producto de la reacción, ni descomposición ulterior del ácido L(+)-tartárico debi

da a microorganismos, y por tanto, la reacción de hidrólisis transcurre en un tiempo más corto, dando lugar así a rendimientos mejores.

5 Por otra parte, dirigiendo la atención al problema de los materiales, se encuentra que el ácido cis-epoxisuccínico, que es la sustancia de partida, se prepara generalmente por un método convencional que implica la oxidación del ácido maleico en una solución acuosa por peróxido de hidrógeno en presencia de catalizadores tales como ácido wolfrámico, ácido molíbdico, heteropoliácidos de molibdeno o de wolframio, u otras sales de dichos ácidos; sin embargo, como método alternativo, es factible también un procedimiento en el que el ácido maleico se somete a epoxidación en forma de sales de sodio, potasio, calcio y similares, y luego se efectúa seguidamente intercambio de ión o adición de otras sales metálicas, convirtiéndose así efectivamente dicho ácido maleico en el ácido cis-epoxisuccínico o succinato buscados como objetivo. Como se ha mencionado arriba, hay diversos métodos para preparar ácido cis-epoxisuccínico. Entre estos métodos, sin embargo, en el método que implica convertir el ácido cis-epoxisuccínico en ácido L(+)-tartárico por empleo de microorganismos, es aconsejable que la materia prima no contenga en sí cantidad alguna de tales impurezas resultantes de la epoxidación, como por ejemplo ácido maleico, ácido DL-tartárico, cata

10

15

20

25

lizador de epoxidación y similares, debido a que la pre
sencia de tales impurezas tiende a inducir la inhibición
del desarrollo de los microbios, o la inhibición de la
actividad de la enzima; y finalmente, los procedimientos
5 de purificación del ácido L(+)-tartárico resultante se
hacen innecesariamente complicados. El ácido cis-epoxi-
succínico y sus sales de sodio, potasio y similares son
de una solubilidad en agua tan alta que el aislamiento
de éstas a partir de la solución acuosa resulta compli-
10 cado, mientras que el cis-epoxisuccinato cálcico, tanto
si se trata de la sal normal como de la sal ácida, es de
solubilidad lo bastante baja para aislarse fácilmente de
la solución acuosa. Por tanto, el cis-epoxisuccinato cálcico
a obtener por este método es ventajoso con respecto
15 a su elevada pureza y buen rendimiento; y por consiguien-
te, no contiene ninguna de tales impurezas que podrían
inhibir el desarrollo de los microorganismos o la acti-
vidad de la enzima, ni impureza alguna que tienda a com
plicar los procedimientos de purificación. Para obtener
20 este cis-epoxisuccinato de calcio, es aplicable selecti-
vamente cualquiera de los dos métodos siguientes. En uno
de estos métodos, puede utilizarse el maleato cálcico co
mo materia prima como se ha descrito arriba, mientras que
en el otro método alternativo puede transcurrir la reac-
25 ción de epoxidación en forma de ácido maleico o de sus sa

les de sodio, potasio y análogas; y después de ello el producto resultante se aísla, o de lo contrario, en vez de recurrir a aislamiento, puede realizarse la conversión en cis-epoxisuccinato cálcico por adición de sal de calcio, hidróxido cálcico, óxido cálcico, y análogos, formándose así un compuesto tal como cis-epoxisuccinato cálcico. En el caso de que haya de usarse el maleato cálcico como materia prima, es ventajoso que primeramente se lleve a cabo la reacción de epoxidación utilizando la solución o suspensión acuosa que contiene 0,2-1 átomo gramo de calcio para la cantidad de 1 mol de ácido maleico; y en segundo lugar, después de la reacción, debe añadirse el compuesto de calcio; o en caso contrario, en vez de añadir dicho compuesto de calcio, el producto resultante puede aislarse en forma de compuestos tales como cis-epoxisuccinato de hidrógeno-calcio, o cis-epoxisuccinato cálcico, o incluso como la mezcla de dichos compuestos. Especialmente, cuando la reacción de epoxidación transcurre mediante el uso de una solución o suspensión acuosa que contiene de 0,4 a 0,8 átomos gramo de calcio en proporción a la cantidad de 1 mol de ácido maleico, puede obtenerse cis-epoxisuccinato cálcico de alta pureza con buen rendimiento sin requerir purificación particular. Partiendo de la base que se ha descrito arriba, puede concluirse que, por el método que implica el uso de cis-epoxisuccina

to cálcico como material de partida, la cadena de conversión que parte del cristal de la materia prima para llegar al cristal de L(+)-tartrato cálcico, que es el producto resultante, puede completarse con alta concentración, y con mejor rendimiento, así como con una gran velocidad de transformación; y adicionalmente, puede lograrse fácilmente el aislamiento del producto resultante. Todas las ventajas citadas arriba significan la competencia como método de fabricación industrializado para el ácido L(+)-tartárico.

Como la segunda mejora del método para producir ácido L(+)-tartárico, los presentes inventores han encontrado que en la utilización de cis-epoxisuccinato cálcico como materia prima, si está presente un agente tensioactivo de tipo no iónico en el medio de cultivo, el período de fermentación se abrevia más notablemente, y el cis-epoxisuccinato cálcico de alta concentración puede convertirse en L(+)-tartrato cálcico con alta eficiencia.

Basándose en los descubrimientos anteriores, se han realizado esfuerzos de investigación adicionales, para culminar finalmente en el completamiento de la presente invención.

Así, el objeto principal de la presente invención es proporcionar un método mejorado para producir ácido L(+)-tartárico en el que la incubación de microorganismos

mos y la hidrólisis del cis-epoxisuccinato cálcico en L(+)-tartrato cálcico transcurren simultáneamente.

5 El segundo objeto de la presente invención es proporcionar un método mejorado para producir ácido L(+)-tartárico en el que la hidrólisis del cis-epoxisuccinato cálcico en L(+)-tartrato cálcico puede realizarse con una concentración elevada del material, con un rendimiento mejor y en un período de tiempo más breve.

10 Objetos adicionales se explicarán en las descripciones que siguen.

15 Así, la presente invención se refiere a un método mejorado para producir ácido L(+)-tartárico que comprende: (1) incorporar el cis-epoxisuccinato cálcico como materia prima en el medio de cultivo; (2) incubar un microorganismo que sea capaz de hidrolizar el cis-epoxisuccinato en ácido L(+)-tartárico; y convertir así el cis-epoxisuccinato cálcico en L(+)-tartrato cálcico.

20 Una característica mejorada adicional del método comprende (1) incorporar un agente tensioactivo de tipo no iónico, en combinación con el cis-epoxisuccinato cálcico, en el medio de cultivo; (2) incubar un tal microorganismo; y (3) convertir así el cis-epoxisuccinato cálcico en el L(+)-tartrato cálcico.

25 En cuanto a los microorganismos a emplear en es .

ta invención, es empleable cualquier clase de microbio con tal que sea capaz de hidrolizar el ácido cis-epoxi succínico y formar ácido L(+)-tartárico. Por ejemplo, pueden emplearse los abajo especificados, esto es, Aci-
5 netobacter tartarogenes KB-82 (IFO 13644; FERM Nº 2854; ATCC 31105); la misma especie KB-99 (IFO 13650; FERM Nº 2860; ATCC 31111); la misma especie KB-111 (IFO 13656; FERM Nº 2866; ATCC 31117); la misma especie KB-112 (IFO 13657; FERM Nº 2867; ATCC 31118); Agrobacterium aureum
10 KB-91 (IFO 13647; FERM Nº 2857; ATCC 31108); Agrobacterium viscosum KB-105 (IFO 13652; FERM Nº 2862; ATCC 31113); Rhizobium validum KB-97 (IFO 13648; FERM Nº 2858; ATCC 31109); la misma especie KB-106 (IFO 13653; FERM Nº 2863; ATCC 31114); Pseudomonas species KB-86 (IFO 13645; FERM Nº 2855; ATCC 31106).

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

1. Propiedades taxonómicas de las cepas KB-82, KB-99, KB-111, y KB-112.
20 (a) Morfología de la célula.
 - (1) Bastoncillos esféricos, 0,8-1,0 por 1,0-1,3 micras.
 - (2) En los cultivos jóvenes se encuentran células en forma de bastoncillos cortos y grandes células irregulares. En cultivos más viejos las células son ca-
25

si esféricas.

(3) Ausencia de motilidad.

(4) No formadora de esporas.

(5) Gram-negativa.

5 (6) No resistente a los ácidos.

(b) Características del cultivo.

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

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

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

(4) Perforación de gelatina: Ausencia de licuefacción.

15 (5) Leche de tornasol: Alcalina; ausencia de peptonización.

(c) Propiedades fisiológicas.

(1) Reducción de nitratos: KB-111 y KB-112 son positivos, pero KB-82 y KB-99 son negativos en el caldo de nitrato.

20

(2) No se produce desnitrificación.

(3) Ensayo con rojo de metilo: negativo.

(4) No se produce acetilmetilcarbinol.

(5) No se produce indol.

25

(6) No se produce sulfuro de hidrógeno.

- (7) No se hidroliza el almidón.
- (8) Se utiliza citrato.
- (9) Se utilizan nitratos y sales amónicas como fuentes de nitrógeno.
- 5 (10) Acromógeno.
- (11) Se produce ureasa.
- (12) Oxidasa: positivo.
- (13) Catalasa: positivo.
- (14) Desarrollo nulo a pH 4,5 y 8,6. pH óptimo, a
10 aproximadamente 7. Desarrollo nulo a 8°C y 40°C.
Temperatura óptima, a aproximadamente 30°C.
- (15) Aerobio.
- (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidante.
- (17) Acido, pero no gas, a partir de L-arabinosa, D-
15 xilosa, y D-fructosa. Ligeramente acido, pero
no gas, a partir de D-glucosa, D-manosa, D-galac-
tosa, y glicerina. Ni ácido ni gas a partir de
maltosa, lactosa, trehalosa, D-sorbita, D-mani-
ta, inosita, y almidón.
- 20 (d) Otras propiedades taxonómicas.
- (1) Resistente a 5 unidades de penicilina.
- (2) Aislada de la tierra vegetal.
2. Propiedades taxonómicas de la cepa KB-86.
- (a) Morfología de la célula.
- (1) Bastoncillos, 0,6-0,8 por 1,5-3,0 micras.
- 25 (2) No pleomórfica.

- (3) Motilidad por flagelo monotríquico polar.
 - (4) No formadora de esporas.
 - (5) Gram-negativa.
 - (6) No resistente a los ácidos.
- 5 (b) Características del cultivo.
- (1) Placa de agar nutriente: Circular, entera, conuvexa, lisa, translúcida, blanca como la nata, brillante.
 - (2) Cultivo de agar en pico de flauta: Desarrollo
10 moderado, filiforme, liso, blanco como la nata, brillante.
 - (3) Caldo: Ligeramente turbio; ausencia de desarrollo en la superficie; sedimento.
 - (4) Perforación de gelatina: Ausencia de licuefacción.
 - (5) Leche de tornasol: Inalterada.
15
- (c) Propiedades fisiológicas.
- (1) No se reducen los nitratos en el caldo de nitrato.
 - (2) No se produce desnitrificación.
 - (3) El ensayo con rojo de metilo es negativo.
20
 - (4) No se produce acetilmetilcarbinol.
 - (5) No se produce indol.
 - (6) No se produce sulfuro de hidrógeno.
 - (7) No se hidroliza el almidón.
 - (8) Se utiliza citrato.
25

- (9) Se utilizan nitratos y sales amónicas como fuentes de nitrógeno.
- (10) No se producen pigmentos solubles en agua.
- (11) Se produce ureasa.
- 5 (12) Oxidasa: positiva.
- (13) Catalasa: positiva.
- (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
- 10 y 30°C.
- (15) Aerobio.
- (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidante.
- (17) Ácido, pero no gas, a partir de L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, D-galactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, D-sorbita, D-manita, y glicerina. Ni ácido ni gas a partir de lactosa, inosita, y almidón.
- 15
- (d) Otras propiedades taxonómicas.
- (1) No se produce fijación de nitrógeno.
- 20 (2) No son necesarios aminoácidos ni vitaminas para el desarrollo.
- (3) Aislada a partir de la tierra vegetal.
3. Propiedades taxonómicas de la cepa KB-91.
- (a) Morfología de la célula.
- 25 (1) Bastoncillos, 0,5-0,7 por 1,0-3,0 micras.

- (2) No pleomórfica.
- (3) Motilidad por uno a tres flagelos peritríquicos.
- (4) No formadora de esporas.
- 5 (5) Gram-negativa.
- (6) No resistente a los ácidos.
- (b) Características del cultivo.
- (1) Placa de agar nutriente: Circular, que se esparce, convexa, transparente, amarilla, brillante.
- 10 (2) Cultivo de agar en pico de flauta: Desarrollo moderado, que se esparce, liso, amarillo, brillante.
- (3) Caldo: Turbio; ausencia de desarrollo en la superficie; sedimento.
- 15 (4) Perforación de gelatina: Licuefacción estratiforme.
- (5) Leche de tornasol: Neutra a ligeramente alcalina sin zona de suero.
- Ausencia de peptonización. Color pardo grisáceo
- 20 después de 2 semanas.
- (c) Propiedades fisiológicas.
- (1) No se reducen los nitratos en el caldo de nitrato.
- (2) No se produce desnitrificación.
- 25 (3) Ensayo con rojo de metilo: negativo.

- (4) No se produce acetilmetilcarbinol.
- (5) No se produce indol.
- (6) No se produce sulfuro de hidrógeno.
- (7) No se hidroliza el almidón.
- 5 (8) Se utiliza citrato.
- (9) Se utilizan nitratos y sales amónicas como fuentes de nitrógeno.
- (10) Cromógeno.
- (11) Se produce ureasa.
- 10 (12) Oxidasa: positiva.
- (13) Catalasa: positiva.
- (14) Desarrollo nulo a pH 4,5 y 10,5. pH óptimo, a aproximadamente 7. Desarrollo nulo a 40°C. Desarrollo nulo a 10°C. Temperatura óptima, a aproximadamente 30°C.
- 15 (15) Aerobio.
- (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidante.
- (17) Acido, pero no gas, a partir de L-arabinosa, D-glucosa, D-mañosa, 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.
- 20
- (d) Otras propiedades taxonómicas:
- (1) Ensayo de producción de 3-cetolactosa: positivo.
- 25 (2) No son necesarios aminoácidos ni vitaminas para .

el desarrollo.

(3) Desarrollo sobre agar de glucosa-azul de anilina. No se absorbe el colorante.

(4) No se descompone la celulosa.

5

(5) Aislada a partir de la tierra vegetal.

(6) No es parásita para las plantas, de acuerdo con las comprobaciones realizadas.

4. Propiedades taxonómicas de la cepa KB-105.

(a) Morfología de la célula.

10

(1) Bastoncillos, 0,5-0,7 por 1,0-3,0 micras.

(2) No pleomórfica.

(3) Motilidad por uno a tres flagelos peritríquicos.

(4) No formadora de esporas.

(5) Gram-negativa.

15

(b) Características del cultivo.

(1) Placa de agar nutriente: Circular, entera, convexa, lisa, opaca, blanca, amarillenta, brillante.

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

20

(3) Caldo: Sedimento, película.

(4) Perforación de gelatina: Ausencia de licuefacción.

(5) Leche de tornasol: Alcalina, con zona de suero.

(c) Propiedades fisiológicas.

25

(1) No se reducen los nitratos 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.
- 5 (6) No se produce sulfuro de hidrógeno.
- (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 amónicas como fuen
10 tes de nitrógeno.
- (10) Acromógeno.
- (11) Se produce ureasa.
- (12) Oxidasa: positiva.
- (13) Catalasa: positiva.
- 15 (14) Desarrollo nulo a pH 4,5 y 10,5. pH óptimo, a
aproximadamente 7. Desarrollo nulo a 40°C. Desarro
llo 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-fructosa, D-galac
tosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, D-sorbita,
D-manita, y glicerina. Ni ácido ni gas a partir
de lactosa, inosita, y almidón.
- 25

- (d) Otras Propiedades taxonómicas.
- (1) Ensayo de producción de 3-cetolactosa: positivo.
 - (2) Son necesarias vitaminas para el desarrollo.
 - (3) Desarrollo sobre agar de glucosa-azul de anilina.
5 No se absorbe el colorante.
 - (4) Se forman colonias viscosas sobre medios de azúcar.
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 realizadas.
5. 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.
 - 15 (2) En los cultivos jóvenes, se encuentran grandes células irregulares. En cultivos más viejos, las células se han convertido en bastoncillos coccoideos.
 - (3) Ausencia de motilidad.
 - (4) No formadora de esporas.
 - 20 (5) Gram-negativa.
 - (6) No resistente a los ácidos.
- (b) Características del cultivo.
- (1) Placa de agar nutriente: Circular, entera, convexa, lisa, blanca grisácea, opaca, brillante.
 - 25 (2) Cultivo de agar en pico de flauta: Desarrollo mo-

derado, filiforme, liso, blanco grisáceo, brillante.

- 5 (3) Caldo: Ligeramente turbio; ausencia de desarrollo en la superficie; sedimento.
- (4) Perforación de gelatina: Ausencia de licuefacción.
- (5) Leche de tornasol: Ligeramente alcalina; ausencia de peptonización; ausencia de zona de suero.
- (c) Propiedades fisiológicas.
- 10 (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.
- 15 (6) No se produce sulfuro de hidrógeno.
- (7) No se hidroliza el almidón.
- (8) No se utiliza citrato.
- (9) Se utilizan nitratos y sales amónicas como fuentes de nitrógeno.
- 20 (10) Acromógeno.
- (11) Se produce ureasa.
- (12) Oxidasa: positiva.
- (13) Catalasa: positiva.
- 25 (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.

15-1-76

(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, D-sorbita, D-manita, inosita, y almidón.

5

(d) Otras propiedades taxonómicas.

10

(1) No se produce 3-cetolactosa.

(2) Desarrollo sobre medios de extracto de levadura en 3 días.

(3) Aislada a partir de nódulos de la raíz del trébol.

15

El método de la presente invención se lleva a cabo por adición de cis-epoxisuccinato cálcico al medio de cultivo, en el transcurso del procedimiento de incubación del microbio, haciendo así posible realizar las acciones simultáneas y paralelas de incubación del microbio y reacción química.

20

Después de llevar a la práctica la operación de incubación de los microbios, el medio de cultivo puede encontrarse en estado líquido o en estado sólido; pero una forma comúnmente aplicable así como más conveniente es recurrir a cultivo con sacudidas, o cultivo con agitación

25

aireado, los cuales están basados en el medio de cultivo líquido.

5 No existe limitación particular alguna ni condiciones restrictivas en la determinación del estado del medio de cultivo, esto es, que puede emplearse cualquier clase de medio de cultivo con la condición de que dicho medio de cultivo pueda acomodar dichos microbios, dejando que los mismos se desarrollen normalmente y en condiciones de seguridad, y también que el sistema de enzima que es capaz de convertir el cis-epoxisuccinato cálcico en L(+)-tartrato cálcico pueda formarse adecuadamente en aquél. Por ejemplo, como fuente de carbono, se pueden utilizar cis-epoxisuccinato cálcico, glucosa, lactosa, glicerina, sucrosa (es decir, sacarosa), melazas, ácidos orgánicos, hidrocarburos, y análogos; y como fuente de nitrógeno, pueden designarse como ejemplos hidrolizados de proteínas tales como peptona, hidrolizado de proteína, p.ej., ácido casamínico (fabricado por Difco) y N-Z.Amina (fabricada por Scheffield), junto con sustancias tales como extracto de levadura, tortas de soja, licor de maceración de maíz, aminoácidos, diversas clases de sales amónicas, diversas clases de nitratos, y otros compuestos nitrogenados orgánicos o inorgánicos, siendo todo lo anterior válidamente aplicable. Además, como las sales inorgánicas, pueden añadirse diversas clases de fosfatos, sulfato de magne

10

15

20

25

sio, cloruro sódico, y análogas, como aditivos pertinentes; y también, con el fin de estimular el desarrollo de las bacterias, se pueden añadir diversas clases de vitaminas, compuestos asociados con ácido nucleico, etc. Cualquiera que sea el método de incubación que pueda adoptarse para las ocasiones de operación real, es recomendable añadir, en el momento de iniciarse la incubación o el cultivo, cis-epoxisuccinato al medio de cultivo, incluso si se encuentra en pequeña cantidad, en el sentido de que ello es eficaz para lograr mejores resultados.

Asimismo, cuando se está disponiendo el trabajo de incubación, es preferible inocular el medio de cultivo con cierta cantidad apropiada de caldo de cultivo que puede obtenerse por medio del pre-cultivo que se ha realizado de antemano en pequeña escala.

Las condiciones de incubación, que implican la temperatura de cultivo, la duración del tiempo de cultivo, la acidez-alcalinidad de los líquidos que prevalecen en el medio de cultivo, y factores análogos, están sometidas a variación de acuerdo con la clase de microorganismos empleados, o con la composición y elementos del medio de cultivo. Sin embargo, si sólo se realizan selección y ajuste adecuados, enfocados únicamente al objetivo final de rendimientos máximos de dicho sistema de enzimas, ello

justificaría y sería suficiente para el objetivo del trabajo. En muchos casos de la práctica, se puede lograr resultado satisfactorio realizando la incubación en condiciones aerobias, a alrededor de 20-40°C, y durante 1-7 días, manteniéndose mientras tanto el medio de cultivo a alrededor de pH 5-9.

Como la materia prima de partida, el cis-epoxisuccinato cálcico puede hallarse en cualquier estado, sea sal normal, sal ácida o mezcla de las mismas; pero en el caso de emplear la materia prima que contiene una sal ácida, corrientemente es una práctica favorecida neutralizar de antemano con cloruro cálcico, carbonato cálcico y sales análogas. Es también factible un procedimiento de conversión tal como la adición de cis-epoxisuccinato sódico, cis-epoxisuccinato potásico y análogos a la mezcla de reacción que contiene el cloruro cálcico u otras sales cálcicas que sean equimolares en comparación con dichos succinatos, haciendo así posible convertir los succinatos en las sales cálcicas correspondientes.

En el caso de que la materia prima, esto es, el cis-epoxisuccinato cálcico, se añada al medio de cultivo en el curso del procedimiento de incubación, la adición se realiza generalmente bien sea antes del momento inicial de la incubación, o bien en un momento adecuado durante la incubación. En este caso, dicho material tiene que ha

llarse en forma, por ejemplo, de cristales de sal cálcica, o en caso contrario, en forma de una suspensión en un disolvente apropiado tal como agua; y dichos cristales o suspensión han de añadirse de una sola vez, o
5 continuamente a lo largo de un período de tiempo dado, o intermitentemente en intervalos regulares durante el período de incubación del microorganismo.

La cantidad total de cis-epoxisuccinato cálcico empleable durante la incubación de microorganismos
10 puede ser no inferior a 5% (peso/volumen) y es posible elevar la cantidad hasta valores tan altos como 50% (como ácido libre).

Como la realización preferida del método presente, se añade un agente tensioactivo de tipo no iónico al medio de cultivo para acortar el período de incubación y convertir el cis-epoxisuccinato cálcico en L(+)-
15 tartrato cálcico eficazmente.

En cuanto al agente tensioactivo no iónico a emplear en el método de esta invención, hay un amplio intervalo de agentes aplicables, los cuales se usan eficazmente, tales como éster graso de sorbitán (p.ej., monooleato de sorbitán, trioleato de sorbitán, y análogos); éster graso de polioxietilen-sorbitán (p.ej., monolaurato de polioxietilen-sorbitán, monooleato de polioxietilen-sorbitán, y análogos); éster graso de polioxietilen-sorbita
20
25

(p.ej., monolaurato de polioxietilen-sorbita, y análogos); éster graso de polioxietileno (p.ej., estearato de polioxietileno, laurato de polioxietileno, y análogos); polioxietilen-alcohol superior-éter (p.ej., polioxietilen-alcohol laurílico-éter, polioxietilen-alcohol oleílico-éter; polioxietilen-alcohol aril-éter (p.ej., polioxietilen-nonilfenol-éter, polioxietilen-octilfenol-éter, y análogos); éster graso de glicerilo (p.ej., monoestearato de glicerilo, y análogos); éster graso de alcoholenglicol (p.ej., monoestearato de propilenglicol, y análogos); polioxipropilen-polioxietilen-alcohol-éter (p.ej., polioxipropilen-polioxietilen-alcohol cetílico-éter, y análogos); derivado de condensación polioxietilen-alcohol-fenol-formaldehído (p.ej., resina de polioxietilen-nonilfenol-formaldehído, resina de polioxietilen-octilfenol-formaldehído, y análogos); polioxietilen-alcohol-amina o -amida (p.ej., polioxietilen-oleilamina, polioxietilen-oleilamida, y análogos); derivado de polioxietilen-lanolina; derivado de polioxietilen-alcohol lanolínico; derivado de polioxietilen-sorbita-cera de abejas; derivado de polioxietilen-aceite de ricino; polioxietilen-polialcohol; polioxipropilen-polialcohol; polioxietilen-oxipropilen-polialcohol (p.ej., etilendiamina-oxipropilen-oxietilen-tetraalcohol, y análogos); polioxietilen-alcohol tetrahidrofurfurílico; éster graso de polioxipropileno; etcétera.

En casos ordinarios, los agentes tensioacti-
vos se utilizan dentro del intervalo de concentracio-
nes de 0,05-5,0% (peso/volumen) y más preferiblemente
a alrededor de 0,05-2,0%. Y la adición de la cantidad
5 total de agentes tensioactivos puede efectuarse toda de
una vez antes de iniciarse la incubación, o fraccionada
mente en el curso de la incubación.

Como se ha descrito arriba, el L(+)-tartrato
cálcico que se ha formado en el caldo de cultivo o en
10 el medio de reacción puede recuperarse fácilmente por
medio de filtración o centrifugación.

Si bien las realizaciones preferidas del méto-
do de esta invención se muestran en los ejemplos siguien-
tes, debe interpretarse que dichos ejemplos que siguen
15 se describen únicamente para fines de ilustración, y se-
rá evidente que los métodos particularmente descritos en
los ejemplos que siguen no deben considerarse como limi-
taciones del contenido de esta invención.

20

Ejemplo 1

Cepas de especies tales como Acinetobacter tar-
tarogenes KB-82, Pseudomonas species KB-86, Agrobacterium
aureum KB-91, y Rhizobium validum KB-106, se utilizan res-
pectivamente para inocular 30 ml de un cultivo contenido
25 en un matraz de Erlenmeyer de 200 ml de capacidad, cuyo

medio está constituido por ácido casamínico (0,05%),
nitrato sódico (0,5%), hidrogenofosfato dipotásico
(0,1%), sulfato magnésico (0,05%), sulfato ferroso
(0,001%), de pH 7,0; y simultáneamente, se añaden los
5 cristales de cis-epoxisuccinato cálcico, disódico, y
dipotásico, de tal manera que la concentración final
respectiva pueda ascender a 5% en forma de cada uno de
los ácidos libres individualmente; y luego se somete la
mezcla anterior a cultivo con sacudidas y rotativo a
10 30°C durante 2 días. La separación centrífuga del pro-
ducto final, cuando el caldo de cultivo se ajusta por
adición de cis-epoxisuccinato cálcico, se lleva a cabo
después que la sal cálcica se ha solubilizado previamen-
te con ácido sulfúrico. Cuando se emplea la sal dipotá-
sica ó la sal disódica para ajustar el caldo de culti-
15 vo, el caldo de cultivo se somete a separación centríf-
ga sin ningún tratamiento preliminar. La cantidad de áci-
do L(+)-tartárico se determinó a partir del valor de la
rotación óptica a 436 mμ, mientras que el ácido cis-epo-
20 xisuccínico que quedaba sin reaccionar se determinó por
el método de Payne y Williams (G.B. Payne y P.H. Williams,
Journal of Organic Chemistry 24, 54 (1959)). Los resulta-
dos fueron los siguientes:

		<u>Acido cis-epoxisuccínico</u>					
<u>Cepas específicas</u>		<u>Sal cálcica</u>		<u>Sal sódica</u>		<u>Sal potásica</u>	
		(A)*	(B)**	(A)	(B)	(A)	(B)
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	<u>Acinetobacter</u>						
5	<u>tartarogenes</u>	90	0	10	85	9	87
	KB-82						
	<u>Pseudomonas</u>						
	<u>species</u>	55	42	3	95	4	92
10	KB-86						
	<u>Agrobacterium</u>						
	<u>aureum</u>	75	22	5	92	3	92
	KB-91						
15							
	<u>Rhizobium</u>						
	<u>validum</u>	93	0	13	83	11	85
	KB-106						

20

INDICES:

* (A): Rendimiento en moles del ácido L(+)-tartárico formado. 100% representa el caso en que la totalidad del ácido cis-epoxisuccínico se ha convertido completamente en ácido L(+)-tartárico.

25

** (B): Proporción del resto del ácido cis-epoxisuccínico tal.

como se añadió. 100% representa el caso en que 1,5 g de ácido cis-epoxisuccínico quedan como ácido libre.

Ejemplo 2

5 Una cepa de Acinetobacter tartarogenes KB-111 se usa para inocular 500 ml de un medio de cultivo contenido en un frasco Sakaguchi de 2 l de capacidad, compuesto por cis-epoxisuccinato cálcico (0,6%), sulfato amónico (0,5%), hidrogenofosfato dipotásico (0,1%), sulfato magnésico (0,05%), pH 7,0; y luego, la mezcla anterior se somete a cultivo con sacudidas alternativas a 30°C durante 24 horas, y se obtienen como resultado 500 ml de caldo de cultivo. Este caldo de cultivo se transfiere a un depósito de 50 l de capacidad que contiene 30 l de un medio de cultivo líquido compuesto de polipeptona (0,1%), sulfato amónico (0,5%), fosfato dipotásico (0,1%), sulfato magnésico (0,05%), sulfato ferroso (0,001%), glucosa (0,2%), de pH 7,0; y al mismo tiempo, se añaden 180 g de cis-epoxisuccinato cálcico. El producto resultante se somete a cultivo con agitación aireado a 30°C, y mientras tanto se añaden alrededor de 20 g de Actocol 31-56 (producto de Takeda Chemical Industry Ltd., en Japón), como agente desespumante. Cuando han transcurrido 24 horas después del comienzo del cultivo, se añaden 3 kg (calculados como ácido libre) de cis-epoxisuccinato cálcico, segui

10

15

20

25

do por cultivo adicional durante 48 horas. Alrededor de 30 l del caldo de cultivo obtenido se someten a filtración con un filtro prensa, y la parte sólida obtenida se lava con agua.

5 Se repiten la centrifugación y el lavado, y las partes sólidas obtenidas se trituran bien y se secan. Después de haber sufrido todos los tratamientos anteriores, se obtienen cristales de L(+)-tartrato cálcico que ascienden a una cantidad de 4,2 kg (como convertido en anhídrido; pureza: 99%). (Cuando se calcula por el método del Ejemplo 1(A), la tasa de rendimiento asciende a 93%).

10 A modo de contraste con el ejemplo anterior, se describe aquí otro experimento, en el cual se usa la misma especie de cepa, esto es, KB-111. En este experimento, el cultivo se lleva a cabo en idénticos términos y condiciones que el ejemplo precedente, a excepción sólo del material que se utiliza, esto es, en lugar de usar el cis-epoxisuccinato cálcico, se emplea en este último ejemplo cis-epoxisuccinato disódico de igual molaridad. Alrededor de 30 l de caldo de cultivo que se ha obtenido se filtran por medio del filtro-prensa. Mientras que se está agitando bien el filtrado, deben añadirse 3,5 kg de los cristales de cloruro cálcico (dihidratado) poco a poco; y los precipitados formados entonces se recogen por

filtración a través del filtro-prensa, lográndose así 5,8 kg de sustancia sólida. Por medio del cromatograma de capa delgada de dicha sustancia sólida, se puede observar el resto de ácido cis-epoxisuccínico (Capa
5 Delgada: Película Disponible de celulosa en cristal fino, producida por Tokyo Kasei Chemical Ind. Co, Disolvente: Eter Isopropílico-Tetrahidrofurano-Ácido Fórmico-Agua (10:10:5:4). Revelada con Verde de Bromocresol). Sobre la base de los descubrimientos anteriores,
10 se mide la cantidad de contenido de ácido L(+)-tartárico para determinación, por el método que se muestra en el Ejemplo 1, esto es, por el método de la rotación óptica. Como resultado final de lo anterior, se encuentra que la cantidad del ácido L(+)-tartárico formado es 1,3
15 kg como una sal cálcica anhidra (cuando se calcula por el método del Ejemplo 1(A), el rendimiento asciende a 30%).

Ejemplo 3

Una cepa de Acinetobacter tartarogenes KB-112
20 se usa para inocular 500 ml de cada uno de los medios de cultivo líquidos, contenidos respectivamente en dos series de frascos Sakaguchi de 2 l de capacidad, compuestos de cis-epoxisuccinato cálcico (0,6%), ácido casamínico, (0,2%), nitrato amónico (0,5%), hidrogenofosfato
25 dipotásico (0,1%), sulfato magnésico (0,05%), pH 7,0; y

esta mezcla se somete a cultivo con sacudidas alternativas a 30°C durante 30 horas, produciéndose así 1 l de caldo de cultivo. Este caldo de cultivo se transfiere a un depósito de 50 l de capacidad que contiene 30 l de medio de cultivo líquido que está compuesto de ácido casamínico (0,1%), nitrato amónico (0,5%), fosfato dipotásico (0,1%), sulfato magnésico (0,05%), de pH 7,0; y al mismo tiempo, debe añadirse cis-epoxisuccinato cálcico de tal manera que pueda convertirse en 9 kg como ácido libre. Después de la adición del succinato anterior, se lleva a cabo cultivo con agitación aireado a 30°C durante 3 días, añadiéndose mientras tanto alrededor de 20 g de Actocol 31-56 como agente desespumante poco a poco, a lo largo de todo el período de cultivo. Alrededor de 38 l del caldo de cultivo obtenido se filtran con un filtro prensa. Después de lavar, la parte sólida se suspende en 40 l de agua y se agita bien. El resultado se deja en reposo con objeto de tener la parte sólida sedimentada. Después de descartar alrededor de 25 l de la porción sobrenadante, se añaden de nuevo 25 l de agua y se agita; y el resultado se somete a filtración por medio del filtro-prensa. La sustancia sólida obtenida de lo anterior se machaca sustancialmente, se tritura, y se seca. Como resultado de todo lo anterior, se obtienen 11,9 kg de cristales de L(+)-tartrato cálcico (pureza, convertido en anhídrido: 98%).

Ejemplo 4

Una cepa de Rhizobium validum KB-97 se usa para inocular 500 ml de medio de cultivo líquido, con
tenido en un frasco Sakaguchi de 2 l de capacidad, con
5 puesto de extracto de levadura (0,5%), glucosa (0,5%),
de pH 7,0. El medio de cultivo anterior se somete a
cultivo con sacudidas alternativas a 30°C durante 24
horas; y el caldo de cultivo obtenido de lo anterior
se transfiere a un depósito de 50 l de capacidad que
10 contiene 30 l de medio de cultivo líquido que está com-
puesto de licor de maceración de maíz (0,2%), cis-epo-
xisuccinato cálcico (0,6%), sulfato amónico (0,6%), hi-
drogenofosfato dipotásico (0,1%), sulfato magnésico
(0,03%), de pH 7,0. El contenido del depósito se some-
15 te a cultivo con agitación aireado a 30°C durante 40 ho-
ras, obteniéndose así alrededor de 30 l de caldo de cul-
tivo. Una cantidad de 15 l de este caldo de cultivo se
transfiere de nuevo al depósito de 200 l de capacidad que
contiene 100 l. de medio de cultivo líquido que está com-
20 puesto de licor de maceración de maíz (0,05%), sulfato
amónico (1,0%), hidrogenofosfato dipotásico (0,1%), sul-
fato magnésico (0,05%), sulfato ferroso (0,001%), de pH
7,0; y al mismo tiempo, se añade cis-epoxisuccinato cálcico de tal modo que pueda ascender hasta 10 kg como áci-
25 do libre. Después de la adición del succinato anterior,

el contenido del depósito se somete a cultivo con agitación aireado a 30°C, añadiéndose mientras tanto alrededor de 50 g de Actocol 31-56 como agente desespumante. Este cultivo con agitación aireado debe durar 5 días; y durante dicho período de 5 días, se añaden 20 kg cada vez, expresados como ácido libre, de cis-epoxisuccinato cálcico, el primer día y el tercer día. Alrededor de 150 l del caldo de cultivo obtenido del procedimiento anterior se filtran con filtro-prensa; y después de lavar, la parte sólida se suspende en 150 l de agua. Subsiguientemente, se ejerce agitación intensa, para lograr que se sedimenten dichas partes sólidas. Se desechan alrededor de 70 l de la parte sobrenadante encima de la parte sedimentada; y de nuevo, se añaden alrededor de 70 l de agua, después de lo cual se agita bien, y se filtra a través del filtro-prensa. El rendimiento final de los cristales de L(+)-tartrato cálcico es de 64,8 kg (pureza: 99%), como anhídrido.

Ejemplo 5

Una cepa de Acinetobacter tartarogenes KB-99 se usa para inocular 30 ml de medio de cultivo líquido, contenido en el matraz Erlenmeyer de 200 ml de capacidad, compuesto de extractos de levadura (0,5%), nitrato amónico (0,5%), hidrogenofosfato dipotásico (0,1%), sulfato magnésico (0,05%), cloruro cálcico (dihidratado) (1,8%), de

pH 7,2; y en dicho caso, la cepa de 1 lote unitario pa
ra Anillo de Platino debe inocularse cada vez. Y Al mis
mo tiempo, debe añadirse la sal sódica (A) o la sal po
tásica (B) del ácido cis-epoxisuccínico, de tal modo que
5 o bien (A) o (B) puedan llegar a ser 1,5 g como ácidos
libres. El resultado de lo anterior se somete a cultivo
con sacudidas y rotativo a 30°C durante 2 días. Aparte
de lo anterior, se realiza otra etapa de cultivo dife
rente, en idénticos términos y condiciones que arriba,
10 pero con las únicas excepciones para tales realizaciones
de que (i) se utiliza un medio de cultivo modificado, en
el que se elimina el cloruro cálcico sólo del medio de
cultivo arriba descrito; y (ii) después que la cepa KB-99
se inocula en tal grado de 1 lote unitario del anillo de
15 platino, se añade la sal cálcica (C) del ácido cis-epoxi-
succínico de tal modo que pueda convertirse en 1,5 g como
ácido libre. El caldo de cultivo así obtenido se filtra
por medio de un filtro de vidrio, y se enjuaga luego con
agua; y como resultado, se recuperan los cristales de
20 L(+)-tartrato. Los L(+)-tartratos cálcicos que se obtie
nen del caldo de cultivo de A, B y C son, como anhídri
dos respectivamente, 1,7 g, 1,8 g y 1,9 g; y en cuanto
a su pureza, es común a todos ellos un valor compendi
do dentro del intervalo de 97-99%. Un tal resultado re
25 vela significativamente el hecho evidente de que, aun en

5 el caso de que se use la sal sódica o la sal potásica
del ácido epoxisuccínico como material, si sólo está
presente en el medio de cultivo el ion calcio que es
casi equivalente al ácido cis-epoxisuccínico en cuan-
to a cantidad, dicho material reaccionará fácilmente
con dicho ion, produciéndose así la sal cálcica del
ácido cis-epoxisuccínico y de aquí, puede deducirse
una consecuencia casi similar al caso en que la adi-
ción se hizo en forma de la sal cálcica inicialmente
10 desde el momento de partida.

Ejemplo 6

Una cepa de Acinetobacter tartarogenes KB-112
se usa para inocular 30 ml de medio de cultivo, conteni-
15 do en el matraz Erlenmeyer de 200 ml de capacidad, me-
dio de cultivo que se ha preparado con tal composición
que, al medio de cultivo básico que está constituido por
ácido casamínico (0,05%), nitrato amónico (0,1%), hidro-
genofosfato dipotásico (0,2%), sulfato magnésico (0,05%),
20 sulfato ferroso (0,001%), de pH 7,0, se añaden diversas
clases de agentes tensioactivos no iónicos de tal modo
que las clases respectivas de agentes tensioactivos pue-
dan llegar a la concentración de 0,1%. Y simultáneamente,
se añaden los cristales de cis-epoxisuccinato cálcico, de
25 tal modo que éste puede llegar a la concentración final

de 40% expresada como ácido libre; y la mezcla anterior se somete a cultivo con sacudidas rotativo a 30°C, y durante 2 días, y después de ello se deja que se ejerza el efecto de reacción. Una vez terminadas las reacciones, se filtra el líquido; y los cristales de filtrado obtenidos se solubilizan con ácido sulfúrico. Los cristales solubilizados se someten luego a un separador centrífugo para eliminar las sustancias sólidas. Subsiguientemente, se realizan las determinaciones cuantitativas, con respecto al ácido L(+)-tartárico, dependiendo de la rotación óptica a 436 mμ; y con respecto al ácido cis-epoxisuccínico remanente, utilizando el método de Payne y Williams (G.B. Payne y P.H. Williams: Journal of Organic Chemistry, 24, 54, (1959)). Los resultados de la determinación realizada se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

	Descripción de los Agentes tensioactivos (*1)	Rendimientos molares (%) de ácido L(+)-tartárico (*2)	Proporción de residuos (%) de ácido cis-epoxisuccínico (*3)
	NIKKOL SR-10	45	52
5	NIKKOL TO-10	72	25
	NIKKOL GS-6	50	48
	NIKKOL MYS-10	47	50
	NIKKOL BC-7	52	43
	NIKKOL NP-18TX	55	40
10	NIKKOL MGS-C	48	47
	NIKKOL PMS-SE	46	50
	NIKKOL TW-20	75	21
	NIKKOL BWA-20	74	21
	NIKKOL HCO-50	73	23
15	NIKKOL R-1020	73	21
	NIKKOL TF-4	54	42
	NIKKOL TEMS-30	70	26
	TETRONIC T-702	52	45
20	No se adicionó ninguno	34	64

LEYENDAS

(*1) Los componentes de los agentes tensioactivos utilizados aquí son como sigue:

25 SR-10: Monocoleato de sorbitán

- TO-10: Monooleato polioxietilen-sorbitán
- GS-6: Hexaestearato de polioxietilen-sorbita
- MYS-10: Estearato de polioxietileno
- BC-7: Polioxietilen-alcohol cetílico-éter
- 5 NP-18TX: Polioxietilen-nonilfenol-éter
- MGS-C: Monoestearato de glicerilo
- PMS-SE: Monoestearato de propilenglicol
- TW-20: Derivado de polioxietilen-lanolina
- BWA-20: Derivado de polioxietilen-alcohol-lanolínico
- 10 HCO-50: Derivado de polioxietilen-aceite de ricino endu-
recido
- R-1020: Resina de polioxietilen-nonilfenol-formaldehido
- TF-4: Polioxietilen-alcohol tetrahidrofurfurílico
- TPMS-30: Estearato de polioxietilen-oxipropileno
- 15 Todos los anteriores son productos fabricados
por NIKKO CHEMICALS CO., LTD.
- TETRONIC T 702: Etilendiamin-polioxipropilen-oxietilen-te
traalcohol (el producto fabricado por ASAHI
DENKA KOGYO CO.)
- 20 (*2) El valor 100% representa el caso en que el ácido cis-
epoxisuccínico se ha convertido completamente en áci-
do L(+)-tartárico.
- (*3) Proporción de residuos del ácido cis-epoxisuccínico
añadido, en los cristales; donde el valor 100% repre-
25 senta el caso en que quedan 12 g como ácido libre.

Ejemplo 7

Se utilizan respectivamente cepas de especies y números tales como Acinetobacter tartarogenes KB-82, Pseudomonas species KB-86, Agrobacterium aureum KB-91, 5 Acinetobacter tartarogenes KB-99, Agrobacterium viscosum KB-105, y Rhizobium validum KB-106, para inocular 50 ml de medio de cultivo líquido, contenido en el matraz Erlenmeyer de 200 ml de capacidad, compuesto de licor de maceración de maíz (0,2%), glucosa (0,1%), nitrato amónico 10 (0,1%), hidrogenofosfato dipotásico (0,2%), sulfato magnésico (0,05%) y sulfato ferroso (0,001%), de pH 7,0, y simultáneamente, se añade cis-epoxisuccinato cálcico de tal modo que su concentración final pueda llegar a ser 30% como ácido libre, y así se inicia la incubación. Como 15 se describe en la TABLA 2, se añaden diversas clases de agentes tensioactivos en momentos adecuados; y la mezcla se somete a cultivo con sacudidas a 30°C durante 42 horas. De los resultados del cultivo, se observa el hecho de que, con respecto a cada una de las cepas, las tasas de rendimiento 20 de ácido L(+)-tartárico muestran respectivamente valores aumentados en comparación con los casos en que se realiza una incubación exactamente semejante sin añadir cantidad alguna del agente tensioactivo.

TABLA 2

	* (1)		* (2)
Cepas	Concentración (%) de agentes tensioactivos cuando se añadieron	Tiempo de la adición	Tasa de Rendimiento (%) de ácido L(+)-tartárico
5	<u>Acinetobacter tartarogenes</u> KB-82	NONION LT-221 (0,2) No se añadió	0 - 83 59
10	<u>Pseudomonas species</u> KB-86	NONION E-215 (0,05) No se añadió	0 - 47 31
	<u>Agrobacterium aureum</u> KB-91	NONION L-4 (0,1) No se añadió	12 - 65 50
15	<u>Acinetobacter tartarogenes</u> KB-99	NIKKOL R-2030 (0,1) No se añadió	18 - 89 77
20	<u>Agrobacterium viscosum</u> KB-105 *(3)	NIKKOL GO-60TX (0,05) No se añadió	0 - 59 48
25	<u>Rhizobium validum</u> KB-106	PULRONIC L-61 (0,15) No se añadió	0 - 92 85

LEYENDAS

* (1) NINION LT-221 (Monolaurato de polioxietilen-sorbitán);
NONION E-215 (Polioxietilen-oleil-éter);
NONION L-4 (Monolaurato de polietilenglicol).

5 (Los tres productos anteriores son fabricados por
NIPPON YUSHI CO. (Japan Fats & Oils Mfg. Co. Ltd.))
NIKKOL R-2030 (Resina de polioxietilen-octilfenol-for
maldehído);

10 NIKKOL CO-60TX (Derivado de polioxietilen-aceite de
ricino).

Los dos productos anteriores son fabricados por NIKKO
CHEMICALS CO., LTD.

15 PLURONIC L-61 (Polioxietilen-oxipropilen-polialcohol)
(Este es el producto fabricado por ASAHI DENKA CO.,
LTD.)

* (2) La proporción de rendimiento molar de ácido L(+)-tar-
tárico se ha determinado por el mismo método que en el
Ejemplo 1.

20 * (3) En el caso de que se esté incubando esta cepa, se añá-
den al medio de cultivo 100 µg/ml de clorhidrato de
piridoxal.

Ejemplo 8

25 Una cepa de Rhizobium validum KB-97, junto con
una cepa de Acinetobacter tartarogenes KB-111, se usan pa

ra inocular respectivamente 500 ml de medio de cultivo, contenido en un frasco Sakaguchi de 2 l de capacidad, de tal constitución que el agente tensioactivo se añade al medio de cultivo básico que es exactamente el mismo del Ejemplo 1; y simultáneamente, se añade cis-epoxisuccinato cálcico a lo anterior de tal manera que su concentración final puede llegar a ser 50% como ácido libre. Subsiguientemente, la mezcla anterior se somete a cultivo con sacudidas alternativas a 28°C. La cantidad de ácido cis-epoxisuccínico que queda como residuo en el caldo de cultivo se determina por medio de la cromatografía en capa delgada (Capa delgada: Película disponible de celulo-
sa en cristal fino, producida por TOKYO KASEI Co.; disolvente: éter isopropílico-tetrahidrofurano-ácido fórmico-agua (10:10:5:4); revelado en color: verde de bromocresol); y a continuación de lo anterior, se continúa la incubación hasta que desaparece el ácido cis-epoxisuccínico. El tiempo transcurrido durante la reacción de conversión hasta el punto final de la reacción, junto con la tasa de rendimiento de ácido L(+)-tartárico que se forma (que se expresa en rendimiento en moles determinado por el método usado en el Ejemplo 1), se indican en la TABLA 3, en la que puede observarse el acortamiento del tiempo de reacción y el incremento en tasa de rendimiento.

25

TABLA 3

Cepas	NONION OT-221* (0,15%)		RIPONOX NCG* 0,1%)		NIKKOL HCO-80* (0,2%)		No se añadió	
	Tiempo consu- mido (h)	Tasa de rendi- mien- to (%)	Tiempo consu- mido (h)	Tasa de rendi- mien- to (%)	Tiempo consu- mido (h)	Tasa de rendi- mien- to (%)	Tiempo consu- mido (h)	Tasa de rendi- mien- to (%)
<u>Rhizo- bium validum KB-97</u>	84	89	96	89	78	92	108	85
<u>Acine- tobac- ter tarta- rogenes KB-111</u>	84	90	108	85	90	87	120	83

LEYENDAS

- * NONION OT-221: Monooleato de polioxietilen-sorbitán
(fabricado por NIPPON YUSHI CO.- Japan Fats & Oils Mfg. Co.);
- RIPONOX NCG: Polioxietilen-alcoholifenol-éter
(fabricado por LION FATS & OILS MFG. CO.)
- NIKKOL HCO-80: Derivado de polioxietilen-aceite de ricino
endurecido (fabricado por NIKKO CHEMICALS CO.).

Ejemplo 9

Se utiliza una cepa de Rhizobium validum KB-97 para

inocular 500 ml de medio de cultivo líquido que está con-
tenido en dos series de frascos Sakaguchi de 2 l de capa-
cidad y compuesto de glucosa (0,5%), licor de maceración
de maíz (1,0%), de pH 7,0; y los contenidos de los respec-
5 tivos frascos se someten a cultivo con agitación alterna-
tiva a 28°C, y durante 24 horas, obteniéndose así alrede-
dor de 1 l del caldo de cultivo. Este caldo de cultivo se
transfiere a un depósito de 50 l de capacidad que contie-
ne 30 l de medio de cultivo líquido que está compuesto de
10 licor de maceración de maíz (0,2%), nitrato amónico (0,1%),
hidrogenofosfato dipotásico (0,2%), sulfato magnésico (0,05%),
sulfato ferroso (0,001%), y NIKKOL TW-20 (0,1%), de pH 7,0;
y al mismo tiempo, se añaden 6 kg de cis-epoxisuccinato cálcico
calculados como el ácido libre; y la mezcla resultante
15 se somete a incubación a 30°C. Después que han transcurrido
19 horas desde el momento inicial de la incubación, se añaden
adicionalmente 6 kg de cis-epoxisuccinato cálcico cal-
culados como el ácido libre; y la mezcla se somete a incu-
bación continuada hasta el momento en que han transcurrido
20 en total 48 horas ininterrumpidas desde el momento del co-
mienzo de la incubación. Las series de tratamientos subsi-
guientes son tales que alrededor de 40 l del caldo de cul-
tivo obtenido se filtran por medio del filtro-prensa; la
parte sólida se enjuaga con agua; y se suspende en 30 l
25 de agua, suspensión ésta que se agita a fondo; después del

tiempo de referencia para esperar la precipitación de la parte sólida, se desechan 20 l de la parte sobrenadante; se añaden de nuevo 20 l de agua y se agita bien; y el resultado se filtra en un filtro-prensa, obteniéndose finalmente los cristales de L(+)-tartrato cálcico. La cantidad de estos cristales es 15,9 kg (pureza: 98%) como anhídrido.

A modo de contraste con el ejemplo anterior, se describe aquí otro experimento, en el que se usa la misma cepa KB-97. En este experimento, el cultivo y la reacción se realizan en idénticos términos y condiciones que en el ejemplo anterior, a excepción únicamente de que se elimina solo el producto NIKKOL TW-20 (agente tensioactivo) del medio de cultivo utilizado en el ejemplo precedente. Alrededor de 40 l del caldo de cultivo que se obtiene de lo que antecede se purifican por un método exactamente igual al de arriba. En los cristales obtenidos por la purificación anterior, se confirma que el residuo de cis-epoxisuccinato cálcico existe realmente cuando se ensaya por medio de la cromatografía en capa delgada (realizada en cumplimiento con el método utilizado en el Ejemplo 8); y por tanto, el contenido de ácido L(+)-tartárico se somete a determinación cuantitativa por el método del Ejemplo 6. Como resultado, se encuentra que la cantidad de rendimiento del L(+)-tartrato cálcico es equivalente

a 12,3 kg como el anhídrido.

La presente solicitud, que corresponde a las presentadas en Japón, el 31 de Enero de 1975, bajo el número 13737/75 y el 7 de Mayo de 1975, Nº 54957/75, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto de la Propiedad Industrial.

10

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Un método mejorado para producir ácido L(+)-tartárico en un método para la preparación de ácido tartárico por hidrólisis microbiológica del ácido epoxisuccínico, que comprende: (1) incorporar el cis-epoxisuccinato cálcico como materia prima en el medio de cultivo; (2) incubar un microorganismo que es capaz de hidrolizar el ácido cis-epoxisuccínico a ácido L(+)-tartárico; y (3) convertir así el cis-epoxisuccinato cálcico en L(+)-tartrato cálcico.

20

2ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la cantidad final del cis-epoxisuccinato cálcico

25

cico empleada en el medio no es menor que 5 por ciento (peso/volumen) del medio.

5 3ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la cantidad final del cis-epoxisuccinato cálcico empleada en el medio no es menor que 30% (peso/volumen) del medio.

4ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que se incorpora un agente tensioactivo de tipo no iónico en el medio de cultivo.

10 5ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el agente tensioactivo de tipo no iónico es uno seleccionado del grupo constituido por éster graso de sorbitán, éster graso de polioxietilen-sorbitán, éster graso de polioxietileno, polioxietilen-alcohol superior-éter, polioxietilen-alcoholaril-éter, éster graso de glicerina, éster graso de alcoholenglicol, polioxipropilen-polioxietilen-alcohol-éter, derivado de condensación polioxietilen-alcoholfenol-formaldehído, polioxietilen-alcoholamina o -amida, derivado de polioxietilen-lanolina, derivado de polioxietilen-alcohol lanolínico, derivado de polioxietilen-sorbita-cera de abejas, derivado de polioxietilen-aceite de ricino, polioxietilen-polialcohol, polioxipropilen-polialcohol, polioxietilen-oxipropilen-polialcohol, polioxietilen-alcohol tetrahidrofurfurílico, y éster graso de polioxipropileno.

15

20

25

6ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la concentración de agente tensioactivo de tipo no iónico es 0,05-5,0% (peso/volumen).

5 7ª.- Un método mejorado para producir ácido L(+)-tartárico.


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

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

Madrid,

23 ENE. 1976

P.A.

Alberto de Cárdenas
Por Pedig. 

15-1-76

PNG.