



ESPAÑA

19 ES	11 21	NUMERO 447.641	10 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION 6-5-1976	

P.- 62.956

Case F-2243 B

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
54956/75	7-5-75	
54957/75	7-5-75	Japón
78124/75	23-6-75	
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA
54 TITULO DE LA INVENCION "UN METODO PERFECCIONADO PARA PRODUCIR ACIDO L(+)-TARTARICO" 24 FEB. 1977		
71 SOLICITANTE (S) TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka, Japón		
72 INVENTOR (ES) Yoshio Kamatani, Hisayoshi Okazaki, Ko Imai, Noriaki Fujita, Yoshio Yamazaki y Katsuhiko Ogino		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		

P.-62.956

1                   La presente invención relacionada con la de la  
solicitud de patente española 444576 de la firma solicitante se refiere a un procedimiento para producir ácido tartárico hidrolizando microbiológicamente el ácido epoxisuccínico, particularmente a un método para producir ácido L(+)-tartárico, que comprende usar como materia prima cis-epoxisuccinato cálcico cuyo tamaño medio de partícula no es mayor de 100 micras, y que tiene L(+)-tartrato cálcico formado con él.

5  
10                   Los autores de la presente invención descubrieron previamente un microorganismo que es capaz de producir ácido L(+)-tartárico hidrolizando microbiológicamente ácido cis-epoxisuccínico, y completaron por ello un método cualificado como consistentemente adecuado para manufacturar industrialmente ácido L(+)-tartárico, y con la cual invención la solicitante presentó, las solicitudes de patentes españolas 444.374 y 444.576. En el curso de desarrollo de estos métodos, los autores de la presente invención han hallado un hecho nuevo, tal que, al usar el cis-epoxisuccinato cálcico como materia prima, el diámetro de partícula del cristal de dicho material tiene una influencia significativa sobre la velocidad de formación, así como los rendimientos, de ácido L(+)-tartárico. Dicho de otra forma, en el caso de que la velocidad de formación esté a bajo nivel, una parte del ácido tartárico, una vez formado, tiende a descomponerse, y por tanto se hace difícil ganar rendimientos más allá de una velocidad definida estancada. Por tanto, para que el ácido L(+)-tartárico se manufacture en alta concentración, con rendimientos elevados, y en un periodo de tiempo relativamente corto, la velocidad de formación

15  
20  
25  
30

1 de ácido L(+)-tartárico constituye un problema extremadamen  
te importante. El hecho de que la velocidad de formación es  
té a alto nivel, en el trabajo real, conduce directamente  
en esa magnitud a unos resultados económicamente ventajosos.  
5 Es conocimiento general que la velocidad de formación de  
ácido L(+)-tartárico está influida por factores tales como  
la actividad de los microorganismos usados, medio de culti  
vo, condiciones de incubación, y otras fases diversas. Sin  
embargo, el efecto del tamaño de partícula del cis-epoxisuc  
10 cinato cálcico de partida tiene gran magnitud de importancia  
entre los diversos factores antes mencionados.

Ejemplos concretos de este efecto de dicho tamaño  
de partícula se ilustrarán más adelante en las realizacio  
nes preferidas de la invención. En cualquiera de los casos  
15 ilustrados en las realizaciones se observa el hecho de que,  
si el diámetro medio de partícula del cristal de cis-epoxi  
succinato cálcico excede de 100 micras, la velocidad de for  
mación de ácido L(+)-tartárico se reduce conspicuamente, y  
también que se retarda la fermentación. Por tanto, el que  
20 el diámetro medio de partícula de los cristales de cis-epoxi  
succinato cálcico ascienda a no más de 100 micras, y que  
preferiblemente sea 70 micras o menos, es esencial y deci  
didamente ventajoso para la producción industrial de ácido  
L(+)-tartárico. El término "diámetro medio de partícula",  
25 tal como aquí se usa, se refiere al diámetro medio de par  
tícula en peso. Lo que es preferible para emplear aquí como  
materia prima cualificada es un estado o fase tal que el  
diámetro medio de partícula de "90% o más en peso", de las  
partículas dadas, esté distribuido en menos del doble del  
30 diámetro medio de partícula.

1                    Como segundo perfeccionamiento al método para pro  
ducir ácido L(+)-tartárico, los autores de la presente in-  
vención han hallado que al usar cis-epoxisuccinato cálcico  
como materia prima, si hay un tensioactivo de tipo no ióni-  
5                    co presente en el medio de cultivo se reduce más notablen-  
te el periodo de fermentación, y el cis-epoxisuccinato cálcico de alta concentración se puede convertir en L(+)-tartrato cálcico con gran eficacia.

10                    En base a los anteriores hallazgos se han hecho  
más esfuerzos de investigación, culminando finalmente al  
completar la presente invención.

15                    Así, el objeto principal de la presente invención  
es proporcionar un método mejorado para producir ácido L(+)-  
tartárico, en el que transcurren simultáneamente la incuba-  
ción de microorganismos y la hidrólisis de cis-epoxisuccina-  
to cálcico a L(+)-tartrato cálcico.

20                    El segundo objeto de la presente invención es pro-  
porcionar un método perfeccionado para producir ácido L(+)-  
tartárico, en el que la hidrólisis de cis-epoxisuccinato cálcico a L(+)-tartrato cálcico se puede efectuar a gran concentración del material, con mejor rendimiento y en un periodo más corto.

                    Otros objetos se explicarán en las descripciones  
siguientes.

25                    Así, la presente invención se refiere a un método  
mejorado para producir ácido L(+)-tartárico, que comprende:  
(1) incorporar como materia prima el cis-epoxisuccinato cálcico cuyo diámetro medio de partícula no es mayor de 100 micras, en el medio de cultivo; (2) incubar un microorganis-  
30                    mo que sea capaz de hidrolizar cis-epoxisuccinato a ácido

1 L(+)-tartárico; y convertir así el cis-epoxisuccinato cálcico en L(+)-tartrato cálcico.

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

10 En cuanto a los microorganismos a emplear en la presente invención, se puede emplear cualquier clase de microbio siempre que sea capaz de hidrolizar ácido cis-epoxisuccínico y de formar ácido L(+)-tartárico. Por ejemplo, se pueden emplear los enumerados a continuación, es decir, Acinetobacter tartarogenes KB-82 (IFO 13644; Ferm-P No.2854; ATCC 31105); la misma especie KB-99 (IFO 13650; Ferm-P No. 2860; ATCC 31111); la misma especie KB-111 (IFO 13656; Ferm-P No. 2866; ATCC 31117); la misma especie KB-112 (IFO 13657; Ferm-P No. 2867; ATCC 31118); Agrobacterium aureum KB-91 (IFO 13647; Ferm-P No.2857; ATCC 31108); Agrobacterium viscosum KB-105 (IFO 13652; Ferm-P No. 2862; ATCC 31113); Rhizobium validum KB-97 (IFO 13648; Ferm-P No. 2858; ATCC 31109); la misma especie KB-106 (IFO 13653; Ferm-P No.2863; ATCC 31114); Pseudomonas species KB-86 (IFO 13645; Ferm-P No.2855; ATCC 31106).

25 Se describen a continuación los detalles de las características bacteriológicas de estos microbios:

1. Propiedades taxonómicas de las cepas KB-82, KB-99, KB-111 y KB-112.

(a) Morfología de las células

30 (1) Varillas esféricas, 0,8-1,0 por 1,0-1,3  $\mu\text{m}$ .

- 1 (2) En los cultivos jóvenes se hallan células de  
varilla corta y grandes células irregulares.  
En los cultivos más viejos las células son ca-  
si esféricas.
- 5 (3) No mótiles.  
(4) No forman esporas.  
(5) Gram-negativas.  
(6) Sin resistencia a ácidos.
- (b) Características de cultivo.
- 10 (1) Placa de agar nutriente: circular, entero, con  
vexo, liso, blanco grisáceo, opaco, brillante.  
(2) Agar inclinado: crecimiento moderado, filiforme,  
liso, blanco grisáceo, brillante.  
(3) Caldo: ligeramente turbio; sin crecimiento su-  
perficial; sedimento.
- 15 (4) Gelatina perforada: sin licuación.  
(5) Leche de tornasol: alcalino; sin peptonización.
- (c) Propiedades fisiológicas.
- 20 (1) Reducción de nitrato: KB-111 y KB-112 son posi-  
tivas, pero KB-82 y KB-99 son negativas en cal-  
do de nitrato.  
(2) No hay desnitrificación.  
(3) Ensayo con rojo de metilo: negativo.  
(4) No se produce acetilmetilcarbinol.
- 25 (5) No se produce indol.  
(6) No se produce sulfuro de hidrógeno.  
(7) No se hidroliza el almidón.  
(8) Se utiliza citrato.  
(9) Se utilizan los nitratos y sales amónicas como
- 30 fuentes de nitrógeno.

- 1 (10) acromógenas  
(11) Se produce ureasa  
(12) Oxidasa: positiva.  
(13) Catalasa: positiva.
- 5 (14) No hay crecimiento a pH 4,5 ni 8,6. pH óptimo a aproximadamente 7. No hay crecimiento a 8°C ni 40°C. Temperatura óptima a aproximadamente 30°C.
- (15) Aerobias
- 10 (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidantes.  
(17) Acido, pero no gas, de L-arabinosa, D-xilosa y D-fructosa. Ligeramente ácido, pero no gas, de D-glucosa, D-mannosa, D-galactosa y glicerina. Ni ácido ni gas de maltosa, lactosa, trehalosa, D-sorbita, D-mannita, inosita y almidón.
- 15 (d) Otras propiedades taxonómicas.  
(1) Resistentes a 5 unidades de penicilina.  
(2) Aisladas de la tierra.
2. Propiedades taxonómicas de la cepa KB-86.
- 20 (a) Morfología de las células.  
(1) Varillas, 0,6-0,8 por 1,5-3,0 µm.  
(2) No pleomórficas.  
(3) Móviles por flagelo monótrico polar.  
(4) No forman esporas.
- 25 (5) Gram-negativas.  
(6) Sin resistencia a ácidos
- (b) Características de cultivo.  
(1) Placa de agar nutriente: circular, entero, convexo, liso, translúcido, blanco cremoso, brillante.
- 30

- 1 (2) Agar inclinado: crecimiento moderado, filiforme, liso, blanco cremoso, brillante.
- (3) Caldo: ligeramente turbio; sin crecimiento superficial; sedimento.
- 5 (4) Gelatina perforada: sin licuación.
- (5) Leche de tornasol: sin cambio.
- (c) Propiedades fisiológicas.
- (1) No se reducen los nitratos en caldo de nitrato.
- (2) No hay desnitrificación.
- 10 (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.
- (7) No se hidroliza el almidón.
- 15 (8) Se utiliza el citrato.
- (9) Se utilizan los nitratos y sales amónicas como fuentes de nitrógeno.
- (10) No se producen pigmentos solubles en agua.
- (11) Se produce ureasa.
- 20 (12) Oxidasa: positiva.
- (13) Catalasa: positiva.
- (14) No hay crecimiento a pH 6,0 ni 10,5. pH óptimo a aproximadamente 7. No hay crecimiento a 40°C. Crecimiento a 10°C. Temperatura óptima entre 25°C y 30°C.
- 25 (15) Aerobia.
- (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidantes.
- (17) Ácido, pero no gas, de L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-mannosa, D-fructosa, D-galactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, D-sorbita, D-manni-
- 30

- 1 ta y glicerina. Ni ácido ni gas de lactosa, inosi-  
ta y almidón.
- (d) Otras propiedades taxonómicas.
- 5 (1) No hay fijación de nitrógeno.  
(2) No se necesitan aminoácidos ni vitaminas para el  
crecimiento.  
(3) Aislada de la tierra.
3. Propiedades taxonómicas de la cepa KB-91.
- (a) Morfología de las células.
- 10 (1) Varillas, 0,5-0,7 por 1,0-3,0  $\mu$ m.  
(2) No pleomórficas.  
(3) Móviles por uno a tres flagelos peritricos.  
(4) No forman esporas.  
(5) Gram-negativas.  
15 (6) Sin resistencia a ácidos.
- (b) Características de cultivo.
- (1) Placa de agar nutriente: circular, se extiende, con  
vexo, transparente, amarillo, brillante.  
(2) Agar inclinado: crecimiento moderado, se extiende,  
20 liso, amarillo, brillante.  
(3) Caldo: turbio; sin crecimiento superficial; sedimen-  
to.  
(4) Gelatina perforada: licuación estratiforme.  
(5) Leche de tornasol: neutro a ligeramente alcalino  
25 sin zona de suero.  
Sin peptonización. Color marrón grisáceo tras 2  
semanas.
- (c) Propiedades fisiológicas.
- 30 (1) No se reducen los nitratos en caldo de nitrato.  
(2) No hay desnitrificación.

- 1 (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 el citrato.  
(9) Se utilizan los nitratos y sales amónicas como fuentes de nitrógeno.
- (10) Cromógena.
- 10 (11) Se produce ureasa.  
(12) Oxidasa: positiva.  
(13) Catalasa: positiva.  
(14) No hay crecimiento a pH 4,5 ni 10,5. pH óptimo a aproximadamente 7. No hay crecimiento a 40°C. Crecimiento a 10°C. Temperatura óptima a aproximadamente 30°C.
- 15 (15) Aerobia.  
(16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidante.
- 20 (17) Acido, pero no gas, de L-arabinosa, D-glucosa, D-mannosa, D-fructosa, D-galactosa, lactosa, trehalosa, D-sorbita, D-mannita, inosita. Ni ácido ni gas de D-xilosa, maltosa, sacarosa, glicerina y almidón.
- (d) Otras propiedades taxonómicas.
- 25 (1) Ensayo de producción de 3-cetolactosa: positivo.  
(2) No se necesitan aminoácidos ni vitaminas para el crecimiento.  
(3) Crecimiento en agar de glucosa con azul de anilina. No se absorbe el colorante.
- 30 (4) No se descompone la celulosa.

- 1 (5) Aislada de la tierra.  
(6) No parásita de las plantas, según se comprobó.
4. Propiedades taxonómicas de la cepa KB-105.
- (a) Morfología de las células.
- 5 (1) Varillas, 0,5-0,7 por 1,0-3,0  $\mu$ m.  
(2) No pleomórficas.  
(3) Móviles por uno a tres flagelos peritricos.  
(4) No forman esporas.  
(5) Gram-negativas.
- 10 (b) Características de cultivo.
- (1) Placa de agar nutriente: circular, entero, convexo, liso, opaco, blanco amarillento, brillante.  
(2) Agar inclinado: crecimiento moderado, filiforme, blanco amarillento, brillante.
- 15 (3) Caldo: sedimento, película.  
(4) Gelatina perforada: sin licuación.  
(5) Leche de tornasol: alcalino con zona de suero.
- (c) Propiedades fisiológicas.
- (1) No se reducen los nitratos en caldo de nitrato.
- 20 (2) No hay 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) Se utiliza el citrato en el medio de Christensen, pero no en el medio de Koser.  
(9) Se utilizan los nitratos y sales amónicas como fuentes de nitrógeno.
- 30 (10) Acromógena.

- 1 (11) Se produce ureasa.
- (12) Oxidasa: positiva.
- (13) Catalasa: positiva.
- 5 (14) No hay crecimiento a pH 4,5 ni 10,5. pH óptimo a aproximadamente 7. No hay crecimiento a 40°C. Crecimiento a 10°C. Temperatura óptima a aproximadamente 30°C.
- (15) Aerobia.
- (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidante.
- 10 (17) Acido, pero no gas, de L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-mannosa, D-fructosa, D-galactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, D-sorbita, D-mannita y glicerina. Ni ácido ni gas de lactosa, inosita y almidón.
- 15 (d) Otras propiedades taxonómicas.
- (1) Ensayo de producción de 3-cetolactosa: positivo.
- (2) Se necesita vitamina para el crecimiento.
- (3) Crecimiento en agar de glucosa con azul de anilina. No se absorbe el colorante.
- 20 (4) Se forman colonias viscosas sobre medios con azúcar.
- (5) No se descompone la celulosa.
- (6) Aislada de la tierra.
- (7) No parásita de las plantas, según se comprobó.
- 25 5. Propiedades taxonómicas de las cepas KB-97 y KB-106.
- (a) Morfología de las células.
- (1) Varillas cortas, 0,8-1,0 por 1,0-1,5  $\mu\text{m}$ .
- (2) En los cultivos jóvenes se hallan grandes células irregulares.
- 30 En los cultivos más viejos las células se convier

1

ten en varillas cocoides.

(3) No móviles.

(4) No forman esporas.

(5) Gram-negativas.

5

(6) Sin resistencia a los ácidos.

(b) Características de cultivo.

(1) Placa de agar nutriente: circular, entero, convexo, liso, blanco grisáceo, opaco, brillante.

10

(2) Agar inclinado: crecimiento moderado, filiforme, liso, blanco grisáceo, brillante.

(3) Caldo: ligeramente turbio; sin crecimiento superficial; sedimento.

(4) Gelatina perforada: sin licuación.

15

(5) Leche de tornasol: ligeramente alcalino; sin peptonización; sin zona de suero.

(c) Propiedades fisiológicas.

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

(2) No hay desnitrificación.

20

(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.

25

(8) No se utiliza el citrato.

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

(10) Acromógenas.

(11) Se produce ureasa.

30

(12) Oxidasa: positiva.

- 1 (13) Catalasa: positiva.
- (14) No hay crecimiento a pH 4,5 ni 8,6. pH óptimo a aproximadamente 7. No hay crecimiento a 40°C. Crecimiento a 10°C. Temperatura óptima a aproximadamente 30°C.
- 5 (15) Aerobias.
- (16) Ensayo de Hugh y Leifson: oxidante.
- (17) Ácido, pero no gas, de L-arabinosa y D-fructosa. Ligeramente ácido, pero no gas, de D-xilosa, D-glucosa, D-mannosa, D-galactosa y glicerina. Ni ácido ni gas de maltosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, D-sorbita, D-mannita, inosita y almidón.
- 10 (d) Otras propiedades taxonómicas.
- 15 (1) No se produce 3-cetolactosa.
- (2) Crecimiento en medios con extracto de levadura dentro de 3 días.
- (3) Aislada de nódulos de raíz de trébol.
- 20 El método de la presente invención se efectúa añadiendo cis-epoxisuccinato cálcico al medio de cultivo, en el curso del procedimiento de incubación con microbios, haciendo así posible que se efectúen las acciones simultáneas y paralelas de incubación de microbios y reacción química.
- 25 Al practicar el trabajo de incubación de los microbios, el medio de cultivo puede estar en estado líquido o estado sólido; pero la manera comúnmente aplicable, así como más conveniente, es recurrir a cultivo con agitación por sacudidas, o cultivo con agitación aireado, que están basados en un medio de cultivo líquido.
- 30 No hay limitación concreta ni condiciones restringidas.

1        tivas para determinar el estado del medio de cultivo, es  
      decir, se puede emplear cualquier clase de medio de culti-  
      vo en la medida en que el medio de cultivo pueda acomodar  
      a dichos microbios, permitiéndoles crecer normalmente y con  
5        seguridad, y también que el sistema enzimático que es capaz  
      de convertir el cis-epoxisuccinato cálcico en L(+)-tartrato  
      cálcico se pueda formar apropiadamente en él. Por ejemplo,  
      como fuente de carbono se pueden usar cis-epoxisuccinato  
      cálcico, glucosa, lactosa, glicerina, sacarosa (es decir,  
10        sucrosa), melazas, ácidos orgánicos, hidrocarburos y simila-  
      res; y como fuente de nitrógeno se pueden designar como  
      ejemplos los hidrolizados de proteína tales como peptona,  
      hidrolizado de proteína, p.ej. ácido casamínico (manufactu-  
      rado por Difco) y N-Z. Amina (manufacturada por Scheffield),  
15        junto con sustancias tales como extracto de levadura, tor-  
      tas de haba de soja, líquido de maceración de grano, amino-  
      ácidos, diversas clases de sales amónicas, diversas clases  
      de nitratos, y otros compuestos de nitrógeno orgánico o inor-  
      gánico, siendo todos los anteriores válidamente aplicables.  
20        Además, como sales inorgánicas se pueden añadir como aditi-  
      vos pertinentes diversas clases de fosfatos, sulfato de mag-  
      nesio, cloruro sódico y similares; y también, para fines de  
      fomentar el crecimiento de las bacterias, se pueden añadir  
      diversas clases de vitaminas, compuestos asociados con áci-  
25        do nucleico, etc. Sea cual sea el método de incubación que  
      se pueda adoptar para las ocasiones reales de trabajo, es  
      recomendable añadir en el momento de iniciar la incubación  
      o el cultivo cis-epoxisuccinato al medio de cultivo, aunque  
      sea en pequeña cantidad, ya que es eficaz para producir me-  
30        jores resultados.

1 De nuevo, cuando se empieza el trabajo de incu-  
bación es preferible inocular el medio de cultivo con algu-  
na cantidad apropiada de caldo de cultivo, que se puede ob-  
tener por un cultivo previo que se ha realizado de antemano  
5 a pequeña escala.

Las condiciones de incubación, que implican la  
temperatura de cultivo, duración del tiempo de cultivo, aci-  
dez-alcalinidad de los líquidos prevalente en el medio de  
cultivo, y factores similares, están sujetas a variación se-  
10 gún la clase de microorganismos empleados o la composición  
y elementos del medio de cultivo. Sin embargo, si solo se  
hacen una selección y ajuste adecuados simplemente tenien-  
do como objetivo final los máximos rendimientos de dicho sis-  
tema enzimático, ello justificaría y bastaría para el obje-  
15 tivo del trabajo. En muchos casos de práctica se pueden ob-  
tener buenos resultados haciendo la incubación bajo condi-  
ciones aerobias, a alrededor de 20-40°C y durante 1-7 días,  
mientras se mantiene el medio de cultivo a alrededor de un  
pH 5-9.

20 Como materia prima de partida, el cis-epoxisuccin-  
ato cálcico puede estar en cualquier estado de sal normal,  
sal ácida o mezcla de ellas; pero en el caso de emplear una  
materia prima que contenga una sal ácida, es práctica común-  
mente favorecida el neutralizar de antemano con cloruro cálc-  
25 cico, carbonato cálcico y similares. Es también factible un  
procedimiento de conversión en el que se añadan cis-epoxisuc-  
cinato sódico, cis-epoxisuccinato potásico y similares a la  
mezcla de reacción que contiene el cloruro cálcico u otras  
sales cálcicas, que sean equimolares en comparación con di-  
30 chos succinatos, haciendo así posible el convertir los suc-

1 cinatos en las correspondientes sales cálcicas.

En la ocasión en que la materia prima, es decir, cis-epoxisuccinato cálcico, se añade al medio de cultivo en el curso del procedimiento de incubación, la adición se  
5 , efectúa generalmente antes del momento de iniciación de la incubación o en un momento adecuado durante la incubación. En este caso se ha de dar a dicho material la forma de, por ejemplo, cristales de sal cálcica, o bien la forma de una suspensión en un disolvente apropiado tal como agua; y dichos  
10 cristales o suspensión se han de añadir todo de una vez, o continuamente durante un periodo de tiempo dado, o intermitentemente a intervalos regulares durante el periodo de incubación del microorganismo.

La cantidad total de cis-epoxisuccinato cálcico  
15 que se puede emplear durante la incubación de microorganismos puede ser no menor de 5% (peso/volumen), o incluso no menor de 30%, y se puede elevar la cantidad hasta tanto como 50% (como ácido libre).

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

En cuanto al tensioactivo no iónico a emplear en  
25 el método de la presente invención, hay una amplia gama de ellos aplicables que se usan eficazmente, tales como éster graso de sorbitán (p.ej. monooleato de sorbitán, trioleato de sorbitán y similares); éster graso de polioxietilensorbitán (p.ej. monolaurato de polioxietilensorbitán, monoolca  
30 to de polioxietilensorbitán y similares); éster graso de po

- 1 lioxietilensorbita (p.ej. monolaurato de polioxietilensorbita y similares); éster graso de polioxietileno (p.ej. estearato de polioxietileno, laurato de polioxietileno y similares); éter polioxietilénico de alcohol superior (p.ej.
- 5 éter polioxietilénico de alcohol laurílico, éter polioxietilénico de alcohol olefílico); éter polioxietilen-alcohol-arílico (p.ej. éter polioxietilénico de nonilfenol, éter polioxietilénico de octilfenol y similares); éster graso de glicerina (p.ej. monoestearato de glicerilo y similares); éster graso de alcoholenglicol (p.ej. monoestearato de propilenglicol y similares); éter polioxipropilen-polioxietilen-alcohílico (p.ej. éter polioxipropilen-polioxietilénico de alcohol cetílico y similares); derivado de condensación de polioxietilen-alcohol-fenol-formaldehído (p.ej. resina de polioxietilen-nonilfenol-formaldehído, resina de polioxietilen-octilfenol-formaldehído y similares); polioxietilen-alcoholamina o amida (p.ej. polioxietilen-oleilamina, polioxietilen-oleilamida y similares); derivado polioxietilénico de lanolina; derivado polioxietilénico de alcohol de lanolina;
- 20 derivado de polioxietilensorbita de cera de abejas; derivado polioxietilénico de aceite de ricino; polioxietilen-poliol; polioxipropilen-poliol; polioxietilen-oxipropilen-poliol (p.ej. etilendiamin-polioxipropilen-oxietilentetrol y similares); alcohol polioxietilen-tetrahidrofurfurílico; éster graso de polioxipropileno; o similares.
- 25

En los casos ordinarios, los agentes tensioactivos se usan dentro del intervalo de concentración de 0,05-5,0% (peso/volumen), y más preferiblemente alrededor de 0,05-2,0%. Y la adición de la cantidad total de agentes tensioactivos se puede efectuar toda de una vez antes de empe-

30

1       zar la incubación, o fraccionadamente en el curso de la incubación.

5       Como se ha descrito antes, el L(+)-tartrato cálcico que se ha formado en el caldo de cultivo o en el medio de reacción se puede recuperar fácilmente mediante filtración o centrifugación.

El cis-epoxisuccinato cálcico de partida se prepara a partir de ácido maleico de la manera siguiente.

10       Así, una solución acuosa o suspensión acuosa que contiene un compuesto cálcico y ácido maleico, en proporción de 0,4 a 0,6 átomos-gramo de calcio por mol de ácido maleico, se hace reaccionar con peróxido de hidrógeno en presencia de un catalizador de epoxidación, y se le añade una cantidad adicional y suficiente de un compuesto cálcico para dejar disponible un total de aproximadamente un átomo-gramo de compuesto cálcico, como calcio, por mol de ácido maleico de partida, a una temperatura que no exceda de 40 grados centígrados, con lo que se permite que se separe cis-epoxisuccinato cálcico como cristales que tienen un diámetro medio de partícula no mayor de 100 micras.

15       Como dicho ácido maleico se puede emplear cualquiera de ácido maleico o anhídrido maleico. Como dicho compuesto cálcico se puede hacer uso de compuestos tales como óxido cálcico, hidróxido cálcico, carbonato cálcico, acetato cálcico, nitrato cálcico, formiato cálcico, etc.

20       La proporción de tal compuesto cálcico a añadir por mol de ácido maleico ha de estar comprendida entre 0,4 y 0,6 átomos-gramo como calcio. En el caso de que la cantidad de calcio sea menor que 0,4 átomos-gramo se hallará que, si se forma ácido cis-epoxisuccínico en la reacción de epo-

1 oxidación, la velocidad de formación es baja y el ácido cis-  
epoxisuccínico producido es susceptible de experimentar hi-  
drólisis, conduciendo ambos fenómenos a un rendimiento fi-  
nal reducido de cis-epoxisuccinato cálcico. Además, el pro-  
5 ducto estará contaminado con DL-tartrato cálcico. Esto tie-  
ne como resultado la desventaja de que cuando el cis-epoxi-  
succinato cálcico resultante se convierte microbianamente en  
ácido L(+)-tartárico, el producto está contaminado con áci-  
do DL-tartárico. A la inversa, si la proporción de calcio es  
10 tá en exceso de 0,6 átomos-gramo, se separará cis-epoxisucci-  
nato cálcico en la reacción de epoxidación, pero las partí-  
culas cristalinas así obtenidas tendrán un diámetro medio  
grande, no cumpliendo así con el objeto de obtener cristales  
con pequeños diámetros de partícula.

15 El pH, tras la adición de dicho compuesto cálcico,  
es deseablemente menor que pH 4.

Como dicho catalizador de epoxidación se puede ha-  
cer uso de ácido wolfrámico, ácido molibdico, heteropoliáci-  
dos de wolframio o molibdeno, o sales de tales ácidos. Se  
20 pueden emplear también los catalizadores que se pueden obte-  
ner soportando cualquiera de tales ácidos o sales sobre un  
soporte inerte para la reacción.

La cantidad de tal catalizador está preferiblemente  
dentro del intervalo de 0,001 a 0,05 átomos-gramo y, para  
25 resultados aún mejores, dentro del intervalo de 0,002 a 0,02  
átomos-gramo, como wolframio o molibdeno, por mol de ácido  
maleico. Para fines prácticos, la proporción óptima se puede  
elegir según la proporción molar entre ácido maleico y peró-  
xido de hidrógeno, la temperatura de reacción, etc.

30 La cantidad apropiada de peróxido de hidrógeno var

1 mol de ácido maleico está en algún punto entre 0,8 moles y  
1,1 moles. El peróxido de hidrógeno se puede usar general-  
mente como solución acuosa. Aunque el ácido maleico se epo-  
xidará casi completamente con una cantidad sustancialmente  
5 equimolar de peróxido de hidrógeno, en relación al ácido ma-  
leico, la epoxidación completa se puede conseguir usando pe-  
roxido de hidrógeno en ligero exceso frente al ácido malei-  
co. Si la proporción molar de peróxido de hidrógeno es me-  
nor que la de ácido maleico, las aguas madres de cristali-  
10 zación de cis-epoxisuccinato cálcico, por adición de un com-  
puesto cálcico tras la reacción de epoxidación, estarán con-  
taminadas con la sal cálcica de ácido maleico sin reaccio-  
nar. Sin embargo, dado que estas aguas madres que contienen  
el maleato cálcico y catalizador soluble se pueden recircu-  
15 lar como tales para uso en el siguiente ciclo de reacción,  
el arrastre de maleato cálcico sin reaccionar no es una des-  
ventaja práctica.

La temperatura de reacción no es más de 70 grados  
centígrados, y preferiblemente está comprendida entre 40 y  
20 60 grados centígrados.

El aumento de la cantidad de catalizador permite  
disminuir la temperatura de reacción y controlar la forma-  
ción de subproductos de reacción indeseables. El aumento de  
la temperatura de reacción acelerará la reacción, y permiti-  
25 rá que se reduzca la cantidad de catalizador, pero a tempe-  
raturas más allá de cierto límite el ácido cis-epoxisuccíni-  
co producido experimentará una severa hidrólisis, originan-  
do ácido DL-tartárico e interfiriendo así con la posibili-  
dad de producir cis-epoxisuccinato cálcico con gran pure-  
30 za.

1 Después de la reacción de epoxidación, la temperatura de la mezcla de reacción se lleva a 40°C o menos, y se añade el compuesto cálcico antes mencionado, para que cristalice el cis-epoxisuccinato cálcico. Como alternativa,

5 después de la reacción de epoxidación se ajusta la mezcla de reacción de manera que la cantidad de compuesto cálcico sea 0,5 átomos-gramo por mol de ácido maleico, y luego se enfría. Los cristales resultantes se recuperan y suspenden de nuevo en un disolvente adecuado, tal como agua. Luego,

10 a una temperatura que no exceda de 40°C, se añade una cantidad adicional de compuesto cálcico. La temperatura a la que se añade el compuesto cálcico tiene una influencia significativa sobre el tamaño de partícula del cis-epoxisuccinato cálcico producido. Así, si la temperatura de adición

15 es mayor de 40°C, el tamaño de partícula del cis-epoxisuccinato cálcico producido será mayor, y es solo a temperaturas no mayores de 40°C cuando se obtendrá el cis-epoxisuccinato cálcico finamente dividido, con un diámetro medio de partícula no mayor de 100 micras. Por debajo de 40°C se puede

20 disminuir el tamaño medio de partícula del cis-epoxisuccinato cálcico, disminuyendo la temperatura, y por tanto la temperatura de adición del compuesto cálcico se puede elegir previamente según el diámetro de partícula deseado. La cantidad de compuesto cálcico a añadir en esta etapa es tal

25 que, considerada conjuntamente con la cantidad de compuesto cálcico antes añadida para la reacción de epoxidación, dé un total de aproximadamente un átomo-gramo, como calcio, por mol del ácido maleico empleado. El pH de la mezcla de reacción tras esta adición de un compuesto cálcico está pre-

30 feriblemente en las vecindades de la neutralidad, por ejem-

1 plo entre 5 y 9. Bajo tales condiciones, la solubilidad del  
cis-epoxisuccinato cálcico en agua será aproximadamente 1  
por ciento o menos, y por tanto se separará como cristales  
sustancialmente la totalidad de la cantidad de cis-epoxi-  
5 succinato cálcico.

De la mezcla producto de reacción así obtenida  
se recupera el cis-epoxisuccinato cálcico por filtración,  
centrifugación o similares, y se aclara. Por tales métodos  
se pueden obtener finas partículas de cis-epoxisuccinato  
10 cálcico menos contaminado con impurezas tales como maleato  
cálcico, DL-tartrato cálcico, catalizador, etc. Cuando el  
filtrado o las aguas madres contienen el catalizador solu-  
ble, se puede volver a usar el líquido para el siguiente ci-  
clo de reacción. Cuando la reacción de epoxidación se ha  
15 efectuado con un catalizador sólido, el catalizador se pue-  
de separar por tamizado u otro método adecuado tras la reac-  
ción de epoxidación o la formación de cis-epoxisuccinato cá-  
lcico, de manera que se puede volver a usar como cataliza-  
dor.

20 Aunque en los siguientes ejemplos se muestran rea-  
lizaciones preferidas del método de la invención, se ha de  
considerar que los ejemplos siguientes se describen solo  
con fines ilustrativos, y será evidente que los métodos par-  
ticularmente descritos en los ejemplos siguientes no se han  
25 de considerar como limitaciones del contenido de la inven-  
ción.

#### Ejemplo 1

Cepas de especies tales como Acinetobacter tartarogenes KB-111, Pseudomonas especies KB-86, Agrobacterium aureum KB-91 y Rhizobium validum KB-106, se usan respecti-  
30

1 vamente para inocular 30 ml de medio de cultivo líquido con-  
tenido en un matraz Erlenmeyer de 200 ml de capacidad, com-  
puesto por licor de maceración de maíz (0,2%), nitrato só-  
dico (0,2%), hidrogenofosfato dipotásico (0,1%), sulfato de  
5 magnésio (0,05%) y sulfato ferroso (0,001%), pH 7,0; y si-  
multáneamente se añade cis-epoxisuccinato cálcico cuyas par-  
tículas varían en diámetro medio de partícula, unas de otras,  
de tal manera que la concentración final de dicha sal cálcica  
pueda llegar a ser 30%, como ácido libre; y tras lo  
10 cual el cultivo se somete a cultivo con agitación por sacu-  
didas rotatorias, a 28°C durante 2 días. La solución de cul-  
tivo obtenida de lo que antecede se filtra luego, para reco-  
ger los cristales, y subsiguientemente se solubiliza con  
ácido sulfúrico, y la sustancia resultante se centrifuga de  
15 manera que se elimine la parte insoluble. Finalmente, la  
determinación cuantitativa del ácido L(+)-tartárico se efec-  
túa dependiendo de la rotación óptica, a 436  $\mu$ m. Los resul-  
tados de la determinación se muestran en la TABLA 1. En la  
Tabla, las magnitudes de los rendimientos de ácido L(+)-tar-  
20 tárico se indican en términos de rendimientos molares, con  
lo que un valor del 100% representa el caso en que se ha  
formado 1 mol de ácido L(+)-tartárico a partir de 1 mol de  
ácido cis-epoxisuccínico.

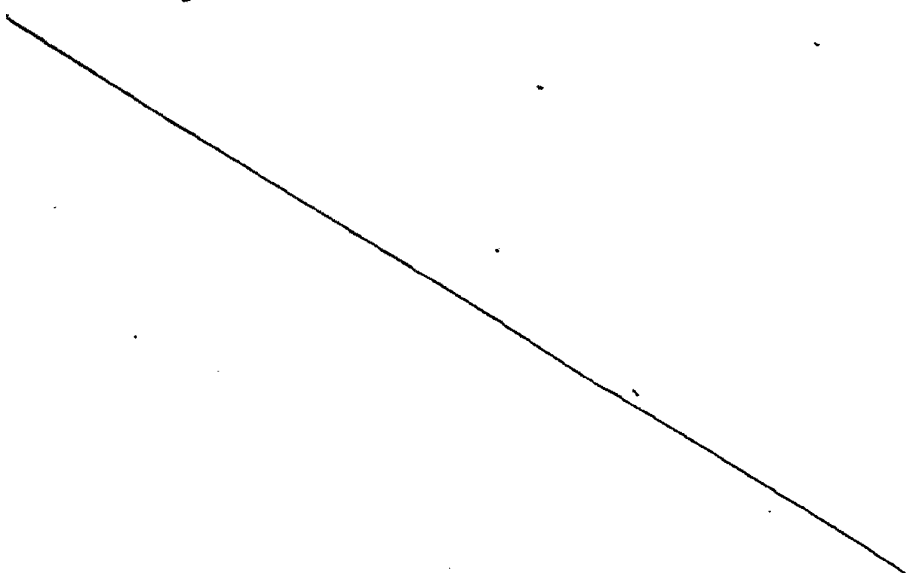


TABLA 1

Cepa	Magnitud de rendimientos de ácido L(+)-tartárico (%)						
	Diámetros medios de partícula del cis-epoxisuccinato cálcico ( $\mu$ )						
	200	170	130	100	80	70	50
<u>Acinetobacter tartarogenes</u> KB-111	10	13	25	65	70	84	83
<u>Pseudomonas species</u> KB-86	3	5	11	27	30	31	30
<u>Agrobacterium aureum</u> KB-91	9	13	17	41	43	49	52
<u>Rhizobium validum</u> KB-106	20	25	40	83	87	92	93

## Ejemplo 2

Se usa una cepa de Acinetobacter tartarogenes KB-112 para inocular 500 ml de cada uno de unos medios de cultivo líquidos contenidos en dos matraces Sakaguchi de 2 l de capacidad cada uno, compuestos por glucosa (0,5%) y licor de maceración de maíz (1,0%), pH 7,0; y esos cultivos se someten a cultivo con agitación por sacudidas alternativas, a 28°C durante 24 horas, obteniendo así 1 l de solución de cultivo. Esta solución de cultivo se transfiere luego a un depósito de 50 l de capacidad, que contiene 30 l de medio de cultivo líquido compuesto por ácido casamini

1 co (0,05%), nitrato amónico (0,1%), hidrogenofosfato dipo-  
tásico (0,2%), sulfato de magnesio (0,05%) y sulfato férrico  
5 (0,001%), pH 7,0; y al mismo tiempo se añaden 9,0 kg del  
ácido libre de cis-epoxisuccinato cálcico (tamaño medio de  
partícula: 50 micras), incubándose luego la mezcla resultan-  
te a 30°C durante 40 horas. Alrededor de 40 l de solución  
de cultivo, obtenida de la anterior, se filtran mediante  
un filtro prensa, y se aclaran con agua. Tras aclarar, la  
sustancia sólida se suspende en 30 l de agua, se agita con  
10 cienzudamente y luego se deja reposar durante un rato, pa-  
ra permitir que precipite la sustancia sólida. Los trata-  
mientos subsiguientes son tales que se desprecian alrededor  
de 20 l de líquido que sobrenada, se vuelven a añadir 20 l  
de agua, se agita bien, y luego se filtra en filtro prensa.  
15 Los cristales de L(+)-tartrato cálcico finalmente obtenidos  
de lo que antecede ascienden a 12,0 kg (pureza: 98%) como  
anhidrido.

A título de contraste con el ejemplo anterior, se  
da aquí otro experimento en el que se usa una cepa de la  
20 misma especie, es decir, la KB-112. En este experimento,  
la incubación y la reacción se efectúan bajo las mismas con-  
diciones que en el ejemplo precedente, solamente salvo en  
que el diámetro medio de partículas de cis-epoxisuccinato  
cálcico que se usa como materia prima es 130 micras. Alre-  
25 dedor de 40 l de la solución de cultivo obtenida de la an-  
terior incubación se purifican por el mismo método antes  
mencionado. En los cristales recuperados de la anterior pu-  
rificación se confirma que existe realmente el residuo de  
ácido cis-epoxisuccínico; y, por tanto, el contenido de áci-  
30 do L(+)-tartárico se mide por determinación cuantitativa por

1 uso del método del Ejemplo 1; y utilizando el resultado de  
dicha determinación se calcula la magnitud de los rendimien-  
tos de L(+)-tartrato cálcico. En consecuencia se halla que  
el rendimiento de L(+)-tartrato cálcico es equivalente a  
5 7,8 kg como el anhídrido.

Análogamente, se hace uso de cepas tales como  
Acinetobacter tartarogenes KB-82, Agrobacterium viscosum  
KB-105, Rhizobium validum KB-97 y Acinetobacter tartaroge-  
nes KB-99, y se alcanzan buenos resultados (tamaño medio de  
10 partícula del cis-epoxisuccinato cálcico: 50 micras).

### Ejemplo 3

Se usa Acinetobacter tartarogenes KB-112 para ino-  
cular 30 ml de medio de cultivo contenidos en un matraz Er-  
lenmeyer de 200 ml de capacidad, medio de cultivo que se ha  
15 bía preparado con tal constitución que al medio de cultivo  
básico, que está compuesto por ácido casamínico (0,05%), ni-  
trato amónico (0,1%), hidrogenofosfato dipotásico (0,2%),  
sulfato de magnesio (0,05%), sulfato ferroso (0,001%), pH  
7,0, se añaden diversas clases de tensioactivos no iónicos,  
20 de manera que las respectivas clases de agentes tensioacti-  
vos puedan llegar a la concentración de 0,1%. Y simultánea-  
mente se añaden cristales de cis-epoxisuccinato cálcico (ta-  
maño medio de partícula: 60 micras), de tal manera que pue-  
da llegar a la concentración final de 40%, calculado como  
25 ácido libre; y la mezcla anterior se somete a cultivo con  
agitación por sacudidas rotatorias, a 30°C y durante 2 días,  
y luego se deja ejercer el efecto de reacción. Una vez ter-  
minada la reacción los cristales se recogen por filtración  
y, tras adición de ácido sulfúrico, se someten a un separa-  
30 dor centrífugo para eliminar las sustancias sólidas. Subsidi-

1 guientemente se hacen las determinaciones cuantitativas  
 respecto al ácido L(+)-tartárico, dependiendo de la rota-  
 ción óptica a 436 m $\mu$ ; y respecto al ácido cis-epoxisuccíni-  
 5 co restante, usando el método de Payne y Williams (G.B. Pay-  
 ne y P.H. Williams: Journal of Organic Chemistry 24, 54) de  
 determinación los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

10	Descripción de agentes tensioactivos*	Rendimientos mo- lares (%) de áci- do L(+)-tartári- co**	Magnitud de resi- duos (%) de ácido cis-epoxisuccíni- co***
	NIKKOL SR-10	45	52
	NIKKOL TO-10	72	25
	NIKKOL GS-6	50	48
15	NIKKOL MYS-10	47	50
	NIKKOL BC-7	52	43
	NIKKOL NP-18TX	55	40
	NIKKOL MGS-C	48	47
	NIKKOL PMS-SE	46	50
20	NIKKOL TW-20	75	21
	NIKKOL BWA-20	74	21
	NIKKOL HCO-50	73	23
	NIKKOL R-1020	73	21
	NIKKOL TF-4	54	42
25	NIKKOL TPMS-30	70	26
	TETRONIC T-702	52	45
	No añadido	34	64

LEYENDA

30 \* Los componentes de los agentes tensioactivos usados son

1 como sigue:

- SR-10 : monooleato de sorbitán  
 TO-10 : monooleato de polioxietilensorbitán  
 GS-6 : hexaestearato de polioxietilensorbita  
 5 MYS-10 : Estearato de polioxietileno  
 BC-7 : Eter polioxietilénico de alcohol cetílico  
 NP-18TX : Eter polioxietilénico de nonilfenol  
 MGS-C : Monoestearato de glicerilo  
 PMS-SE : Monoestearato de propilenglicol  
 10 TW-20 : Derivado polioxietilénico de lanolina  
 BWA-20 : Derivado polioxietilénico de alcohol de lanoli-  
 na  
 HCO-50 : Derivado polioxietilénico de aceite de ricino  
 endurecido  
 15 R-1020 : Resina de polioxietilen-nonilfenol-formaldehi-  
 do  
 TP-4 : Alcohol polioxietilen-tetrahidrofurfurílico  
 TPMS-30 : Estearato de polioxietilen-oxipropileno

20 Todos los anteriores son productos manufacturados  
 por NIKKO CHEMICALS CO. LTD.

TETRONIC T 702: Etilendiamin-poli(oxipropileno-oxietileno)te-  
 trol (producto manufacturado por ASAHI DEN-  
 KA KOGYO CO.)

25 \*\* Los números representan la velocidad de conversión a áci-  
 do L(+)-tartárico a partir de ácido cis-epoxisuccínico

\*\*\* Magnitud de residuos de ácido cis-epoxisuccínico; los nú-  
 meros representan el % de residuos, tomándose como 100%  
 un residuo de 12 g como ácido libre

Ejemplo 4

30 Se usan respectivamente Acinetobacter tartaroge-

1        nes KB-82, Pseudomonas species KB-86, Agrobacterium aureum  
KB-91, Acinetobacter tartarogenes KB-99, Agrobacterium vis-  
5        cosum KB-105 y Rhizobium validum KB-106, para inocular 50  
ml de medio de cultivo líquido contenidos en un matraz Er-  
10        lenmeyer de 200 ml de capacidad, compuestos por licor de  
maceración de maíz (0,2%), glucosa (0,1%), nitrato amónico  
(0,1%), hidrogenofosfato dipotásico (0,2%), sulfato de mag-  
nesio (0,05%) y sulfato ferroso (0,001%), pH 7,0; y simul-  
táneamente se añade cis-epoxisuccinato cálcico (tamaño me-  
15        dio de partícula 60 micras) de tal manera que su concentra-  
ción final pueda llegar a 30% como ácido libre, y así se  
inicia la incubación. Como se describe en la TABLA 4, se  
añaden diversas clases de tensioactivos; y la mezcla se so-  
mete a cultivo con agitación por sacudidas, a 30°C durante  
20        42 horas. Por el resultado del cultivo se observa el hecho  
de que, respecto a cada una de las cepas, las magnitudes  
del rendimiento de ácido L(+)-tartárico muestran respecti-  
vamente valores en aumento, en comparación con los casos  
en que se efectuó una incubación justamente similar sin aña-  
dir agente tensioactivo en absoluto.

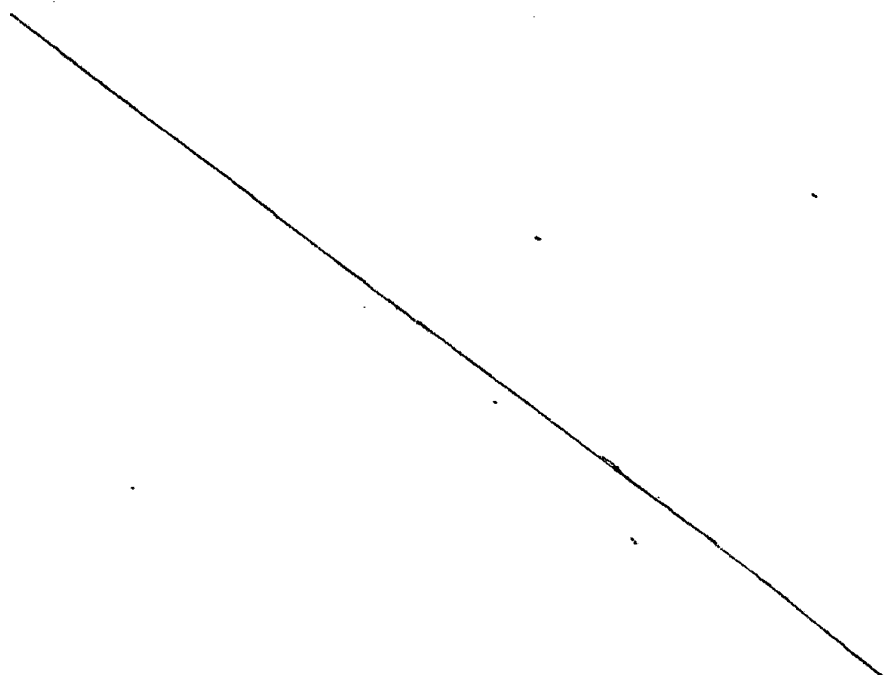


TABLA 4

		Concentración (%) de tensioactivos cuando se añaden*	Tiempo de adición, (h)	Magnitud de ren- dimiento molar (%) de ácido L(+)-tartárico
1				
5	<u>Cepas</u>			
	<u>Acinetobacter</u> <u>tartarogenes</u>	NONION LT-221 (0.2)	0	83
	KB-82	No añadido	-	59
10	<u>Pseudomonas</u> <u>species</u>	NONION E-215 (0.05)	0	47
	KB-86	No añadido	-	31
	<u>Agrobacterium</u> <u>aureum</u>	NONION L-4 (0.1)	12	65
	KB-91	No añadido	-	50
15	<u>Acinetobacter</u> <u>tartarogenes</u>	NIKKOL R-2030 (0.1)	18	89
	KB-99	No añadido	-	77
20	<u>Agrobacterium</u> <u>viscosum</u>	NIKKOL GO-60TX (0.05)	0	59
	KB-105**	No añadido	-	48
	<u>Rhizobium</u> <u>validum</u>	PULRONIC L-61 (0.15)	0	92
	KB-106	No añadido	-	85

## LEYENDA

\* NONION LT-21 (monolaurato de polioxi-etilensorbitán);  
 NONION E-215 (éter polioxi-etilen-olefílico);  
 NONION L-4 (monolaurato de polietilenglicol)  
 (Los tres anteriores son productos manufacturados por  
 NIPPON YUSHI CO. (Japan Fats & Oils Mfg. Co. Ltd.)).

30

1 NIKKOL R-2030 (resina de polioxietilen-octilfenol-formaldehído);

5 NIKKOL CO-60TX (derivado polioxietilénico de aceite de ricino);

(Los dos anteriores son productos manufacturados por NIKKO CHEMICALS CO. LTD.)

PLURONIC L-61 (polioxietilen-oxipropileno-poliol)

(Producto manufacturado por ASAHI DENKA CO. LTD.)

10 \*\* En el caso en que se incubaba esta cepa se añaden al medio de cultivo 100 µg/ml de clorhidrato de piridoxal.

#### Ejemplo 5

Se usan Rhizobium validum KB-97 y Acinetobacter tartarogenes KB-111 para inocular, respectivamente, 500 ml de medio de cultivo contenidos en matraz Sakaguchi de 2 l de capacidad, de tal constitución que el tensioactivo se añade a un medio de cultivo básico que es justamente el mismo que el del Ejemplo 3; y simultáneamente se añade cis-epoxisuccinato cálcico (tamaño medio de partícula: 70 micras) a lo que antecede, de tal manera que su concentración final pueda llegar a 50% como ácido libre. Subsiguientemente se somete la mezcla anterior a cultivo con agitación por sacudidas alternativas a 28°C. La cantidad de ácido cis-epoxisuccínico que queda como residuo en el caldo de cultivo se sigue mediante cromatografía en capa delgada (capa delgada: película de manchas de celulosa con cristal fino, manufacturada por TOKYO KASEI CO.; disolvente: éter isopropílico-tetrahidrofurano-ácido fórmico-agua (10:10:5:4); revelado del color: verde de bromocresol); y después de lo que antecede se continúa la incubación hasta que desaparece el

15

20

25

30

1 ácido cis-epoxisuccínico. El tiempo pasado durante la reac-  
 ción de conversión hasta el punto final de la reacción, jun-  
 to con la magnitud del rendimiento de ácido L(4)-tartárico  
 que se forma (que está en rendimiento molar calculado por  
 5 el método usado en el Ejemplo 3), se indican en la TABLA 5,  
 en la que se puede observar la disminución del tiempo de  
 reacción y el incremento de la magnitud del rendimiento.

TABLA 5

10	NONION OT-221*	RIPONOX NCG*	NIKKOL HCO-80*	No. afia- do		
	(0,15%)	(0,1%)	(0,2%)			
15	Tiempo Magni- consu- tud del mido rendi- (h) miento (%)	Tiempo Mag- consu- nitud mido del (h) rendi- mien- to (%)	Tiempo Magni- consu- tud mido del (h) rendi- mien- to (%)	Tiem Mag- po ni- con- tud sumi del (h) ren- dien- to (%)		
	Cepas					
	<u>Rhizobium</u> <u>validum</u> KB-97	84 89	96 89	78 92	108 85	
20	<u>Acineto-</u> <u>bacter</u> <u>tartaro-</u> <u>genes</u> KB-111	84 90	108 85	90 87	120 83	

LEYENDA

\* NONION OT-221: monooleato de polioxietilensorbitán (manu-  
 facturado por NIPPON YUSHI CO. - Japan  
 Fats & Oils Mfg. Co.);

30 RIPONOX NCG: éter polioxietilénico de alcohol-fenol

1 (manufacturado por LION FATS & OILS MFG. Co.);  
NIKKOL HCO-80: derivado polioxi-etilénico de aceite de ricino  
endurecido (manufacturado por NIKKO CHEMICALS  
CO.).

5 Ejemplo 6

Se usa Rhizobium validum KB-97 para inocular 500  
ml de cada uno de los medios de cultivo líquidos contenidos  
en dos matraces Sakaguchi de 2 l de capacidad, y compuestos  
por glucosa (0,5%), líquido de maceración de grano (1,0%),  
10 pH 7,0; y luego se someten a cultivo con agitación por sa-  
cudidas alternativas, a 28°C y durante 24 horas, obtenien-  
do así alrededor de 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 compuesto por  
15 licor de maceración de maíz (0,2%), nitrato amónico (0,1%),  
hidrogenofosfato dipotásico (0,2%), sulfato de magnesio  
(0,05%), sulfato ferroso (0,001%) y NIKKOL TW-20 (0,1%),  
pH 7,0; y al mismo tiempo se añaden 6 kg de cis-epoxisucci-  
nato cálcico (tamaño medio de partícula: 55 micras), calcu-  
20 lado como ácido libre; y la mezcla resultante se somete a  
incubación a 30°C. Tras haber pasado 19 horas desde el tiem-  
po de iniciación de la incubación, se añaden adicionalmente  
6 kg de cis-epoxisuccinato cálcico calculado como ácido li-  
bre; y la mezcla se pone bajo incubación continuada hasta  
25 el punto en que se totalizaron 48 auténticas horas desde la  
iniciación de la incubación. La serie subsiguiente de trata-  
mientos es tal que se filtran alrededor de 40 l del caldo  
de cultivo obtenido, mediante un filtro prensa; la parte  
sólida se aclara con agua; y se suspende en 30 l de agua,  
30 suspensión que se agita a fondo, tras marcar el tiempo para

1 esperar la precipitación de la parte sólida, se desprecian  
20 l de parte que sobrenada; se añaden de nuevo 20 l de  
agua, y se agita bien; y el resultado se filtra en filtro  
prensa, obteniendo así finalmente los cristales de L(+)-tar  
5 trato cálcico. La cantidad de estos cristales es 15,9 kg  
(pureza: 98%), como anhídrido.

A título de contraste con el ejemplo anterior, se  
efectúa otro experimento con la misma cepa KB-97. En este  
experimento, el cultivo y la reacción se efectúan bajo los  
10 mismos términos y condiciones que en el ejemplo precedente,  
con la sola excepción de que solo el NIKKOL Tw-20 (tensioac  
tivo) se elimina del medio de cultivo usado en el ejemplo  
precedente. Alrededor de 40 l del caldo de cultivo que se  
obtiene de lo que antecede se purifican por un método comple  
15 tamente igual al de antes. En los cristales obtenidos por la  
anterior purificación se confirma que el residuo de cis-epo-  
xisuccinato cálcico existe realmente, cuando se ensaya me-  
diante cromatografía en capa delgada (efectuada según el mé  
todo usado en el Ejemplo 5); y por tanto el contenido de áci  
20 do L(+)-tartárico se somete a determinación cuantitativa por  
el método del Ejemplo 3. Como resultado, se halla que la  
cantidad de rendimiento del L(+)-tartrato cálcico es equi-  
valente a 12,3 kg como anhídrido.

#### Ejemplo 7

25 Se usa Rhizobium validum KB-97 para inocular 500  
ml de un medio de cultivo líquido (pH 7,0) contenido en un  
matraz Sakaguchi de 2 l de capacidad, y compuesto por licor  
de maceración de maíz (2,0%), glucosa (0,5%), y este culti-  
vo líquido se incuba a 28°C durante 24 horas, bajo cultivo  
30 con agitación por sacudidas alternativas. El caldo de cul-

1 tivo así obtenido se transfiere a un depósito de 50 l de ca-  
pacidad que contiene 30 l del medio de cultivo de justamen-  
te la misma composición que el antes descrito, y el medio  
de cultivo líquido de dicho depósito se somete a incubación  
5 a 28°C durante 24 horas, bajo cultivo con agitación y airea-  
ción. Alrededor de 15 l del caldo de cultivo obtenido de él  
se transfieren a un depósito de 200 l de capacidad, que con-  
tiene 100 l de un medio de cultivo líquido compuesto por lí-  
quido de maceración de grano (0,5%), nitrato amónico (0,1%),  
10 dihidrógenofosfato sódico (0,2%), sulfato de magnesio (0,05%),  
sulfato ferroso (0,001%), derivado polioxietilénico de lano-  
lina (0,1%) (pH 7,0), y simultáneamente se añaden 40 kg de  
cis-epoxisuccinato cálcico (tamaño medio de partícula: 50  
micras) (como ácido libre).

15 La totalidad se somete a cultivo con agitación y  
aireación a 30°C durante 30 horas. El caldo cultivo resul-  
tante, y el agua de lavado del depósito, aproximadamente 150  
l en total, se someten a una centrifuga tipo Decantor (Sumi-  
tomo Heavy Industries, Ltd., tipo TS-210F), para separar  
20 L(+)-tartrato cálcico como cristales. Los cristales se sus-  
penden en aproximadamente 100 l de agua. Tras una agitación  
suficiente, los cristales se separan en dicha centrifuga ti-  
po Decantor, y se vuelven a suspender en aproximadamente 70  
l de agua, y se agita bien. La suspensión se somete a un  
25 filtro prensa, dando 54 kg de L(+)-tartrato cálcico (pureza  
98%), como anhidrido.

#### Ejemplo 8

En 400 ml de agua se disuelven 98 g de anhidrido  
maleico. Luego se añaden y disuelven 6,6 g de wolframato só-  
30 dico (dihidratado) y 50 g de carbonato cálcico (0,5 átomos-

1 gramo como calcio, por mol de ácido maleico). Manteniendo  
la temperatura de reacción a 30°C, se añaden 102 g de una  
solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 35%, gota a go-  
ta, durante un periodo de 1 hora. Tras la adición gota a go-  
5 ta se sigue dejando que transcurra la reacción durante 7 ho-  
ras. A una temperatura de 30°C, añadiendo gradualmente 50 g  
de carbonato cálcico, se agita la mezcla de reacción hasta  
que ya no se desprende más dióxido de carbono gaseoso. Los  
cristales resultantes se recuperan por filtración, se acla-  
10 ran con agua y se secan. El método proporciona 248 g (pure-  
za 99,5%) de cis-epoxisuccinato cálcico (pentahidratado).

Se halla que el diámetro medio de partícula de  
esos cristales es 72  $\mu$ .

#### Ejemplo 9

15 En 300 ml de agua se disuelven 49 g de anhídrido  
maleico. Luego se añaden y disuelven 2,4 g de molibdato só-  
dico (dihidratado) y 20,3 g de hidróxido cálcico (0,55 áto-  
mos-gramo como calcio, por mol de ácido maleico).

Tras adición gota a gota de 51 g de una solución  
20 acuosa de peróxido de hidrógeno al 35%, a 50°C, se sigue  
efectuando la reacción a 50°C durante 5 horas.

Después se enfría la mezcla de reacción a 30°C, y  
mientras se mantiene esa temperatura se añaden gradualmente  
16,7 g de hidróxido cálcico (0,45 átomos-gramo como calcio,  
25 por mol de ácido maleico).

Se agita la mezcla durante 1 hora, tras lo cual  
los cristales se recuperan por filtración. El método produ-  
ce 112 g (pureza 98%) de cis-epoxisuccinato cálcico (pentahi-  
30 dratado). El diámetro medio de partícula de esos cristales  
es 83  $\mu$ .

## Ejemplo 10

En 500 ml de agua se disuelven 98 g de anhídrido maleico, seguidos por adición de 1,3 g de wolframato sódico (dihidratado) y la cantidad de carbonato cálcico indicada en la tabla siguiente. A una temperatura de reacción de 50°C se añaden gota a gota 97,2 g de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 35%, y se sigue efectuando la reacción a 50°C. Manteniendo la mezcla de reacción a 20°C se sigue añadiendo carbonato cálcico, en cantidad suficiente para llegar a un total de 100 g, tomado conjuntamente con la cantidad añadida para la epoxidación (para llegar a un átomo-gramo como calcio, por mol de ácido maleico), con agitación, hasta que cesa el desprendimiento de dióxido de carbono gaseoso. Los cristales resultantes se recogen por filtración. Los resultados se exponen a continuación en la tabla.

CaCO <sub>3</sub> (g) añadido para la epoxidación	30	40	50	60	70
Número de átomos-gramo como calcio	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
pH de la suspensión de ácido maleico	1,3	1,5	2,9	3,4	3,6
Tiempo de reacción (hr)	9	7	6	5	4
Rendimiento de cis-epoxisuccinato cálcico (pentahidratado) (gramos)	236	244	249	247	245
Pureza (%) del cis-epoxisuccinato cálcico (pentahidratado)	95	98	99	99	99
Diámetro medio de partícula (μ) del cis-epoxisuccinato cálcico (pentahidratado)	60	58	52	98	140

## Ejemplo 11

1 En 400 ml de agua se disuelven 98 g de anhídrido maleico. Luego se añaden y disuelven 0,66 g de wolframato sódico (dihidratado) y 37 g de hidróxido cálcico (0,5 átomos-gramo como calcio, por mol de ácido maleico).

5 A una temperatura de reacción de 60°C se añaden gota a gota 51 g de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 60%, seguida por seguir haciendo reaccionar a 60°C durante 3 horas. Se enfría la mezcla de reacción y, a la temperatura indicada a continuación en la tabla, se añaden gradualmente 50 g de carbonato cálcico (0,5 átomos-gramo como calcio, por mol de ácido maleico). Se agita la mezcla hasta que cesa el desprendimiento de dióxido de carbono gaseoso. Luego, a una temperatura de 20°C, se sigue continuando la agitación durante 1 hora, y los cristales resultantes se recuperan por filtración. Los resultados se exponen a continuación en la tabla.

15	Temperatura (°C) a la que se añade el $\text{CaCO}_3$	10	20	30	40	50
20	Rendimiento (g) de cis-epoxi succinato cálcico (pentahidratado)	228	227	225	226	224
	Pureza (%) de cis-epoxisuccinato cálcico (pentahidratado)	99	99	99	99	99
25	Diámetro medio de partícula ( $\mu$ ) del cis-epoxisuccinato cálcico (pentahidratado)	47	52	70	93	130

#### Ejemplo 12

30 En 300 ml de agua se disuelven 98 g de anhídrido maleico. Luego se añaden 1,3 g de wolframato sódico (dihidratado) y 60 g de carbonato cálcico (0,6 átomos-gramo co-

1 mo calcio, por mol de ácido maleico).

5 A una temperatura de reacción de 60°C se añaden  
gota a gota 98 g de una solución acuosa de peróxido de hi-  
drógeno al 35%, seguida por seguir haciendo reaccionar a  
10 60°C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfría, y  
los cristales resultantes se recogen por filtración. Los  
cristales se suspenden en 300 ml de agua. A 10°C se le aña  
den gradualmente 40 g de carbonato cálcico (0,4 átomos-gra  
mo por mol de ácido maleico), y se agita la suspensión hasa  
15 ta que cesa el desprendimiento de dióxido de carbono gaseo  
so. Los cristales resultantes se recuperan por filtración,  
como 244 g de cis-epoxisuccinato cálcico pentahidratado (pu  
reza 99%). El diámetro medio de los cristales es 75 micras.

#### REIVINDICACIONES

20 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:

25 1ª.- Un método perfeccionado para producir ácido  
L(+)-tartárico, en un método para preparar ácido tartárico  
hidrolizando microbiológicamente ácido epoxisuccínico, que  
comprende: (1) incorporar como materia prima en el medio  
de cultivo un cis-epoxisuccinato cálcico cuyo diámetro me-  
dio de partícula no es mayor de 100 micras; (2) incubar un  
30 microorganismo que sea capaz de hidrolizar ácido cis-epoxi-

1 succínico a ácido L(+)-tartárico; y (3) convertir así el  
cis-epoxisuccinato cálcico en L(+)-tartrato cálcico.

2<sup>a</sup>.- Método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, donde di-  
cho cis-epoxisuccinato cálcico de partida se prepara (1) ha-  
5 ciendo reaccionar una solución acuosa o suspensión acuosa  
que contiene ácido maleico y un compuesto cálcico, en pro-  
porción de 0,4 a 0,6 átomos gramo, como calcio, por cada  
mol de ácido maleico, con peróxido de hidrógeno, en presen-  
cia de un catalizador de epoxidación; (2) añadir luego una  
10 cantidad adicional de compuesto cálcico, a una temperatura  
no mayor de 40 grados centígrados, para dejar disponible  
un total de aproximadamente un átomo-gramo, como calcio,  
por mol del material de partida ácido maleico, y (3) hacer  
así que el cis-epoxisuccinato cálcico se separe como cris-  
15 tales.

3<sup>a</sup>.- Método según la reivindicación 2<sup>a</sup>, donde di-  
cho catalizador de epoxidación es uno elegido de entre áci-  
do wolfrámico, ácido molibídico, heteropoliácidos de wolfra-  
mio o molibdeno, y sales de ellos.

20 4<sup>a</sup>.- Método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, donde se  
incorpora en el medio de cultivo un tensioactivo de tipo  
no iónico.

5<sup>a</sup>.- Método según la reivindicación 4<sup>a</sup>, donde el  
tensioactivo de tipo no iónico es uno elegido del grupo que  
25 consta de éster graso de sorbitán, éster graso de polioxi-  
tilensorbitán, éster graso de polioxietilensorbita, éster  
graso de polioxietileno, éter polioxietilénico de alcohol  
superior, éter polioxietilen-alcohol-arílico, éster graso  
de glicerina, éster graso de alcoholenglicol, éter polioxi-  
30 propilen-polioxietilen-alcohílico, derivado de condensación

1 de polioxietilen-alcoholifenol-formaldehído, polioxietilen-  
alcoholamina o amida, derivado polioxietilénico de lanoli-  
na, derivado polioxietilénico de alcohol de lanolina, deri-  
vado de polioxietilensorbita de cera de abejas, derivado po-  
5 lioxietilénico de aceite de ricino, polioxietilen-poliol,  
polioxipropilen-poliol, polioxietilen-oxipropilen-poliol,  
alcohol polioxietilen-tetrahidrofurfurílico y éster graso  
de polioxipropileno.

10 6ª.- Método según la reivindicación 4ª, donde la  
concentración de tensioactivo de tipo no iónico es 0,05-  
5,0% (peso por volumen).

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

15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-  
cede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de cuarenta y dos hojas es-  
critas a máquina por una sola cara.

Madrid, 02 JUN 1976

P.A.

Alberto de Zamora  
por Poder