



1965 314066

P A T E N T E
D E
I N V E N C I Ó N

por "PROCEDIMIENTO PARA DESDOBLAR BETA-GLUCANOS, ESPECIALMENTE DE CELULOSA", a favor de la firma alemana E. MERCK AKTIENGESELLSCHAFT, domiciliada en DARMSTADT (Alemania).

MEMORIA DESCRIPTIVA

La invención se refiere a un procedimiento para desdoblar los beta-glucanos, especialmente de la celulosa, por medio de micro-organismos o de preparados enzimáticos obtenidos de los mismos.

5. La capacidad para desdoblar la celulosa y otros



314066

beta-glucanos ha sido determinada en numerosos micro-organismos, y respectivamente, en las enzimas derivadas de ellos (por ejemplo celulasas). Sin embargo, hasta ahora, numerosos inconvenientes se han puesto a la extensión del empleo de tales celulasas, por ejemplo, en la industria farmacéutica o en la del papel. Así, los preparados de celulosa hasta ahora conocidos, muestran poca o ninguna acción sobre la celulosa nativa, como el algodón, papel, etc. En la mayoría de los casos, los filtrados de cultivos, exentos de células, aún aquellos cuyo cultivo-madre puede utilizar la celulosa, como aportadora de carbono, son menos activos respecto al substrato inicial. De unos 90 preparados de celulosa de diverso origen fúngico, sólo en 10 pudo comprobarse una actividad sobre borra de algodón y en unos 5 solamente, sobre papel de filtro, aunque en los más de los casos, sólo después de mucho tiempo de actuación y en condiciones óptimas. Además, para conseguir el máximo rendimiento en enzima, se necesitan tiempos prolongados de cultivo (en la literatura se encuentran datos entre 7 y 40 días). Finalmente, algunos de los hongos degradadores de celulosa, por ejemplo, los basidiomicetos conocidos como disgregadores de madera, son difíciles de cultivar en inmersión.

314066



- Se ha encontrado ahora, que estos inconvenientes son ampliamente superados con el empleo de basidiomicetos del género *Oxyporus* y que el filtrado de cultivo sin células de este hongo, posee además una actividad celulolítica mayor que la de los organismos disgregadores de celulosa hasta ahora conocidos. Son atacadas, no solamente celulosas esponjadas en medio ácido o alcalino o derivados celulósicos como la carboxi-metil-celulosa, sino también el polvo de celulosa, papel de filtro y algodón. Los hongos de la familia de los *Oxyporus* no se habían aprovechado hasta ahora para la degradación de la celulosa. Los cultivos-madre son fáciles de realizar sumergidos, incluso en fermentadores. Se desarrollan bien en soluciones nutritivas, tanto en las definidas como las no definidas sencillas, alcanzando tras corto tiempo de cultivo su máxima actividad celulolítica.

- El objeto de la invención es un procedimiento para degradar los beta-glucanos, especialmente celulosa, por medio de micro-organismos, caracterizado por el empleo de hongos de la especie *Oxyporus* (Bourd & Galzin) Donk, o sus filtrados de cultivo o extractos de micelas o de enzimas de ellos obtenidas.

- Ha demostrado ser especialmente ventajoso, el empleo de la clase *Oxyporus populinus* (Schum. ex Fr.) Donk, syn. *Fomes connatus* (Fr.) Gillet, *Polyporus connatus* Fr., *Polystictus connatus* (Fr.) Quél. (denominados más adelante como "*O. populinus*"), que forma clamidocsporas en cultivo

314066



saprofítico. Así, el cultivo resulta más sencillo y seguro.

Además de la celulosa, también se puede degradar otros beta-glucanos por el procedimiento según la invención, por ejemplo liquenina o bien paredes celulares de levadura consistentes en beta-glucanos enlazados en 1,3.

Los hongos se cultivan, de preferencia, en soluciones nutritivas de extracto de malta-peptona, por ejemplo, con un contenido de un 2% de extracto de malta y 0,02% de peptona (pH 5,8). Si se emplea un medio de cultivo sólido, se añaden un 2% de agar-agar.

También son apropiadas para el cultivo-madre, soluciones sintéticas, con una fuente de carbono fácilmente valorable, por ejemplo, una solución de la fórmula siguiente:

15.	Glucosa	1,0%
	l-asparagina	0,05%
	KH_2PO_4	0,2%
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,2%
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05%

= 5 =

314066



	FeCl_3	0,8 mg/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,9 mg/l
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,4 mg/l
5.	Clorhidrato de tiamina	1,0 mg/l (pH 5,5)

10. En lugar de glucosa se pueden emplear maltosa, sacarosa, polvo de celulosa, polvo de celulosa esponjado en medio ácido o alcalino. La obtención de cultivos-madre y pre-cultivos, se logra, en el caso del *O. populinus*, en unos 8 días, a alrededor de los 28°C. Después, la mayor parte de la micela ha formado clamidoesporas en forma de limón; las hifas vegetativas restantes son sujetadas a autólisis.

15. El cultivo inmerso de los hongos se realiza en los medios antes citados, en matraces agitadores o en fermentadores. Después de 4 días de incubación en las soluciones nutritivas citadas, se forman de 3-5 g de micela por litro, (peso en seco).

20. Para la síntesis del sistema celulolítico, es necesario la presencia de celulosa en el medio nutritivo. En el cultivo filtrado se encuentra una actividad celulolítica óptima al cabo de 3 o 4 días de incubación a unos 28°C., efectuando el cultivo según el esquema siguiente:



314066

- a) Cultivo madre en extracto de malta-peptona-agar;
- b) Cultivo previo en extracto de malta-peptona-solución nutritiva y/o con la citada solución nutritiva, pero con celulosa esponjada en medio ácido, como fuente de carbono, 3-8 días;
5. c) Cultivo principal, ventajosamente, con una solución de cultivo de la composición siguiente (de 3 a 4 días):

	Celulosa en polvo	0,3%
10.	Hidrolizado de cascina	0,2%
	Harina de maíz macerada	0,04%
	KH_2PO_4	0,2%
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05%
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0 mg/l

15. Los siguientes ejemplos son semejantes en actividad celulolítica a los filtrados de cultivo obtenidos del *O. populinus*.

= 7 =

314066



JUN. 1965

EJEMPLO 1.

5. El filtrado de cultivo se reduce a $1/5$ de su volumen primitivo y se lleva a un pH de 4,6. 500 mg de celulosa en polvo se mantienen durante 48 horas en 100 cc de la solución así obtenida ^{a 35°C}. Después, la celulosa restante se centrifuga, se seca y se pesa: 234 mg = 46,8% de la pesada inicial. Por lo tanto se ha degradado, bajo estas condiciones, 53,2% de la pesada inicial.

EJEMPLO 2.

10. 500 mg de celulosa en polvo, esponjada en medio ácido, se tratan como en el ejemplo 1. Pesada final: 42 mg = 8% del peso inicial; se ha degradado el 92% de la pesada inicial.

EJEMPLO 3.

15. 500 mg de papel de filtro se tratan como en el ejemplo 1. Peso final = 58,6% del inicial; se ha degradado el 41,4% del peso inicial.

EJEMPLO 4.

20. Un hilo de algodón de 8 cm de largo y 23 mg de peso se trata previamente, durante 10 minutos a temperatura ambiente con lejía de sosa cáustica al 32%. Después de un lavado a fondo se inmerge durante 24 horas en

314066



- 100 cc de filtrado de cultivo fresco a 40°C y finalmente, se determina el valor de su resistencia a la tracción. El hilo así tratado, se rompe con una carga de 10 g., mientras que un hilo de control, tratado asimismo previamente con lejía de sosa cáustica, pero no sometido a la acción del filtrado de cultivo, se rompió con una carga de 500 g.
- 5.

EJEMPLO 5.

- 70 mg de algodón tratado previamente con lejía de sosa cáustica al 32%, se sometieron durante 24 horas a la acción de una mezcla a 40°C de 10 cc de filtrado de cultivo fresco (pH 5,4) y 90 cc de agua. Peso final: 55 mg = 78% del inicial; se degradó el 22% de dicho peso.
- 10.



314066

N O T A

Describe el objeto de la invención, se declara nuevas las siguientes reivindicaciones, con prioridad alemana nº M 61 327 IVa/6b del 11 de Junio de 1964:

5. 1. Procedimiento para desdoblar beta-glucanos, especialmente de celulosa, mediante micro-organismos, caracterizado porque se utilizan hongos de la especie *Oxyporus* (Bourd & Galzin) Donk o sus filtrados de cultivo o extractos de micelio o bien enzimas obtenidas de los mismos.
10. 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por el empleo de la clase *Oxyporus populinus* (Schun. ex Fr.) Donk, syn, *Fomes connatus* (Fr.) Gillet, *Polyporus connatus* Fr., *Polystictus connatus* (Fr.) Quél.
15. 3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el hongo empleado se cultiva inmerso.
4. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el hongo utilizado se cultiva en una

= 10 =

314066



solución nutritiva que contiene celulosa.

5. Procedimiento para desdoblar beta-glucanos, especialmente de celulosa.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de 10 hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 10 JUN. 1963

P.R.

JAIME ISERN

P. R.