

419637



P.- 55.668

Case-2063 B

B01D/C12D

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

entidad japonesa

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

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA CONCENTRAR UNA SUSPENSION
DE UN POLISACARIDO TERMICAMENTE GELIFICABLE"

(Clase Internacional C08b)

21.11.73.

418557



La presente invención se refiere a un procedimiento para concentrar una suspensión de un polisacárido térmicamente gelificable compuesto predominantemente por beta-1,3-glucano.

5 Tales polisacáridos gelificables térmicamente son elaborados por Alcaligenes faecalis var. myxogenes NTK-u y otros organismos, y son preparados por los métodos expuestos en las patentes de los EE.UU. nº 3.754.925 y patente francesa nº 7141557, o se presentan
10 en el Poria cocos Wolf (Agricultural Biological Chemistry 32-10, 1261-1269 (1968)).

Estos polisacáridos han atraído recientemente gran atención como materiales alimenticios sin igual, agentes modificadores de la calidad, agentes mejoradores de alimentos, alimentos con pocas calorías y
15 similares, debido a su resistencia de gel sin igual, capacidades de retención de agua, texturas características y bajos contenidos caloríficos, etc.

Dado que estos polisacáridos son solubles
20 en un álcali fuerte e insolubles bajo condiciones entre neutras y ácidas, han sido purificados hasta ahora aprovechando este comportamiento de solubilidad.

Así, el método usual comprende preparar una suspensión que contiene tal polisacárido en primer
25 lugar; disolver el polisacárido por adición de un álcali.
21.11.73.

419637



li fuerte (por ejemplo NaOH); eliminar de la solución los insolubles en álcali; añadir un ácido, tal como HCl, a la solución residual, para precipitar el polisacárido; diluir con agua el líquido resultante; centrifugar la solución para eliminar lo que sobrenada; eliminar sales del sedimento; concentrarle; y finalmente deshidratarle. Una de las desventajas de este método es que cuando se hace que dichos polisacáridos se separen por adición de un ácido, su fuerte afinidad por el agua hace que se forme un fluido tipo jalea, incluso a baja concentración (aproximadamente 1% (peso/volumen)), y por tanto hace muy difícil seguir concentrando el fluido. Otra desventaja es que, debido a que la capacidad de gelificación térmica de estos polisacáridos se estropea a aproximadamente 40°C, es imposible separarlos y concentrarlos mientras se calientan. Así, este método apenas puede ser aplicado a un procedimiento industrial.

Los autores de la presente invención efectuaron extensos estudios para soslayar estas desventajas del método usual y para establecer un método comercialmente ventajoso. Los estudios condujeron al descubrimiento de que si se sigue el método de disolver primero, por ejemplo, una sal de calcio, sal de magnesio o sal de cinc en una suspensión de dichos polisacáridos, bajo condiciones entre débilmente ácidas y débilmente

21.11.73.

419837



alcalinas, ajustándolos luego a una alcalinidad de aproximadamente 0,1-1N respecto a, por ejemplo, álcali cáustico, y añadiendo finalmente un ácido mineral, por ejemplo HCl, a la solución, los polisacáridos precipitan como gel concentrado firme, facilitando así las subsiguientes operaciones de separación, eliminación de sales y purificación. El hallazgo anterior y los estudios subsiguientes han culminado en la presente invención.

Así, el principal objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para concentrar una suspensión de un polisacárido gelificable térmicamente, compuesto predominantemente por beta-1,3-glucano, de manera que se facilite la posterior purificación de dicho polisacárido.

Otro objeto es proporcionar un procedimiento para purificar el polisacárido.

El objeto principal de la presente invención se consigue disolviendo una sal soluble de calcio, magnesio o cinc en una suspensión de dichos polisacáridos, haciendo luego alcalina la suspensión para disolver el polisacárido suspendido; añadiendo un ácido a la solución resultante, para precipitar el polisacárido; y finalmente separando y recogiendo éste.

En la presente invención se emplea una suspensión de los polisacáridos antes descritos. Si la

25
21.11.73.



419537

concentración del polisacárido es excesivamente alta, el fluido es demasiado viscoso para ser manipulado. Por tanto, se emplea usualmente una suspensión que contiene no más de 6,5% en peso/volumen (p/v) de los polisacáridos.

Según la presente invención se concentra muy eficazmente una suspensión de los polisacáridos a una concentración no mayor que 6,5% (peso/volumen). Dado que los métodos de fermentación de las patentes francesas antes mencionadas dan polisacáridos PS y curdlan (denominados abreviadamente en lo sucesivo PS y curdlan) en suspensión, este caldo de fermentación puede ser empleado como tal en la práctica de la invención. Tales caldos de fermentación contienen usualmente células y otros insolubles. Si la ocasión pide separar tales materias antes de seguir métodos de concentración, la suspensión es sometida a un método de tratamiento previo que comprende alcalinizar la suspensión hasta por encima de pH 12, de manera que se disuelva el polisacárido suspendido; añadir cloruro cálcico o hidróxido cálcico para disminuir la viscosidad de dicha solución de polisacárido; eliminar de ella los contaminantes insolubles; y añadirle un ácido para volver a tener una suspensión del polisacárido.

25
21.11.73.

Este método de tratamiento previo es par-



5 particularmente deseable en el caso de que las soluciones
alcalinas de polisacáridos sean viscosas, por ejemplo
con tanto como cientos de centipoises, aún cuando las
concentraciones de polisacáridos sean de varios por
10 ciento, con lo que es extremadamente difícil separar las
células y otros insolubles de la solución. Por ejemplo,
en un método de centrifugación la eficacia que se puede
alcanzar de la centrífuga es solo aproximadamente un dé
cimo de la eficacia a alcanzar cuando se eliminan las
15 células de los caldos de cultivo comúnmente existentes,
cuyas viscosidades están en las vecindades de aproxima
damente varios centipoises. En este método de tratamien
to previo la cantidad de cloruro cálcico o hidróxido
cálcico está deseablemente entre 0,03 y 0,2 moles/litro,
20 en relación a 1% en peso/volumen (p/v) del polisacárido
que se disuelve.

En la práctica de este tratamiento previo,
la viscosidad de la solución alcalina antes de la adi
ción de sal de calcio es deseablemente tan baja como sea
25 posible, por ejemplo aproximadamente 140 centipoises o
menos, y con tal fin es práctico mantener la solución
alcalina en reposo durante algún tiempo antes de la adi
ción de sal de calcio.

En tal suspensión de polisacárido se in
25 corpora y disuelve una sal de calcio, sal de magnesio o
21.11.73.

419557



sal de cinc (denominadas en lo sucesivo sal de calcio o equivalente, si es necesario). Aunque la sal puede ser cualquiera de las sales solubles en agua, tal como clorhidrato, hidróxido, etc, el clorhidrato es la más deseable. Aunque la cantidad de sal varía con los diferentes tipos de sal y de polisacárido, es aconsejable usar entre 0,03 y 0,75 moles/litro. En particular, en el caso de la sal de magnesio, el intervalo más deseable es entre 0,06 y 0,25 moles/litro, y en el caso de la sal de cinc el intervalo más deseable es entre 0,35 y 0,45 moles/litro. La adición de una cantidad menor que 0,03 moles/litro es indeseable, ya que cuando el fluido se hace fuertemente alcalino en la etapa subsiguiente su viscosidad se hace demasiado alta. Sin embargo, cuando la concentración de sal alcanza 0,03 moles/litro o más alta, por ejemplo, en el caso de la sal de calcio, la viscosidad de la solución alcalina de polisacáridos obtenida en la etapa siguiente disminuye notablemente haciendo fácil efectuar la separación de contaminantes insolubles de la solución. En relación con esto es importante que tras la adición de sal de calcio o equivalente el sistema sea agitado suficientemente, para disolver completamente y dispersar la sal en la suspensión.

La suspensión que contiene la sal de calcio o equivalente es ajustada luego a una alcalinidad

21.11.73.

41963/

20



fuerte, mediante un álcali tal como NaOH o KOH. El pH así ajustado debe ser al menos por encima de pH 12, y preferiblemente por encima de pH 13. Luego se añade un ácido a la solución para precipitar el polisacárido.

- 5 Aunque el tipo de ácido es en gran parte opcional, es preferible el ácido clorhídrico. El pH se ajusta usualmente por debajo de 10, y preferiblemente cerca de neutro a ácido. Este ácido se añade hasta que se separa el polisacárido. De esta manera se permite que el poli-
- 10 sacárido buscado se separe mucho más fácilmente que en ausencia de sal de calcio o equivalente. Este precipitado es tan altamente sedimentable que se puede separar fácilmente del fluido que sobrenada, y dado que el precipitado así separado retiene relativamente menos
- 15 agua se efectúa eficazmente el subsiguiente método de concentración del precipitado. Un procedimiento sin emplear sal de calcio o equivalente solo da un precipitado de polisacárido muy viscoso, tipo jalea, que contiene gran cantidad de agua cuando se separa el polisacá-
- 20 rido con adición de un ácido, y por tanto requiere gran cantidad de esfuerzo para concentrar la suspensión y en la subsiguiente deshidratación, mientras que el método de la invención proporciona precipitados de menor contenido de agua, por ejemplo aproximadamente la mitad
- 25 que el de los productos que se pueden obtener por mé-

21.11.73.

4196

29



dos usuales, con el resultado de que se facilitan considerablemente los subsiguientes métodos de purificación, incluyendo la eliminación de sales, el secado, etc.

5 El método de la presente invención será descrito en más detalle mediante experimentos y ejemplo de trabajo.

10 En estos experimentos y ejemplo se preparó PS según el Ejemplo A-4 de la patente de los EE.UU. nº 3.754.925 (véase referencia más adelante), mientras que el polisacárido de Poria cocos Wolf fue obtenido de la manera expuesta en Agricultural Biological Chemistry 32-10, 1261-1269 (1968).

Referencia

15 Se inocula Alcaligenes faecalis var. myxogenes, cepa NTK-u (IFO-13140) en 30 ml de un medio de cultivo de siembra cargado en un matraz Erlenmeyer de 200 ml, estando compuesto el medio por glucosa (1,0%), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,15%), KH_2PO_4 (0,1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,005%), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,002%), ZnCl_2 (0,001%), CoCl_2 (0,001%), extracto de levadura (0,1%), CaCO_3 (0,3%), uracilo (0,01%) y agua, y estando ajustado a pH 7,0. El cultivo se efectúa bajo agitación a 32°C durante 24 horas.

25 Una porción de 2 ml del caldo de cultivo de siembra resultante es inoculada en 20 ml de un medio
21.11.73.



de cultivo principal cargado en un matraz Erlenmeyer de 200 ml, estando compuesto el medio por glucosa (10,0%), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,23%), KH_2PO_4 (0,1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,005%), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,002%), ZnCl_2 (0,001%), CoCl_2 (0,001%), CaCO_3 (0,3%), uracilo (0,01%), y agua, y estando ajustado a pH 7,0. El cultivo se efectúa bajo agitación a 32°C durante 90 horas.

Se mezclan los caldos obtenidos en varios de tales matraces. A 80 ml del caldo se añaden 240 ml de una solución acuosa de NaOH 0,5N, seguida por agitación a fondo hasta que se hincha el polisacárido producido. Se añaden a la mezcla 160 ml de agua. La solución diluída es centrifugada a 12.000 rpm durante 10 min para eliminar las materias sólidas, incluyendo las células. El líquido que sobrenada es neutralizado con HCl 3N, tras lo cual se separan sedimentos de gel. Los sedimentos son recogidos por centrifugación y lavados con agua hasta que se eliminan las sales contenidas en ellos. Luego se vuelven a centrifugar los sedimentos para recoger el polisacárido deseado. La deshidratación con acetona y el secado bajo presión reducida producen 4,4 g de PS. El rendimiento en relación a la glucosa sustrato es 55%.

Experimento A

25 Efecto del tratamiento previo de una sus-
21.11.73.

410007



pensión de polisacárido.

(A-1) Cantidad de CaCl_2 frente a la viscosidad de la solución alcalina del polisacárido

5 El caldo de fermentación de PS obtenido por el método descrito en la Referencia fue diluido con agua y se añadió NaOH 10N a porciones del caldo diluido, en cantidades que pudiesen dar las concentraciones de álcali de 0,4N y 0,8N, respectivamente.

10 Los sistemas fueron agitados durante unas pocas horas, para obtener soluciones alcalinas que tuviesen una concentración de PS de 1,5% (peso/volumen). Aunque las viscosidades de cada dilución al principio de la disolución en álcali fueron significativamente altas, disminuyeron gradualmente con el lapso del tiempo de disolución, y alcanzaron ciertos valores constantes de aproximadamente 80 a 90 centipoises en aproximadamente unas pocas horas. A cada una de las soluciones alcalinas de PS que habían sido equilibradas así se añadieron cantidades variables de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, es decir, de 15 20 0,5% (peso/volumen) (0,034 moles/litro) a 6,0% (peso/volumen) (0,276 moles/litro). Los cambios de viscosidad resultantes de las soluciones alcalinas de PS se muestran en la Tabla 1.

21.11.73.

3-7-74.

Tabla 1 - Cambios de viscosidad (cps) de soluciones alcalinas de PS por adición de una cantidad variable de CaCl_2

Cantidad de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

% (peso/volumen)	0	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5	2,0	2,5	4,3	6,0
Tanto por ciento de PS (moles/litro)	0	0,023	0,034	0,046	0,057	0,068	0,092	0,115	0,203	0,276
Viscosidades del sistema de PS según se disuelve en NaOH 0,4N (cps)	83	91	16	16	16	16	21	40	11	11
Viscosidades del sistema de PS según se disuelve en NaOH 0,8N (cps)	89	1.880	21	15	13	16	16	20	-	-

cps: centipoises

28 230



418001



Los resultados anteriores indican que mientras que la viscosidad de una solución alcalina de PS más bien aumenta cuando la cantidad de CaCl_2 es pequeña, se puede alcanzar una significativa depresión de la viscosidad por adición de 0,045 moles/litro o

5 más de CaCl_2 cuando la concentración de PS es 1,5% (peso/volumen), es decir, 0,03 moles/litro de la solución de CaCl_2 en relación a 1% (peso/volumen) de PS.

10 (A-2) Cantidad de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ frente a la viscosidad de la solución alcalina de polisacárido

Un polvo purificado de PS fue suspendido uniformemente en agua y disuelto en NaOH 0,4N. La concentración de PS fue 2% (peso/volumen). A esta solución alcalina de PS se añadió una cantidad variable de

15 $\text{Ca}(\text{OH})_2$, suspendida en una pequeña cantidad de agua, según se indica en la Tabla 2, y luego se midió la viscosidad de la solución.

21.11.73.

3-7.74.

Tabla 2

Cantidad de Ca(OH)_2	Cantidad (% peso/volumen)													
	0	0,15	0,25	0,35	0,45	0,50	0,55	0,65	0,75	0,85	1,0	1,5	2,0	3,0
por 1% de PS (moles/litro)	0	0,01	0,017	0,024	0,031	0,034	0,036	0,044	0,050	0,058	0,068	0,100	0,135	0,200
Viscosidad de la solución alcalina de PS (cps)	30	2.000	3.000	5.000	100	73	22	4,8	4,3	4,0	4,0	4,0	4,2	4,0

28



419537

28



En este caso se inicia en la viscosidad una depresión gradual cuando la cantidad de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ alcanza aproximadamente 0,03 moles/litro por tanto por ciento de PS.

- 5 (A-3) Cambios en la viscosidad de la solución alcalina del polisacárido gelificable térmicamente (principal ingrediente Pachyman) contenido en Poria cocos Wolf, causados por la adición de CaCl_2

10 Treinta gramos del polvo obtenido por extracción con álcali de una preparación cruda de Poria cocos Wolf fueron suspendidos uniformemente en agua y disueltos con NaOH, dando 1.000 ml de una solución 0,4N. En este estado, la solución alcalina de polisacárido tenía una viscosidad de 18 centipoises. La viscosidad de la solución fue disminuída a 5 centipoises cuando se añadieron 0,1 moles de CaCl_2 y se disolvió.

15 Experimento B
Efecto de la sal soluble en agua de calcio, magnesio y cinc para concentrar la suspensión de polisacárido

20 (B-1)

Experimento 1

Cantidades de CaCl_2 y viscosidad de la solución alcalina y de la suspensión neutralizada de PS.

(1) Cantidades de CaCl_2 añadidas y viscosidades de la solución alcalina (NaOH 0,2N) y de la suspensión

25
3.7.74.

4196

29



neutralizada de PS cuando la concentración inicial de PS es 1,5%.

El polvo de PS fue suspendido uniformemen
te en agua para preparar una suspensión al 1,5%, y se
5 disolvió CaCl_2 en ella. Después se hizo la solución al
calina hasta 0,2 N respecto a NaOH, y se dejó reposar
a 30°C durante 1 hora. La viscosidad de esta solución
alcalina fue medida y luego se hizo separar el PS por
adición de HCl 4 N (a pH 6). Luego se midió la viscosi-
10 dad de esta suspensión neutralizada. Las medidas de vis-
cosidad se hicieron mediante un viscosímetro Tokyo
Keiki modelo B, dentro del intervalo indicado de 60-6
rpm. Los resultados se exponen en la tabla. En la ta-
bla, p/v significa tanto por ciento en peso/volumen
15 (lo mismo es válido para más adelante).

21.11.73.

21.11.73.

Tabla 3

Cantidad de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ añadida	moles/litro											
	0	0,01	0,02	0,03	0,045	0,06	0,075	0,09	0,12	0,15		
	0	0,15	0,30	0,44	0,66	0,88	1,1	1,32	1,76	2,21		
Viscosidad de la solución alcalina (NaOH 0,2 N) (centipoises)	15,8	42,5	4,5	1,3	1,5	1,4	0,8	0,7	0,5	0,5		
	16,0	92,0	18,0	3,5	2,3	2,1	1,6	1,3	1,3	1,3		
Viscosidad de la suspensión neutralizada de PS (centipoises)	5.000	3.200	1.260	700	265	52	5,8	4,3	3,1	2,6		
	30.000	19.000	11.000	5.400	1.500	250	15,0	11,0	7,5	5,9		

41037

29



41063



Los resultados anteriores indican que, respecto a la cantidad de CaCl_2 añadida, la viscosidad de la solución alcalina tiene un cierto pico y si se añade CaCl_2 en concentraciones más allá de un umbral correspondiente a este pico, y luego se permite que se separe PS dentro del intervalo de baja viscosidad más allá de dicho pico, se facilita la operación. Además, aún cuando la concentración de PS es bastante alta, la adición de CaCl_2 tiene como resultado una reducción sustancial de la viscosidad.

(B-2) Cantidades de CaCl_2 añadidas y aptitud del PS para la sedimentación y concentración de PS en la sedimentación

(1) El polvo de PS fue suspendido uniformemente en agua (1,5% (p/v)) y luego se añadió CaCl_2 y se disolvió allí en concentraciones variables, como se indica a continuación en la tabla. Cada una de las soluciones se hizo alcalina (hasta NaOH 0,2 N) y se dejó reposar a 30°C durante 1 hora. Luego se añadió HCl 4N a la solución para hacer que se separase el PS (pH 6). Después se diluyó la solución hasta una concentración de PA de 0,03% (p/v) y se examinaron la velocidad de sedimentación y la eficacia de concentración de la dilución.

Los resultados se exponen en la siguiente

Tabla 4.

26
21.11.73.

3.7.74.

Tabla 4

Volumen de sedimentación de PS	Cantidad de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ añadida		moles/litro		0	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15	Condiciones
	0	Tiempo de reposo en horas	% p/v	% p/v							
0	0	0	0,44	0,88	1,32	1,76	2,21				Recipiente: cilindro calibrado de 100 ml Altura de la capa de líquido: 16 cm Concentración de PS: 0,3% (100 ml) Temperatura ambiente 5.500 G 10 min.
0,5	0	0	0,44	0,88	1,32	1,76	2,21				
1,0	0	0	0,44	0,88	1,32	1,76	2,21				
2,0	0	0	0,44	0,88	1,32	1,76	2,21				
3,0	0	0	0,44	0,88	1,32	1,76	2,21				
4,0	0	0	0,44	0,88	1,32	1,76	2,21				
5,0	0	0	0,44	0,88	1,32	1,76	2,21				
	0	0	0,44	0,88	1,32	1,76	2,21				
	0	0	0,44	0,88	1,32	1,76	2,21				
	0	0	0,44	0,88	1,32	1,76	2,21				
Concentración de PS en sedimento de centrifugación, % (p/v)	1,90	2,67	3,07	3,59	4,23	4,77					

4 1 1 1 1



419671



Los resultados anteriores indican que a medida que se aumenta la cantidad de CaCl_2 pasa a la porción de sedimentación una cantidad en aumento de PS, es decir, se perfecciona la velocidad de sedimentación de PS y se hace más fácil la operación. También se ha hallado que a medida que aumenta la cantidad de CaCl_2 se puede efectuar con mayor facilidad la concentración de la solución.

(2) El polvo de PS fue suspendido uniformemente en agua en cantidades variables, como se muestra a continuación, y luego se añadió CaCl_2 y se disolvió en él hasta concentración variable, como se indica en la Tabla 5. Cada una de las soluciones fue hecha alcalina (NaOH 0,2N) y se la dejó reposar a 30°C durante 1 hora. Luego se añadió HCl 4N a la solución, para hacer que se separase el PS (pH 6,0), que fue centrifugado con 8.500 G durante 10 minutos.

Se midieron las concentraciones de PS, en % (p/v), en las tortas resultantes.

21.11.73.

21.11.73.

Tabla 5

Cantidad de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	moles/litro		0	0,03	0,09	0,15	0,45	0,75	1,2
	Concentración de PS de partida % (p/v)	% p/v							
0,68 %	1,45	2,40	4,75	6,48	6,25	-	-	-	-
1,35	2,16	3,25	5,50	7,00	6,55	-	-	-	-
1,80	2,72	3,95	6,00	7,01	6,79	6,55	6,55	6,55	5,72
2,70	3,69	4,33	6,34	7,49	7,38	6,98	6,98	6,98	6,09
4,50	5,45	6,13	7,87	8,50	8,40	7,99	7,99	7,99	7,08
6,00	7,20	7,70	9,18	9,70	9,40	8,42	8,42	8,42	8,03
6,50	7,35	7,80	9,21	9,65	9,36	8,44	8,44	8,44	8,12

Nota: Cuando la concentración de PS de partida excedió de 6,5% (p/v), la viscosidad de la suspensión de PS fue tan alta que apenas se pudo efectuar el experimento.

419087

29





La Tabla 5 muestra que a medida que aumen
ta la cantidad de CaCl_2 se hace mejor la aptitud del PS
para sedimentar, y se hace mayor la concentración de PS
en las tortas centrifugadas. Sin embargo, cuando la can
5 tidad de CaCl_2 excede de 0,75% (p/v), la eficacia de
concentración de PS, en términos de CaCl_2 , cae notable-
mente.

(B-3) Viscosidades de una suspensión neutralizada de PS
con ácido y tipos de sal de calcio

10 El polvo de PS fue suspendido uniformemen
te en agua para preparar una suspensión al 1,5% (p/v).
Luego se incorporó una de las sales de calcio indicadas
a continuación en la tabla, y fue suspendida en la an-
terior suspensión, en cantidad de 0,075 moles/litro (el
15 pH de la suspensión tras esta adición se indica en la
tabla como pH inicial). La suspensión fue hecha alcali-
na hasta 0,2N, en términos de NaOH, y se midió su visco
sidad tras 1 hora de reposo a 30°C. Luego se hizo que
se separase el PS por adición de HCl 4N (pH 6), y se
20 midió la viscosidad de la suspensión resultante. Los
efectos de la adición de estas diversas sales de calcio
fueron comparados luego entre sí. Los resultados se ex-
ponen a continuación.

21.11.73.

21.11.73.

Tabla 6

Sal de Ca	Cantidad de sal de Ca moles/litro (% p/v)	pH inicial, inmediatamente después de la adición de sal de Ca	Viscosidad de la solución alcalina (centipoises)	Viscosidad de la suspensión neutralizada de PS (centipoises)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,075 (1,1)	6,3	0,8-1,6	5,8-15
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	0,075 (0,56)	13,0	4,1-4,3	32-112
CaCO_3	0,075 (0,75)	8,0	13,3-15	2.400-19.000
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,075 (1,29)	10,0	20-23	3.500-35.000

- 3 -

41937

20



419637



Por el anterior experimento será evidente que la sal de calcio más eficaz es el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, seguido por $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

(B-4) Sales metálicas distintas de sales de calcio

5 (1) Cantidades de MgCl_2 añadidas y viscosidades de la solución alcalina de NaOH y de la suspensión neutralizada de PS

El polvo de PS fue suspendido uniformemente en agua para preparar una suspensión al 1,5% (p/v) y se disolvió MgCl_2 en porciones de la suspensión, hasta las concentraciones indicadas a continuación en la Tabla. Cada una de las soluciones fue alcalinizada hasta NaOH 0,2N y se la dejó reposar a 30°C durante 1 hora. Se midió la viscosidad de la solución alcalina. Luego se añadió a la solución HCl 4N para precipitar el PS (pH 6), y se midió la viscosidad de la suspensión resultante de PS.

Los resultados se exponen en la tabla siguiente.

21.11.73.

3.7.74.

Tabla 7

Cantidad de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ añadida	moles/litro	0	0,0089	0,0157	0,0255	0,0442	0,060	0,0738	0,133	0,25	0,5	0,75
	% p/v	0	0,18	0,32	0,54	0,9	1,2	1,5	2,7	5,3	10,6	15,9
Viscosidad de la solución alcalina de NaOH 0,2 N (centipoises)		15,8	25	51	75	94	69	4	2,4	2,1	2,0	2,1
		16	43	115	200	275	258	13	5,8	3,6	2,7	2,5
Viscosidad de la suspensión neutralizada de PS (centipoises)		5.000	2.500	1.160	1.000	1.040	81	2,9	1,5	2,1	1,9	1,8
		30.000	18.000	11.140	8.000	10.000	350	9	1,8	2,4	2,2	2,3

41067

28



419637



(2) Cantidades de $ZnCl_2$ añadidas y viscosidades de la solución alcalina de NaOH y de la suspensión neutralizada de PS

5 El polvo de PS fue suspendido uniformemen-
te en agua y se incorporó $ZnCl_2$ y se disolvió en porcio-
nes alícuotas de la suspensión, hasta las concentracio-
nes indicadas a continuación en la tabla.

10 Cada uno de los fluidos fue neutralizado
hasta pH 7 con NaOH, y luego alcalinizado hasta NaOH
0,2N. Se dejó reposar la solución a 30°C durante 1 hora,
y se midió su viscosidad (en esta etapa la concentra-
ción de PS era 1,5%). Luego se precipitó el PS por adi-
ción de HCl 4N (a pH 6), y se midió la viscosidad de la
suspensión neutralizada de PS. Los resultados se expo-
nen a continuación.

15

21.11.73.

3.7.74.

Tabla 8

Cantidad de ZnCl ₂ añadida	moles/litro	0	0,0147	0,0294	0,0587	0,1173	0,176	0,264	0,352	0,44	0,514
	% p/v	0	0,2	0,4	0,8	1,6	2,4	3,6	4,8	6	7
Viscosidad de la solución alcalina de NaOH 0,2N (centipoises)		15,8	13,6	21	42	200	840	180	4,5	110	223
Viscosidad de la suspensión neutralizada de PS (centipoises)		16	14	22,5	60	575	3.000	1.600	11,6	200	300
Viscosidad de la suspensión neutralizada de PS (centipoises)		5.000	820	1.140	950	1.240	1.060	1.000	3,8	65	80
		30.000	6.200	10.800	5.200	7.000	10.400	6.400	13,8	400	600

419837

28



419577



28

5 Los resultados anteriores indican que el efecto de las sales de Mg y Zn sobre el PS es análogo al efecto de las sales de Ca. Así, estas sales metálicas también son aplicables en el procedimiento de la presente invención.

10 (B-5) Cantidades de CaCl_2 añadidas y viscosidades de la solución alcalina y del líquido que contiene polisacárido tras la precipitación (se empleó polisacárido gelificable térmicamente presente en el Poria cocos Wolf (principal constituyente: Pachyman))

En 1.000 ml de agua se suspendieron uniformemente 30 g de polvo de Poria cocos Wolf.

15 Luego se alcalinizó la suspensión hasta NaOH 0,4N, con lo que se disolvió el polvo (24 horas). Con adición de tierra de diatomeas como coadyuvante de filtración, se filtró la solución, obteniéndose 900 ml de filtrado. A este filtrado se añadió HCl 4N, con lo que se hizo que se separase el polisacárido (pH 6). En este líquido se disolvió $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hasta las concentra-
20 ciones indicadas a continuación en la tabla. Cada una de las soluciones fue hecha alcalina hasta NaOH 0,2N, y se dejó reposar a 30°C durante 1 hora. Luego se midió la viscosidad de la solución. Después se añadió a la solución HCl 4N para precipitar el polisacárido (pH 6) y se midió la viscosidad del líquido resultante. Los
26 resultados se exponen a continuación.

3.7.74.

3.7.74.

Tabla 9

Cantidad de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	moles/litro	0	0,01	0,02	0,03	0,06	0,09	0,12
	% p/v	0	0,15	0,30	0,44	0,88	1,32	1,76
Viscosidad de la solución alcalina de NaOH 0,2 N (centipoises)		40	740	1.500	1.020	1.000	640	1.060
		44	3.300	5.300	3.500	3.400	1.500	2.900
Viscosidad de la suspensión neutralizada de PS (centipoises)		6.000	5.300	1.900	1.260	1.100	1.000	1.100
		51.000	42.000	15.500	6.600	6.000	6.400	6.800

419637

28 AGO



419531



28 AGO. 1974

Los resultados anteriores indican que, justamente igual que en el caso del polvo de PS, la adición de CaCl_2 causa reducciones de la viscosidad. Este hecho sugiere que el efecto de adición de CaCl_2 es común a los polisacáridos gelificables térmicamente, compuestos predominantemente por beta-1,3-glucano.

Ejemplo

A. Tratamiento previo de la suspensión de polisacárido

1.000.000 de partes en volumen de caldo de fermentación de PS (concentración de PS: 3,4% (p/v)) fueron tratadas con NaOH mientras se agitaba a 30°C durante 5 horas, dando 2.000.000 de partes en volumen de una solución alcalina que tiene una concentración final de PS de 1,7% (p/v) y una alcalinidad de 0,4N. La viscosidad de esta solución era 50 centipoises. Luego se añadieron 30.000 partes en peso (0,06 moles/litro/tanto por ciento de PS) de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, en forma de solución del mismo, a la anterior solución alcalina de PS obtenida.

Tras 20 min de agitación se halló que la viscosidad de la solución era 5 centipoises. La solución alcalina cuya viscosidad se había disminuído de esa forma fue centrifugada a 8.000 G mediante una centrifuga de disco-cuba, para eliminar las impurezas insolubles que estaban compuestas principalmente de células

3.7.74.

419637



y Ca(OH)_2 . Este método produjo 1.800.000 partes en volumen de una solución de PS (concentración de PS: 1,7% (p/v)). Se añadió a esta solución HCl 4N para hacer que el PS se separase. Así, se obtuvieron 2.000.000 de partes en volumen de una suspensión de PS (pH 6,0, concentración de PS: 1,5% (p/v)). Esta suspensión de PS fue sometida a un método de concentración según el método de la presente invención.

B. Concentración de la suspensión de PS

10 Se disolvió $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en la suspensión de PS (concentración de PS: 1,5% (p/v)) obtenida por el tratamiento previo de la Etapa A, hasta una concentración de 0,09 moles/litro (concentración de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1,32% (p/v)), y la solución fue llevada a solución alcalina de NaOH 0,2N. Tras mantener una hora a 30°C se añadió HCl a la solución para hacer que se separase el PS (pH 6,0), y con el fin de eliminar sales y lavar el sistema fue diluido con agua a 10.000.000 de partes en volumen. La dilución fue sometida luego a eliminación de sales, lavada y concentrada mediante una centrífuga de cuba de disco, para obtener 1.000.000 de partes en volumen de concentrado (I) (concentración de PS: 2,8% (p/v)).

25 La concentración fue diluida de nuevo con agua y concentrada de nuevo y separada usando la misma

3.7.74.

419637

29



centrífuga, con lo que se obtuvieron 700.000 partes en volumen de concentrado (II) (concentración de PS: 3,8% (p/v)). Este concentrado fue deshidratado con un secador de pulverización para obtener 27.000 partes en peso de polvo seco (pureza del PS: 95%; contenido de agua 5%).

En el ejemplo anterior la relación entre parte(s) en peso y parte(s) en volumen es la misma que entre gramo(s) y mililitro(s).

La presente solicitud que corresponde a las presentadas en Japón, el 16 de Octubre de 1972, bajo el Nº 103378/72 y 20 de Noviembre de 1972, bajo el Nº 116467/72, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

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

18
21.11.73.

419637



5 1ª.- Procedimiento para concentrar una sus-
pensión de un polisacárido térmicamente gelificable, com-
puesto predominantemente por beta-1,3-glucano, que com-
prende disolver una sal soluble en agua de calcio, mag-
nesio o cinc, en cantidad comprendida entre 0,03 y 0,75
moles/litro, en una suspensión de dicho polisacárido;
hacer luego alcalina la suspensión, para disolver el po-
lisacárido suspendido; añadir un ácido a la solución re-
sultante, para precipitar el polisacárido; y finalmente
10 separar y recoger éste.

2ª.- Procedimiento según la reivindica-
ción 1ª, donde la cantidad de sal de magnesio está com-
prendida entre 0,06 y 0,25 moles/litro.

15 3ª.- Procedimiento según la reivindica-
ción 1ª, donde la cantidad de sal de cinc está compren-
dida entre 0,35 y 0,45 moles/litro.

4ª.- Procedimiento según la reivindica-
ción 1ª, donde dicha sal soluble en agua de calcio, mag-
nesio o cinc es su cloruro o hidróxido.

20 5ª.- Procedimiento según la reivindica-
ción 1ª, donde el pH de la solución alcalinizada es ma-
yor que 12.

6ª.- Procedimiento según la reivindica-
ción 1ª, donde la concentración de polisacárido gelifi-
cable térmicamente en la suspensión de partida no es ma-
25

21.11.73.

me

410000

29



por que 6,5% (peso/volumen).

5 7ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, donde la suspensión de partida es purificada antes de someterla al método de concentración posterior, alcalinizando la suspensión por encima de pH 12, de manera que se disuelva el polisacárido suspendido; añadiendo a la solución resultante de 0,03 a 0,2 moles/litro, por tanto por ciento de dicho polisacárido, de cloruro cálcico o hidróxido cálcico, para disminuir la
10 viscosidad de dicha solución de polisacárido; eliminando de ella los contaminantes insolubles; y añadiéndole un ácido para volver a conseguir una suspensión del polisacárido.

15 8ª.- Un procedimiento para concentrar una suspensión de un polisacárido térmicamente gelificable.

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

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

29 NOV 1973

Madrid,

P. A.

Alfredo de Eizaburu
[Handwritten signature]

G.D.S.
21.11.73.

[Handwritten initials]