

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



| | | |
|---------|---|---------|
| (19) ES | (11) NÚMERO 445739 | (10) AI |
| (21) | (22) FECHA DE PRESENTACION 3-3-76 | |

P.- 62.476
63/76 CL

PATENTE DE INVENCION

| | | |
|--|----------------------------------|--|
| (30) PRIORIDADES: | | |
| (31) NUMERO | (32) FECHA | (33) PAIS |
| 75/06734 75/39975 | 4-3-1975 29-12-1975 | Francia " |
| (47) FECHA DE PUBLICIDAD | (51) CLASIFICACION INTERNACIONAL | (62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
| | C12B | |
| (64) TITULO DE LA INVENCION | | |
| "PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE UN PRODUCTO GELIFICANTE PARA EMPLEO EN UN MEDIO DE CULTIVO" | | |
| (71) SOLICITANTE (ES) | | |
| GECA S.A. | | |
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE | | |
| 11, Avenue Morane Saulnier, VELIZY VILLACOUBLAY, Yvelines, Francia | | |
| (72) INVENTOR (ES) | | |
| Horst Kragew | | |
| (73) TITULAR (ES) | | |
| | | |
| (74) REPRESENTANTE | | |
| DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ | | |



Es conocida la influencia sobre el comportamiento técnico de ciertos geles industriales obtenidos a partir de algas rojas, tales como carragenano o furcellarano, o por síntesis microbiana, tal como el xantano, por introducción en los mismos de una galactomanana.

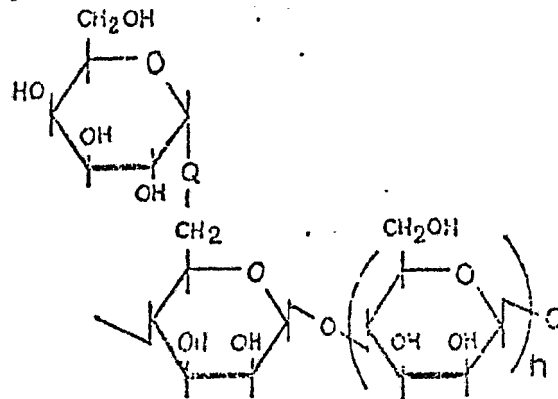
Es sabido que las galactomananas son cuerpos polisacáridos que se pueden obtener a partir de granos de leguminosas, tales como: Espina Corona, Tara, Dalonix Regia, Algarroba, Ceratonia Siliqua, Gleditsia-Triacanthos, etc. Las galactomananas extraídas de estos granos se presentan en forma de extractos acuosos o de harinas que pueden utilizarse como espesantes, y también para formar geles en medio acuoso.

Se ha podido establecer que estos cuerpos están constituidos, aparte de las impurezas (proteínas, cuerpos grasos, hemicelulosa, etc.), exclusivamente por manosa y galactosa; el porcentaje de galactosa varía entre 10 y 50% como sigue:

| | <u>Manosa</u> | <u>Galactosa</u> |
|---------------|---------------|------------------|
| Algarroba | 80% | 20% |
| Tara | 78% | 22% |
| Espina Corona | 70% | 30% |
| Guar | 60% | 40% |

Estudios realizados han demostrado que estos cuerpos podían representarse por una fórmula desarrollada constituida por una cadena principal de moléculas de D-manosa unidas en β (1 \rightarrow 4) sobre la cual están ramificadas moléculas de D-galactosa unidas en α (1 \rightarrow 6), siendo la fórmula de la forma siguiente:

22 MAR 1976



Guar $n = 1$
 Algarroba $n = 3$

5

10

La invención considera más particularmente la utilización como gelificante de medios de cultivo de una galactomanana en mezcla con el gel conocido bajo la denominación de agar o agar-agar y obtenido igualmente a partir de algas rojas.

15

El agar está constituido por dos fracciones diferentes:

- la agarosa, polisacárido neutro,
- y la agarpectina, polisacárido caracterizada por el grupo sulfato.

20

El agar encuentra su aplicación principalmente en bacteriología como gelificante de los medios de cultivo. A este efecto, se incorporan al soporte sustancias nutritivas, se esteriliza el conjunto a temperatura elevada, y luego, después de enfriamiento parcial, se vierte el líquido en una caja Petri esterilizada y se siembra, antes de la gelificación, con los microorganismos a identificar.

25

El soporte bacteriológico debe presentar las cualidades siguientes:

- poder gelificante elevado,
- transparencia en solución líquida,

30



- proporción mínima de SO_4 ,
- ser líquido a $42^{\circ}C$ (temperatura de sembrado) para permitir un reparto uniforme de los gérmenes,
- ser sólido a $37^{\circ}C$ (temperatura de incubación)
- ser resistente a los ataques bacterianos.

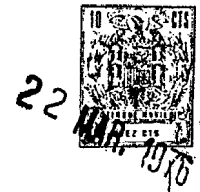
5 Se ha descubierto que la sustitución, de acuerdo con la invención, de una parte del agar (o agar-agar) por galactomanana puede efectuarse en proporciones que pueden
10 llegar a ser hasta del 80% y que, hasta el 40%, no implican cambio alguno fundamental en el comportamiento del gel: temperatura de solubilización, gelificación, comportamiento durante la incubación, y viscosidad; pero que, además, esta sustitución proporciona las ventajas esenciales de un mejo-
15 ramiento, a igualdad de espesor, de la transparencia del gel y de una disminución del contenido de iones SO_4 .

Así:

- para un espesor aumentado en un 25%, la mezcla 80/20 agar/extracto de algarroba tiene la misma transparen-
20 cia que el agar puro;
- para un espesor aumentado en un 50%, la mezcla 60/40 agar/extracto de algarroba tiene la misma transparen-
cia que el agar puro.

25 Por otra parte, para aplicaciones en bacteriología, la presencia de iones sulfato en el gel de agar es un inconveniente grave y, por esta razón, los fabricantes se-
paraban hasta el momento presente de modo muy costoso la agarosa y la agarpectina.

30 La adición al agar de una goma neutra reduce la proporción final de iones SO_4 contenidos en la agarpectina,



lo que permite como consecuencia utilizar el agar en su forma normal, sin tener que efectuar previamente la separación de la citada agaropectina.

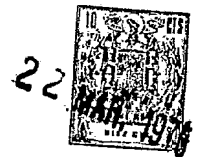
La fuerza del gel complejo obtenido conforme a la invención puede medirse por medio del "Bloom-gelometer"; la cifra indicada como resultado corresponde al peso necesario para hundir el pistón (de 12,5 mm de diámetro) 4 mm en el gel.

| | <u>Gelificantes</u> | <u>Fuerza del gel</u> |
|----|-------------------------------------|-----------------------|
| 10 | 1% de agar | 400 g |
| | 0,8% de agar + 0,2% de algarroba | 450 g |
| | 1% de agarosa | 670 g |
| | 0,8% de agarosa + 0,2% de algarroba | 800 g |

Por último, la sustitución parcial del agar por galactomanana presenta la ventaja de rebajar el coste de fabricación del gel en una fuerte proporción, habida cuenta del precio de los agares.

Ensayos realizados han demostrado que las ventajas buscadas, fuerza del gel mejorada, mejor transparencia de las soluciones y de los geles, y menor concentración de cargas iónicas, se obtenían tanto más netamente cuando se trataba de extractos purificados de los granos, de algarroba o similares, que proporcionaban las galactomananas. No obstante, estos extractos purificados producen en solución en agua líquidos viscosos.

(Debe entenderse que en lo que se expone a continuación se utilizará la expresión "extracto de algarroba" por razones de simplificación, pero que se pueden obtener resultados análogos o idénticos a partir de extractos de



otras plantas que proporcionan las galactomananas, particularmente las enumeradas anteriormente y, en especial, los granos de tara y de espina corona).

5 En ciertas aplicaciones de bacteriología, la viscosidad antes de la gelificación del complejo agar + extracto de algarroba es inconveniente para un reparto homogéneo de las bacterias para los manipuladores que tienen la costumbre de tratar el agar puro, cuyas soluciones son poco viscosas.

10 Según uno de sus aspectos, la invención permite remediar este defecto de alta viscosidad conservando al mismo tiempo las ventajas arriba mencionadas.

15 En efecto, es posible obtener por despolimerización controlada extractos de algarroba cuyo grado de polimerización es muy variable y que conducen a soluciones acuosas en las que, para una misma concentración, la viscosidad decrece con el grado de polimerización.

20 Cuando se han utilizado estos extractos de algarroba despolimerizados con agar para formar complejos gelificantes, se ha observado que las fuerzas de gel varían según el grado de polimerización del extracto de algarroba utilizado, pero a excepción de los extractos de algarroba muy despolimerizados se sobrepasan sin embargo las cualidades del agar puro conservándose al mismo tiempo las ventajas especificadas.

25 Se entienden por algarroba despolimerizada o harina de algarroba despolimerizada productos cuyo grado de polimerización se ha reducido por procedimientos físicos, químicos o bioquímicos, no obstante lo cual productos de grado de polimerización reducido pueden en ciertas condicio



nes obtenerse naturalmente (por ejemplo debido a condiciones atmosféricas defectuosas o de una recolección tardía).

Los procedimientos físicos consisten en una degradación por trituración, por ultrasonidos, o por medios análogos.

Los procedimientos químicos consisten en degradaciones por vía oxidante o ácida, en solución, en suspensión o en seco.

Los procedimientos bioquímicos son degradaciones por vía enzimática que rompen preferentemente los enlaces glicosídicos del polisacárido de la algarroba.

A título de ejemplo se describirá a continuación la despolimerización en medio ácido y en suspensión en alcohol de un extracto de algarroba:

el extracto de algarroba (100 g) se mantiene en suspensión bajo agitación en dos litros de alcohol isopropílico; se lleva a reflujo y se acidifica con HCl (N); seguidamente, se mantiene a reflujo durante períodos de tiempo variables. A continuación se neutraliza, se separa el extracto de algarroba y se lava con alcohol isopropílico limpio.

Tabla de viscosidades de las soluciones al 1% de extracto de algarroba despolimerizado según el grado de despolimerización.

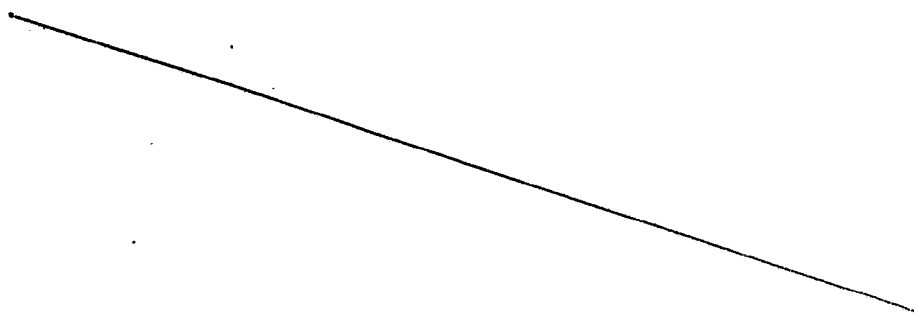




Tabla I

| Duración del calentamiento en minutos Cm ³ de HCl (normal) | 0 | 7 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
|--|--------------------|------|-----|-----|-------|-----|----------------|
| 0 | 2800 cps (*) | | | | | | |
| 8 | | | | 950 | | | |
| 10 | | 1100 | 750 | 300 | 270 | 180 | 55-70 70-70 |
| 15 | | | | 125 | 60-80 | | |

(*) cps = centipoises

Las viscosidades mencionadas aquí y en lo que sigue se expresan en centipoises medidos a 25°C y a 20 revoluciones/min. con un viscosímetro Brookfield de tipo RVT en una solución al 1% de algarroba totalmente solubilizada por calentamiento a 90°C.

Ejemplo 1: Viscosidad y fuerza de gel de los medios de cultivo para mezclas 80/20

Se han comparado soluciones, por una parte al 1,2% de agar, y por otra parte al 1,2% de una mezcla constituida por 80% de agar y 20% de extracto de algarroba. Sobre estas soluciones con grados decrecientes de polimerización se ha medido la viscosidad a 43°C antes de la coagulación del gel. A continuación se ha determinado la cohe-



si3n del gel (fuerza a aplicar a un pist3n de 1,2 cm de diámetro para que atraviere el gel.)

Tabla II

5

10

15

20

25

30

| | | Geles agar-algarroba 80/20 al 1,2% en agua | |
|--|--|---|--------------------------|
| | Algarroba de diversos grados de polimerizaci3n utilizada, expresada por la viscosidad al 1% | Viscosidad a 43°C antes de la coagu- laci3n del gel | Cohesi3n del gel en g |
| | 3000 | 60 | 535 |
| | 2000 | 37 | 480 |
| | 1170 | 27,5 | 465 |
| | 900 | 25 | 450 |
| | 360 | 22,5 | 380 |
| | 150 | 21 | 360 |
| | 60 | 17,5 | 290 |
| | Agar solo al 1,2% | 17,5 | 320 |

Las curvas correspondientes se han representa-
do en la figura 1.

En la figura 1, en el eje de ordenadas se re-
presenta la cohesi3n/viscosidad, y en el eje de abscisas
la viscosidad al 1% de la agarroba utilizada.

La curva de trazo continuo representa la visco-
sidad antes de la gelificaci3n. La recta de trazo continuo
representa la cohesi3n del gel.



La recta horizontal de trazos discontinuos superior representa la cohesión del agar solo al 1,2%, en tanto que la recta horizontal inferior representa la viscosidad del agar solo al 1,2%.

5 De la tabla y la curva, se deduce que, incluso muy despolimerizado, el extracto de algarroba que sustituye en proporción del 20% al agar, refuerza el gel de agar excepto en el caso del extracto de algarroba con viscosidad de 60 al 1%.

10 Por otra parte, se observa que la viscosidad de los geles antes de su coagulación no aumenta mucho en tanto que se utilice extracto de algarroba cuya viscosidad no exceda de 1000 centipoises al 1%.

15 Al ser las fuerzas de gel superiores con las mezclas agar-algarroba, se puede utilizar menos de 1,2% de gelificante; por ejemplo, en el caso de una algarroba de 900 centipoises, es suficiente emplear 0,9% de complejo gelificante, y en este caso se obtiene la misma cohesión de gel que con el agar solo al 1,2% y una viscosidad de 22 centipoises.

20

Ejemplo 2: Viscosidad y fuerza de gel de los medios de cultivo para mezclas 70/30.

25

30

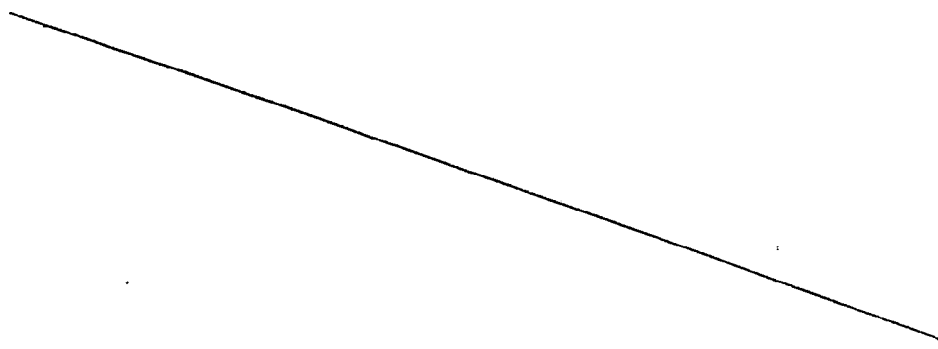




Tabla III

| | | Agar-algarroba 70/30 al 1,2% en agua | |
|--|------|--------------------------------------|-----------------------|
| Extracto de algarroba utilizado = Viscosidad al 1% | | Viscosidad a 43º | Cohesión del gel en g |
| 5 | | | |
| | 3000 | 130 | 640 |
| 10 | 2000 | 77 | 560 |
| | 1170 | 65 | 500 |
| | 900 | 50 | 390 |
| | 360 | 37,5 | 340 |
| | 150 | 23 | 320 |
| 15 | 60 | 17,5 | 260 |

Las curvas correspondientes se han representado en la figura 2.

20 - En la Figura 2 la curva de la parte superior representa la cohesión del gel y la de la parte inferior la viscosidad antes de la gelificación.

25 Se ve que, para lograr a la vez una viscosidad baja a 43°C y una fuerza de gel satisfactoria, el extracto de algarroba utilizado debe despolimerizarse de tal modo que su viscosidad esté comprendida entre 150 y 350 cps (centipoises).





1 REIVINDICACIONES

5 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:

10 1ª.- Procedimiento de fabricación de un producto gelificante para empleo en un medio de cultivo, que consiste en mezclar agar o agar-agar con galactomanana en una proporción que puede llegar a ser hasta el 80% de la mezcla total en galactomanana.

15 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, según el cual la galactomanana se somete antes de su mezcla a una operación de despolimerización por procedimientos físicos, químicos o bioquímicos.

20 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, según el cual los procedimientos físicos consisten en una degradación por trituración con ultrasonidos o medios análogos.

25 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, según el cual los procedimientos químicos consisten en degradaciones por vía oxidante o con ácido, en solución, en suspensión o en seco.

5ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, según el cual los procedimientos bioquímicos consisten en degradaciones por vía enzimática que cortan preferentemente los enlaces glicosídicos del polisacárido de la algarroba.

30 6ª.- Procedimiento de fabricación de un producto

[Handwritten signature]



1 gelificante para empleo en un medio de cultivo.

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

5 Esta Memoria consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 22 MAR. 1976

P.A.

Fernando de Elizaburu
Por Poder. *[Signature]*

10

15

20

25

30

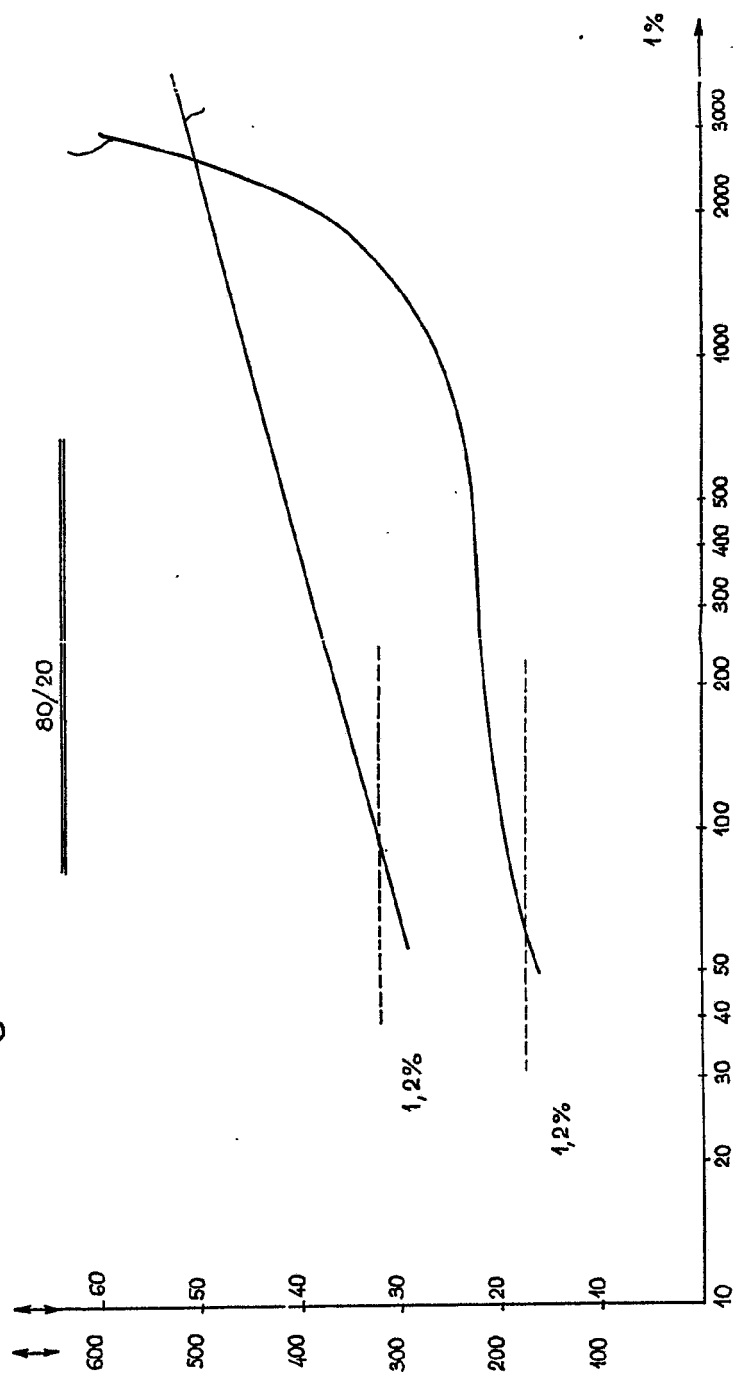
CNA. *[Signature]*

02-07-000

111

92

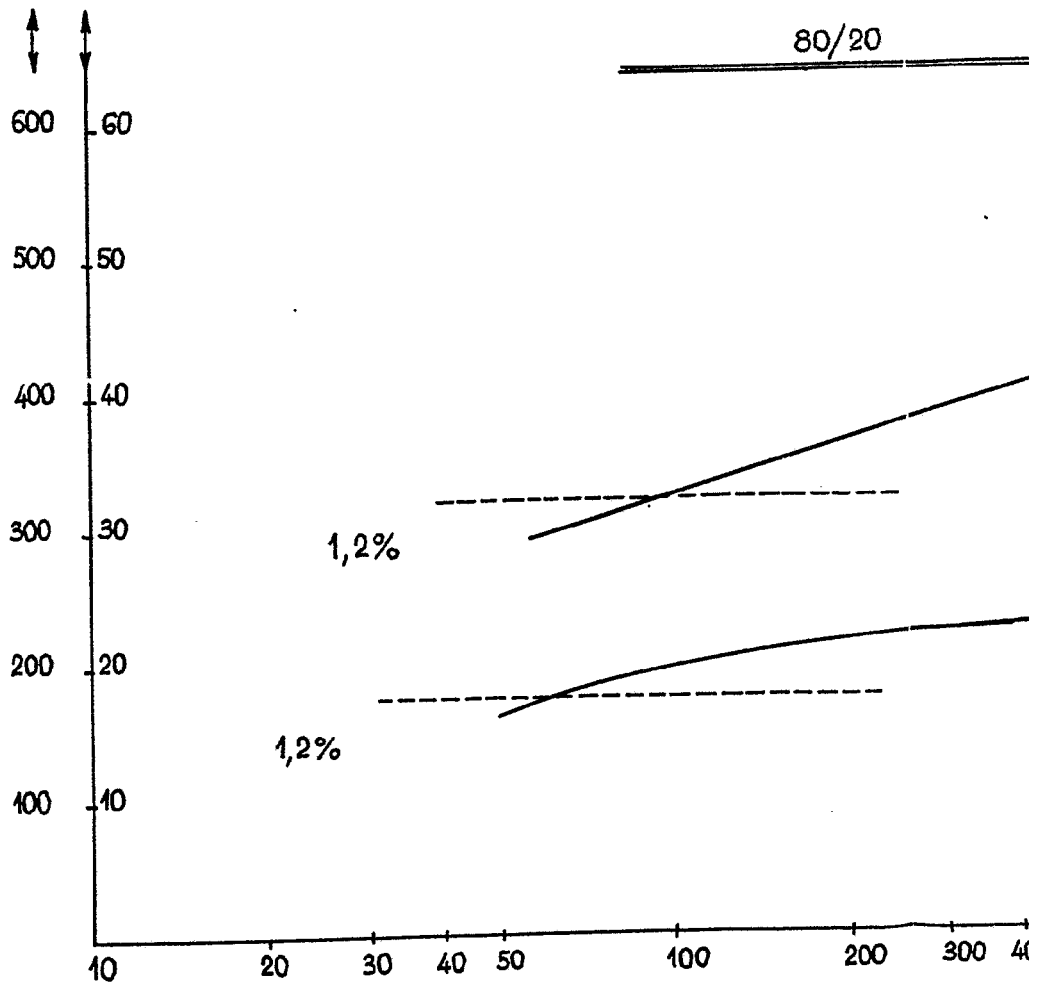
Fig-1



111

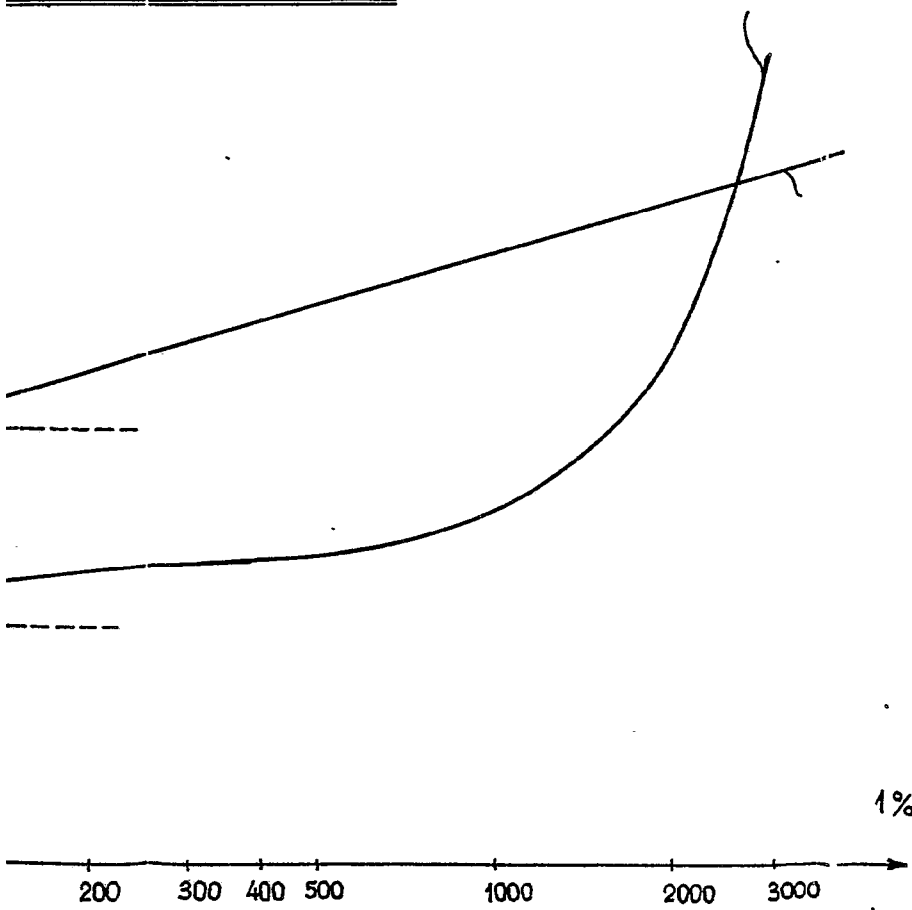
Fernando S. P. de Souza
P. M.

Fig- 1



22

80/20



Bernhard G. Fitzhugh

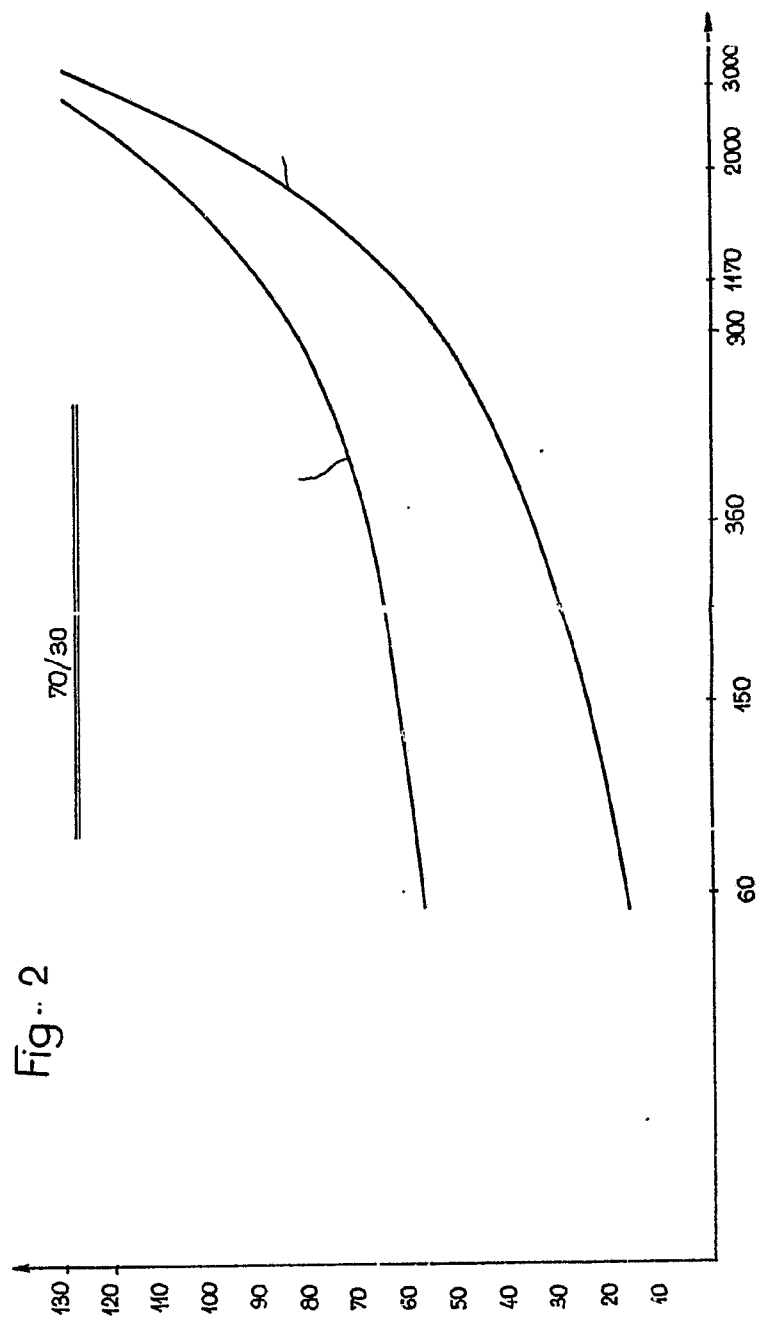


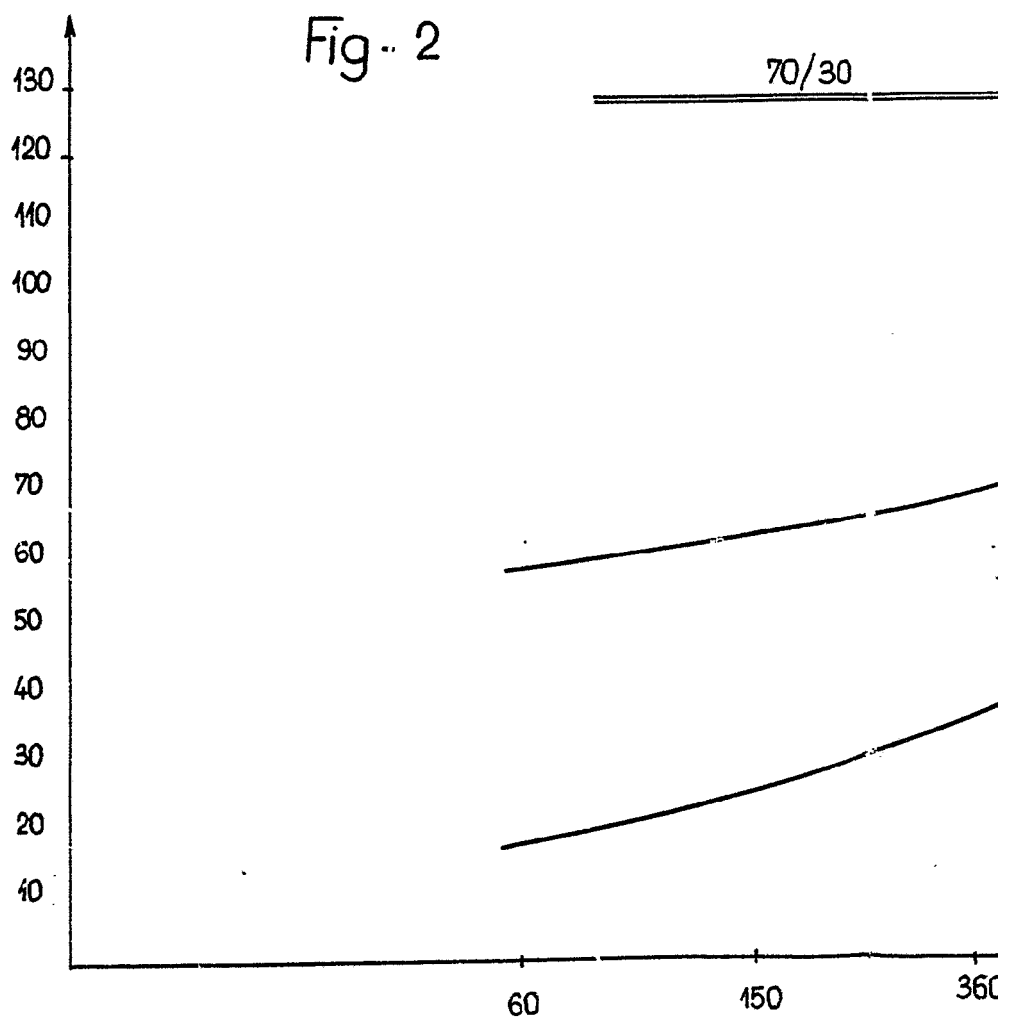
Fig. 2

70/30

22 MAR 58

11

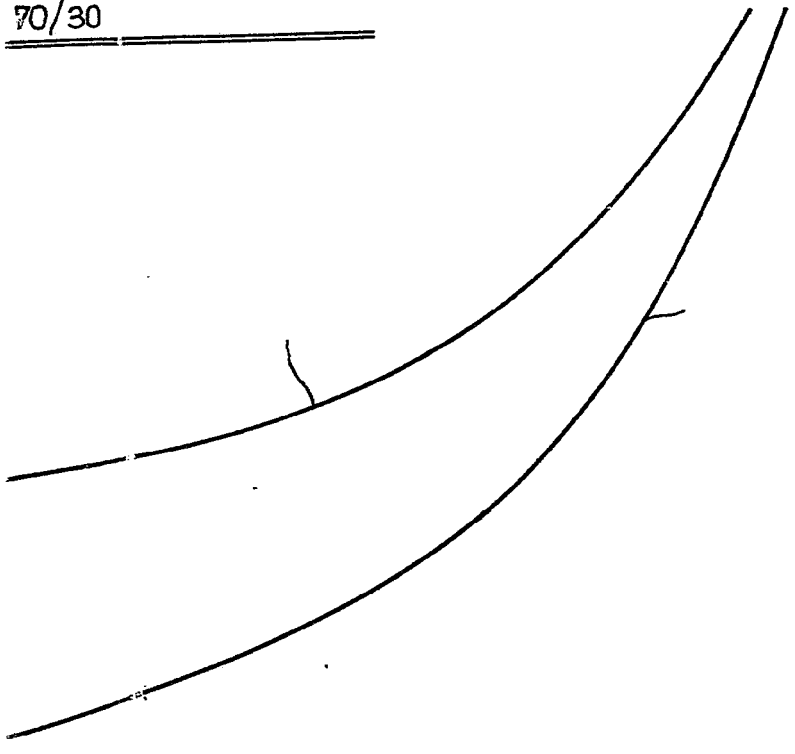
Fig. 2



02/27/2014

82 MMH

70/30



150 360 900 1170 2000 3000

Comanda de Pezburgh
 Per Poder

[Handwritten signature]