

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

10 ES	11	NUMERO	476854	10 A1
	21	FECHA DE PRESENTACION	15 ENE. 1979	

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

40 PRIORIDADES:	42 FECHA	43 PAIS
41 NUMERO		
78/01572	16.01.78	FRANCIA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C 12 D	

64 TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE POLISACARIDOS DE XANTHOMONAS ESPECIALMENTE APTOS PARA PREPARAR GELES QUE PRESENTAN BUENA FACILIDAD DE FILTRACION"

71 SOLICITANTE (ES)
RHONE-POULENC INDUSTRIES

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
75 PARIS 8e (Francia).- 22, Avenue Montaigne

72 INVENTOR (ES)
François CONTAT, Guy LARTIGAU y Oliver NICOLAS, que han cedido sus derechos a la firma solicitante.

73 TITULAR (ES)
RHONE-POULENC INDUSTRIES

74 REPRESENTANTE
D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.-

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención ha conseguido emplear polisa áridos producidos por fermentación de los glúcidos mediante un microorganismo del género Xanthomonas, para la
5. preparación de geles que presentan, por medio de adición de agua, buena facilidad de filtración.

Se sabe que para la producción de polisacáridos extracelulares por medio de microorganismos del género Xanthomonas, el medio de fermentación comprende ordinariamente una fuente de glúcidos, una fuente de fósforo, otra de magnesio que es un activador de enzimas, y finalmente, una
10. fuente de nitrógeno que habitualmente está constituida por "solubilizados de destilería" (patente americana nº 3 000 790); salvado o harinas de granos enteros, como el sorgo, soja o
15. maíz (patente americana 3 271 267), o también el "corn steep" (patente americana 3 355 447).

Sin embargo, estos productos que aportan el nitrógeno asimilable presentan el inconveniente de que introducen impurezas insolubles las cuales se encuentran en el polisacárido extraído del mosto fermentado. Estas impurezas además de comunicar cierta coloración y aspecto turbio al
20. gel acuoso reconstituido a partir del producto extraído, hacen que dicho gel no sea adecuado para ciertos empleos, por ejemplo, para la recuperación auxiliar del petróleo. Efectivamente, la presencia de impurezas poco solubles disminuye la
25. facilidad de filtración de los geles obtenidos a partir de estos polisacáridos y dificulta su penetración en los intersticios de las rocas.

Se han propuesto diversas técnicas de purifi-

cación consistentes, por ejemplo, en someter el mosto fermentado o bien el gel acuoso reconstituido a partir del polisacárido extraído del mosto, a operaciones de filtración sobre tierra de diatomeas y a la acción de enzimas tipo proteasa (patente francesa 2 264 077) o sosa (patente americana 3 729 460). Se ha comprobado que estas técnicas de purificación son costosas y muy poco satisfactorias.

Para la producción de polisacáridos mediante las bacterias de Xanthomonas, también se ha propuesto emplear un medio de fermentación que contiene una fuente de nitrógeno mineral completamente soluble (patente americana 3 391 060 y solicitud de patente francesa nº 76/05 933). Todavía así se obtienen resultados poco satisfactorios. Se ha observado, en efecto, que cuando la fermentación se desarrolla en un medio que no es perfectamente estéril, como es generalmente el caso de las operaciones industriales a media y gran escala; el empleo de una alimentación a base de nitrógeno mineral esencialmente, favorece el desarrollo de la contaminación en detrimento de las especies Xanthomonas. Dicha contaminación da lugar a un descenso notable del contenido de polisacárido en el medio de fermentación.

De conformidad con la presente invención, se ha visto que es posible la obtención de geles de polisacáridos que presentan claramente una mejor facilidad de filtración, con la condición de que se empleen los polisacáridos de Xanthomonas especialmente adaptados, como los que se producen por fermentación en presencia de una alimentación nitrogenada orgánica cuya cantidad se fija dentro de una zona muy precisa.

Más concretamente, esta invención ha logrado el empleo de polisacáridos como los que se obtienen utilizando un procedimiento que consiste en ejecutar las siguientes operaciones:

5. a) preparación del inóculo a partir de un cultivo de Xanthomonas;
 - b) seguida eventualmente de una etapa intermedia de crecimiento de los microorganismos;
 - c) y producción del polisacárido por inoculación, con la ayuda del cultivo obtenido en la etapa a) o llegado el caso en la etapa b), de un medio que comprende un glúcido y una fuente de nitrógeno adecuada, y fermentación de este medio;
- 10.
15. dicha fuente de nitrógeno comprende por lo menos un producto nitrogenado de origen orgánico, estando comprendida entre 0,01 y 0,3 g/l la cantidad del mencionado producto nitrogenado orgánico, expresada en gramos de nitrógeno elemental por cada litro del medio de fermentación.
20. La expresión medio de fermentación designa el medio que ha de fermentar antes de la inoculación.
- Como fuente de nitrógeno orgánico se recurre a los productos utilizados generalmente en la técnica anterior, teniéndolos presentes en lo sucesivo para llevar a cabo parecidas fermentaciones. También se pueden citar las peptonas, gelatina, caseína, extracto de carne y extracto de levadura.
- 25.

Las cantidades preferidas de producto nitrogenado orgánico, expresadas en gramos de nitrógeno elemen-

tal por litro del medio de fermentación, oscilan entre 0,02 y 0,2 g/l.

5. Se ha observado que puede ser ventajoso, para llevar a cabo la etapa de producción c), añadir además al medio de fermentación una alimentación nitrogenada de origen mineral. Esta medida permite incrementar sensiblemente la velocidad de fermentación. Se puede citar como fuente de nitrógeno mineral adecuada para la invención, por ejemplo, las sales de amonio, como el cloruro amónico, nitrato amónico, carbonatos mono- o diamónico, sulfatos mono- o diamónico, fosfatos mono- o diamónico y nitratos, como el nitrato de sodio y el nitrato de potasio.

10. El producto nitrogenado de origen mineral, caso de haberse elegido utilizar uno, es introducido en el medio de fermentación en unas proporciones variables las cuales se determinan de manera que la cantidad total de producto nitrogenado orgánico y producto nitrogenado mineral, expresada en gramos de nitrógeno elemental por cada litro del medio de fermentación, sea cuando más igual a 0,5 g/l.

15. La fermentación del glúcido en la etapa de producción de polisacárido tiene lugar generalmente en un medio acuoso que contiene hasta 60 g/l de dicho glúcido. Las cantidades de glúcido preferidas se sitúan entre 10 y 40 g/l. Los glúcidos más convenientes comprenden, entre otros, la glucosa, sacarosa, cerebosa, fructosa, maltosa, lactosa, galactosa y los almidones de trigo o maíz, así como sus hidrolizados.

20. El medio de fermentación en la etapa de producción del polisacárido también puede contener iones mag-

nesio. La cantidad empleada, expresada en gramos de magnesio elemental por litro del medio de fermentación, está situada, por ejemplo, entre 0,001 y 0,05 g/l. Se puede mencionar como fuente de iones magnesio el sulfato magnésico heptahidratado,

5. acetato de magnesio y el cloruro magnésico.

Otro ingrediente útil para llevar a cabo la fermentación, consiste en una fuente de fósforo. La cantidad utilizada, expresada en gramos de fósforo por cada litro del medio de fermentación, puede estar comprendida, por ejemplo,

10. entre 0,01 y 1,5 g/l. Puede introducirse ventajosamente el fósforo en forma de fosfato disódico o fosfato dipotásico que pueden constituir al mismo tiempo una substancia tampón completamente adecuada para regular el pH, con la condición de que se utilice un exceso respecto a las cantidades cita-

15. das antes. En cuanto a esto, el proceso de la fermentación, como se sabe, exige que el pH se mantenga entre 6 y 7,5, preferentemente entre 6,5 y 7,2. Si el medio no está tamponado, se puede utilizar un dispositivo regulador del pH, introduciendo en dicho medio las cantidades que se necesiten

20. de un reactivo alcalino, como sosa, potasa o cal.

Debe observarse que también se puede añadir fósforo al medio de fermentación en forma de fosfatos mono-

o diamónico que al propio tiempo pueden constituir, total o parcialmente, la fuente de nitrógeno de origen mineral utilizable, llegado el caso, en el marco de la presente invención.

25.

Asimismo se puede introducir un agente antiespumante en el medio de fermentación.

Una vez terminada la fermentación, pero an-

tes de proceder a la recuperación del polisacárido a partir de su mosto, se ha comprobado que es interesante calentar el mosto fermentado, durante 1 a 40 minutos, entre unas temperaturas que van desde 80 a 130°C, siendo preferible una temperatura entre 100-110°C y el período de calentamiento de 10 a 15 minutos aproximadamente.

5.

Se aísla el polisacárido del mosto, que se puede calentar previamente, tal como se ha indicado antes, acudiendo a los métodos usuales, por ejemplo, precipitándolo mediante la adición al mosto de un alcohol inferior como el metanol, etanol, isopropanol, butanol terciario, acetona o bien una mezcla de estos agentes precipitantes. Hay la posibilidad de emplear una sal mineral como el cloruro potásico, cloruro sódico o sulfato sódico para lograr una precipitación económica del polisacárido. Una vez precipitado, se separa el polisacárido, se lava con el líquido de precipitación, se seca y se pulveriza.

10.

15.

Se puede utilizar el producto obtenido de esta manera, para preparar geles por medio de la adición de agua. Las concentraciones útiles de polisacárido están comprendidas habitualmente entre 0,005 y el 2% en peso. Pueden someterse los geles a un tratamiento posterior de filtración, por ejemplo, sobre tierras de diatomeas, o a una centrifugación. Las soluciones de polisacárido, obtenidas así y tratadas eventualmente, han demostrado que poseen una excelente facilidad de filtración no provocando un atascado del medio poroso. Los geles de polisacáridos, obtenidos por fermentación con una fuente de nitrógeno orgánico utilizado en mayor cantidad que la correspondiente a las con-

20.

25.

- centraciones de la presente invención, en idénticas condiciones de experimentación no presentan contrariamente las mismas ventajas y en particular pasan con dificultad a través de los medios porosos que terminan por atascar. Las especies representativas de bacterias del género *Xanthomonas*, que se pueden aplicar a la fabricación de los polisacáridos de conformidad con la invención, comprenden, por ejemplo: el *Xanthomonas begoniae*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas carotaen*, *Xanthomonas hederiae*, *Xanthomonas incanae*, *Xanthomonas malvacearum*, *Xanthomonas phaseoli*, *Xanthomonas pisi*, *Xanthomonas vasculorum*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas vitians*, *Xanthomonas pelargonii*. El *Xanthomonas campestris* es la especie adaptada particularmente a la presente invención.

- Los ejemplos que siguen ilustran esta invención.

EJEMPLO 1.

Ejemplo de fabricación de un polisacárido que entra en el marco de la invención.

a) Preparación de inóculo:

- Se siembran por suspensión en un erlenmeyer de 1 litro 100 cm³ de caldo de solubilizado de soja, a partir de un cultivo de *Xanthomonas campestris* mantenido en agar tubo, teniendo este medio de cultivo preparado en el laboratorio la siguiente composición por litro:

- | | |
|----------------------------------------------------------|--------------------|
| . sacarosa | 20 g |
| . solubilizado de soja | 90 cm ³ |
| . Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O | 8 g |
| . Na H ₂ PO ₄ | 1 g |
| . MgSO ₄ , 7H ₂ O | 0,25 g |

- antiespumante 0,25 cm³
- agua destilada cantidad suficiente para 1 litro.

5. El conjunto posee un natural de 7,3 y se esteriliza en autoclave durante 1 h 30 min. a 1,3 bar. La incubación dura 72 horas a 28°C, realizándose la operación con agitación constante.

b) Etapa intermedia de crecimiento:

10. Se utiliza el 0,15% en peso de este cultivo para inocular 15 litros de un medio estéril en un recipiente para fermentación de laboratorio de 20 litros, teniendo aquel medio la siguiente composición por litro:

- sacarosa 20 g
- harina de soja 4 g
- 15. • Na₂HPO₄ · 12 H₂O 11,4 g
- MgSO₄ · 7H₂O 0,25 g
- antiespumante 2 cm³
- H₂SO₄ (d=1,84) 0,5 cm³
- 20. • agua destilada cantidad suficiente para 1 litro.

25. El conjunto tiene un pH de 7,2 y se esteriliza en el mismo lugar mediante inyección de vapor de agua durante 45 min. a 1 bar, pasando entonces el volumen de 9 a 15 litros. Después de un período de incubación de 24 horas a 28°C con agitación y aireación, el medio posee una viscosidad de 600 centipoises (medida con el viscosímetro Brookfield LVT a 30 rev/min. y con la aguja nº 4) y un pH de 7,10.

c) Producción de polisacárido :

Se utiliza un 1,5% del medio intermedio de

buada; de esta manera el mosto se calienta a 120°C durante 30 min.

5. Después se adiciona isopropanol al mosto enfriado, por la técnica clásica, para precipitar el polisacárido que se lava, seca y pulveriza. El producto seco precipitado por el isopropanol es de 15,7 g/kg, correspondiendo a un rendimiento ponderal de 71,4 %.

EJEMPLO 2

10. Ejemplo de la fabricación del polisacárido de conformidad con la invención.

Operando como en el ejemplo 1, se inocula un recipiente para fermentación piloto de 1,4 m³ de volumen llenado con 0,8 m³ de un medio estéril cuya composición por litro es la siguiente:

15. . cerealosa 22 g
 . harina de soja 2 g
 . NH₄NO₃ 0,6 g corresponde a un
 . Na₂HPO₄ · 12 H₂O 11,4 g total de 0,37 g de N.
 . MgSO₄ · 7H₂O 0,25 g
20. . antiespumante 0,5 cm³
 . H₂SO₄ (d = 1,84) 0,43 cm³
 . agua cantidad suficiente para
 1 litro.

25. Se esteriliza el medio de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 1 en dos períodos. Los dos medios esterilizados juntos tienen un pH de 7,24 y un volumen de 0,8 m³. La fermentación dura alrededor de 41 horas bajo agitación y aireación, regulándose el pH entre 6,7 y 6,9 por medio de la adición de lejía de sosa que contiene

300 g de NaOH por litro. Transcurrido este tiempo, ya no se encuentra cerosa y la viscosidad Brookfield es 5400 centipoises.

5. Seguidamente tiene lugar un tratamiento térmico del mosto, calentándolo a 110°C durante 15 min. Después de enfriar, el polisacárido se precipita como se indica en el ejemplo 1 : se aíslan 14,6 g/kg de polisacárido seco, correspondiendo a un rendimiento ponderal del 66,4 %.

EJEMPLO 3.

10. Ejemplo de fabricación del polisacárido por fermentación en presencia de una fuente de nitrógeno orgánico que se utiliza en cantidad mayor que la esta de conformidad con la invención.

15. Operando como en el ejemplo 1, se inocula un recipiente para fermentación piloto de 1,4 m³ de volumen, llenado con una carga de 1 m³ de medio estéril cuya composición por litro es la que sigue:

20.	. sacarosa	20 g
	. harina de soja	4 g (corresponde a 0,32 g de nitrógeno)
	. Na ₂ HPO ₄ ; 12 H ₂ O	11,4 g
	. MgSO ₄ ; H ₂ O	0,25 g
	. antiespumante	0,5 cm ³
	. H ₂ SO ₄ (d = 1,84)	0,43 cm ³
	. agua	cantidad suficiente para 1 litro

25. El medio completo tiene un pH 7,3 y se esteriliza mediante inyección de vapor durante 1 h 30 min. a 1,3 bar, pasando el volumen de 0,74 m³ a 1 m³. La fermentación dura aproximadamente 52 horas, bajo agitación y airea-

5. ción, regulándose el pH entre 6,7 y 6,9 por medio de la adición de la lejía de sosa utilizada en los ejemplos anteriores. Una vez que ha transcurrido este tiempo, no se encuentra ya sacarosa y la viscosidad es de 6900 centipoises, medida en las condiciones señaladas antes. Se aíslan 15,6 g/kg de materia seca, correspondiendo a un rendimiento del 78 %, después de un tratamiento térmico del mosto y precipitación en las condiciones del ejemplo 1.

EJEMPLO 4.

10. Para realizar los ensayos con el fin de estudiar la facilidad de filtración, se utilizan los polvos de polisacáridos obtenidos en los ejemplos 1 a 3. Estos ensayos de filtración consisten en las operaciones siguientes:
- 15. . 3,2 g de polvo del polisacárido se dispersan, de conformidad con la técnica habitual, en 2 litros de agua salada que contiene 5 g de NaCl por litro, presentando un pH 7 exactamente y filtrado previamente sobre un filtro Millipore de 0,22 μ ;
 - 20. . La concentración del polisacárido de esta solución (o gel) que es del 0,16 en peso, se reduce al 0,04 % diluyendo con la misma solución de agua salada ;
 - 25. . seguidamente se filtra sobre tierra de diatomeas la solución al 0,04 %, a razón de 0,05 g de tierra para 100 cm³ de la solución mencionada ;
 - . después se mide el volumen de la solución clarificada del 0,04 % que ha pasado a través de un filtro Millipore de 3 de porosidad y cuyo diámetro mide 47 mm, bajo una presión causada por una diferencia

de nivel del agua de 10 cm entre la entrada y salida del aparato de filtración.

Los resultados obtenidos aparecen en la figura 1 anexa donde están señaladas las curvas que indican el volumen que ha filtrado expresado en cm^3 en ordenadas en función del tiempo: expresado en horas en abcisas:

5.

- soluciones de polisacáridos preparadas tal como se ha indicado en los ejemplos 1 (curva A) y 2 (curva B);

10.

- la solución del polisacárido preparada en el ejemplo 3 (curva C);
- la solución de agua salada de 5 g por cada litro de NaCl, que ha servido para preparar el ensayo de la facilidad de filtración (curva D).

15.

Como puede apreciarse, estos ensayos de facilidad de filtración, evidencian un rápido atascado del filtro Millipore de 3μ con una solución del polisacárido obtenido por fermentación sobre un medio rico en nitrógeno orgánico, a pesar de una clarificación previa de la solución del polisacárido (curva C). La solución del polisacárido obtenido por fermentación sobre un medio de conformidad con la presente invención, es decir, pobre en nitrógeno orgánico, contrariamente no produce atascado de los medios porosos y pasa fácilmente (curvas A y B).

25.

= . =

REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones.

1. Procedimiento para la producción de polisacáridos de Xanthomonas especialmente aptos para preparar geles que presentan buena facilidad de filtración, particularmente mediante adición de agua y con una concentración útil de polisacárido entre 0,005 y 2% en peso caracterizado porque en su realización comprende etapas operativas de:
5. a) preparación del inóculo a partir de un cultivo de Xanthomonas;
10. b) seguida eventualmente de una etapa intermedia de crecimiento del microorganismo;
- c) y obtención del polisacárido mediante inoculación, con la ayuda de un cultivo obtenido en la etapa a) o llegado el caso en la etapa b), de un medio que comprende un glucido y una fuente de nitrógeno adecuada, y fermentación de
15. este medio;
- cuya fuente de nitrógeno contiene por lo menos un producto nitrogenado de origen orgánico y están comprendida entre 0,01 y 0,3 g/l la cantidad del mencionado producto nitrogenado orgánico, expresado en gramos de nitrógeno elemental por cada
20. litro del medio de fermentación.

2. Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en una forma de realización preferente la cantidad del producto nitrogenado orgánico presente en el medio de cultivo en la etapa del proceso c),
25. expresada en gramos de nitrógeno elemental por litro del medio de fermentación, está comprendida entre 0,02 y 0,3 g/l.

3. Procedimiento de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado en su realización porque el medio de fermentación, en la etapa

del proceso c), contiene además un producto nitrogenado de origen mineral, en proporción determinada de modo que la cantidad total del producto nitrogenado orgánico y producto nitrogenado mineral, expresada en gramos de nitrógeno elemental por cada litro del medio de fermentación, sea a lo sumo igual a 0,5 g/l.

5.

4. Procedimiento de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque en su realización el mosto fermentado que contiene el polisacárido, una vez finalizada la fermentación, se somete a un calentamiento en una zona de temperaturas de 80 a 130°C, durante 1 a 40 minutos.

10.

5. Procedimiento para la producción de polisacáridos de Xanthomonas especialmente aptos para preparar geles que presentan buena facilidad de filtración.

15.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 16 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras, y una lámina de dibujos.

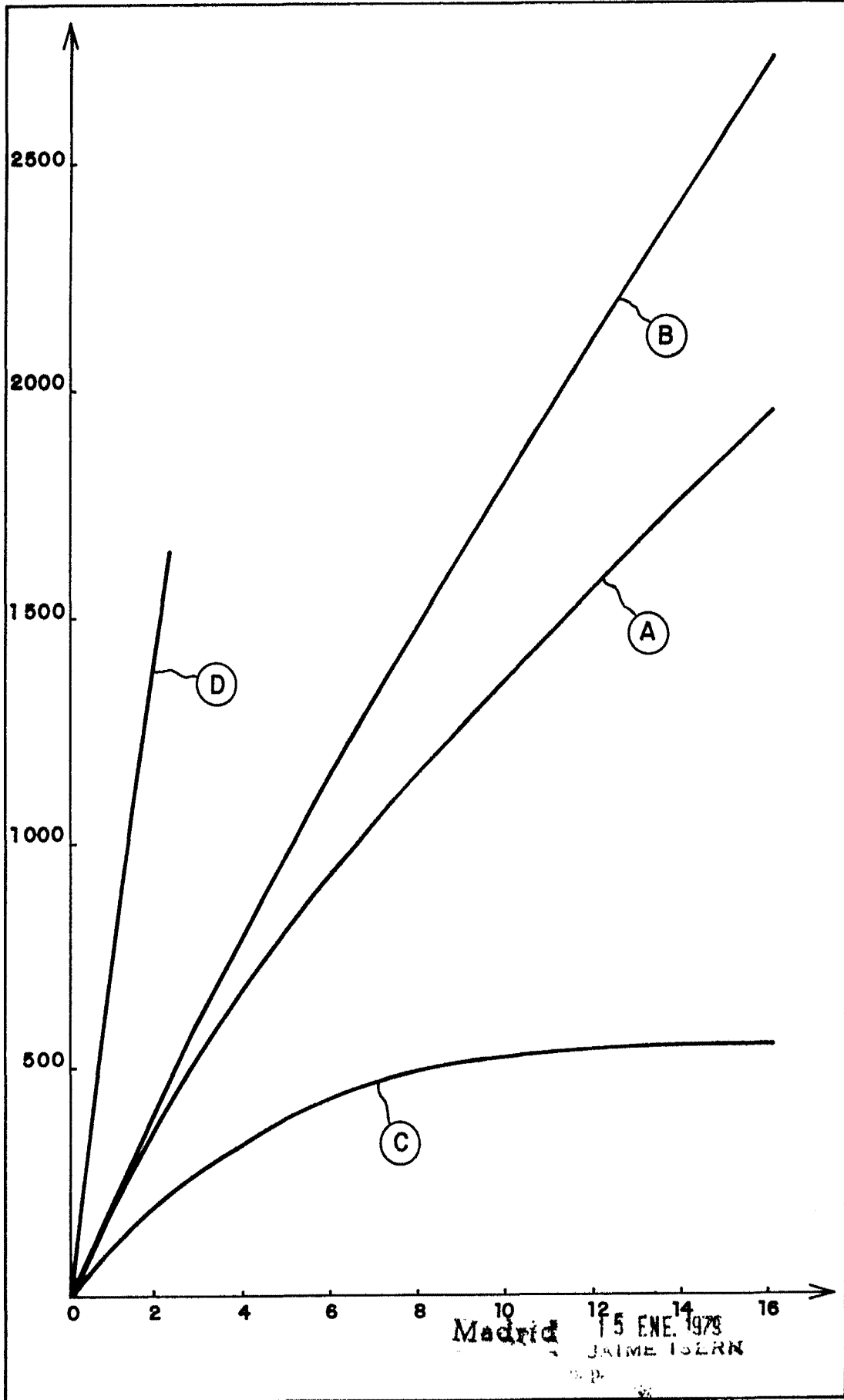
Madrid, a 15 Enero 1979

P.a!

JAIME ISERN

J. P.

Firmado: JESUS PICAZO



Madrid 15 ENE. 1978
J. R. ME LERN
S. P.

[Handwritten signature]
E. R. ME LERN