



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 94795 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C12P019/04 A

C08B037/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1990.07.24

(30) *Prioridade:* 1989.07.25 US 384939

(43) *Data de publicação do pedido:*
1991.03.20

(45) *Data e BPI da concessão:*
12/96 1996.12.16

(73) *Titular(es):*

CULTOR LTD.

KYLLIKINPORTTI 2 SF-00240 HELSINKI FI

(72) *Inventor(es):*

BRUCE L. DASINGER

US

(74) *Mandatário(s):*

JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA

RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO HETEROPOLISSACÁRIO 105-4

(57) *Resumo:*

PREPARAÇÃO DE UM HETEROPISSACÁRIDO DESIGNADO 105-4;
POLISSACÁRIDO MANOSE; GALACTOSE; GLUCOSE

[Fig.]

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 94 795

NOME: PFIZER INC., norte-americana, estabelecida em 235
East 42nd Street, New York, N.Y. 10017, Estados
Unidos da América

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO HETEROPOLISSA-
CÁRIDO 105-4"

INVENTORES: Bruce L. Dasinger, residente nos E.U.A.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo
4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.

Estados Unidos da América - 25 de Julho de 1989, sob o
número de série 384,939.



Descrição referente à patente de invenção de PFIZER INC., norte-americana, industrial, estabelecida em 235 East 42nd Street, New York, N.Y. 10017, Estados Unidos da América, (inventor: Bruce L. Dasinger, residente nos E.U.A), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO HETEROPOLISSACÁRIDO 105-4".

DESCRIÇÃO

A presente invenção pertence ao campo dos poli-sacáridos microbianos. Em particular, os polissacáridos que interessam existem sob a forma de hétéro-polissacáridos exocelulares que são de elevado peso molecular, geralmente lineares ou ramificados, constituídos por hidratos de carbono que contêm duas ou mais espécies diferentes de monosacáridos, que formam unidades que se repetem e que são polimerizadas

Estes hétéro-polissacáridos são largamente utilizados na agricultura e numa larga variedade de aplicações industriais, incluindo a indústria alimentar, a indústria de perfuração de poços, a indústria de tintas, etc. A procura comercial destes hétéro-polissacáridos continua a aumentar.

Um dos hétéro-polissacáridos mais largamente utilizados é o xantano ou a goma de xantano, que é produzida durante a fermentação por bactérias do género Xanthomonas, tipicamente Xanthomonas campestris: Este hétéro-po-



lissacárido de xantano contém glucose, manose e ácido glucurônico. Várias utilizações industriais da goma de xantano são conhecidas, como se refere, por exemplo, nas Patentes de Invenção Norte-Americanas números 3 326 e 4 244 826.

Outra classe de hétéro-plissacáridos largamente utilizada é constituída pelos succino-glicanos, uma classe de hétéro-polissacáridos exocelulares produzidos por bactérias dos gêneros Alcaligenes, Agrobacterium e Pseudomonas. Estes succino-glicanos contém galactose, glucose e proporções variáveis de resíduos de ácidos como piruvato, succinato e acetato.

As utilizações industriais destes succino-glicanos são também largamente conhecidas, por exemplo, por meio do Pedido de Patente Europeia Número 040445 e das Patentes de Invenção Norte-Americanas Números 4 339 239, 4 347 289 e 4 298 795.

A Figura 1 representa a viscosidade das várias soluções do hétéro-polissacárido 105-4.

A presente invenção refere-se a um hétéro-polissacárido designado hétéro-polissacárido 105-4, que contém manose, galactose e glucose na proporção molar aproximada de 1,3 : 1 : 3,6, contendo ainda, com base no peso do polissacárido, entre cerca de 10 e cerca de 25% em peso de ácido urônico e desde cerca de 10 a cerca de 15% em peso de grupos acetato.

De acordo com uma outra forma de realização, a presente invenção compreende um hétéro-polissacárido produzido por uma espécie de Pseudomonas ATCC 53923 e designado hétéro-polissacárido 105-4, contendo o referido polissacárido manose, galactose e glucose na proporção molar aproximada de 1,3 : 1 : 3,6 e contendo o mencionado polissacárido ainda, com base no peso do polissacárido, entre cerca de 10 e



cerca de 25% em peso de grupos do ácido urônico e entre cerca de 10 e cerca de 15% em peso de grupos acetato.

A presente invenção compreende também um processo para a preparação de um hétéro-polissacárido que contém manose, galactose e glucose na proporção molar aproximada igual a 1,3 : 1 : 3, contendo também o referido polissacárido, com base no peso do polissacárido, entre cerca de 10% e cerca de 25% em peso de ácido urônico e cerca de 10% e cerca de 15% em peso de grupos acetato que compreende também desenvolver-se a espécie Pseudomonas ATCC 53923 num meio nutritivo aquoso por fermentação aeróbica de uma fonte assimilável de carbono.

Preferem-se os meios nutritivos aquosos que contêm iões fosfato inorgânicos compreendidos dentro do intervalo desde cerca de 0,01 a cerca de 1 grama por litro de fosfato.

As utilizações preferidas do hétéro-polissacárido 105-4 são como agente espessante ou estabilizante num meio que contém pelo menos uma fase líquida aquosa.

A espécie Pseudomonas que produz o hétéro-polissacárido 105-4 foi isolada de uma amostra de solo colhida em Guique (Carabobo), na Venezuela.

O hétéro-polissacárido produzido por Pseudomonas ATCC 53923 é composto principalmente por hidrato de carbono com 10 a 15% em peso de grupos acetilo substituintes. A parte constituída por hidratos de carbono é composta por cerca de 10 a cerca de 25% em peso de ácido urônico (calculado como ácido glucurônico) e manose, galactose e glucose na proporção aproximada de 1,3 : 1 : 3,6.

Com o fim de determinar a composição do polissacárido, obteve-se polímero purificado diluindo o



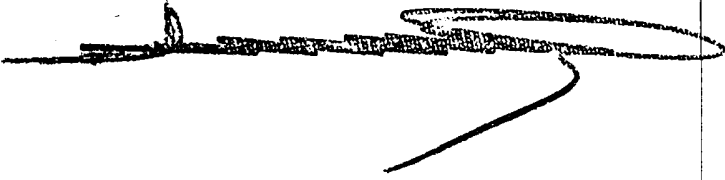
caldo de fermentação vinte vezes com água destilada, separando as células por centrifugação a 18.000 x g durante trinta minutos, adicionando cloreto de sódio a 0,1% em volume e precipitando o polímero por adição de 3 volumes de isopropanol com base no volume da solução diluída do polímero.

Separou-se o precipitado polimérico por filtração através de cem malhas e lavou-se com repolpação em 100 ml de isopropanol a 70% seguida de filtração. Colectou-se o material e secou-se por liofilização até peso constante (geralmente, quarenta e oito horas). Hidrolisou-se o polímero ou com ácido sulfúrico ou com ácido trifluor-acético procedendo como se descreve seguidamente.

Dissolveram-se 10 mg do polímero purificado em 2 ml de água destilada com agitação rápida. Para hidrólise com ácido sulfúrico, adicionaram-se 2 ml de ácido sulfúrico 4 N e aqueceu-se a solução numa ampola de vidro fechada, a 100°C, durante dezasseis horas. Arrefeceu-se a solução resultante, neutralizou-se com hidróxido de bário e ajustou-se o pH de modo a estar compreendido entre 5 e 6 com dióxido de carbono sólido (gelo seco).

Para realizar a hidrólise com ácido trifluor-acético (TFA), adicionaram-se 2 ml de TFA 4 molar e aqueceu-se a solução numa ampola de vidro fechada durante quatro horas a 120°C. Eliminou-se o TFA por evaporação sob vácuo à temperatura ambiente sobre hidróxido de sódio durante a noite. Os vestígios de TFA foram eliminados repetindo dois ciclos de dissolução do resíduo em água destilada e aquecendo à secura sob vácuo.

Os açúcares neutros e o ácido urónico foram ainda identificados por tentativas por cromatografia em papel descendente usando papel Whatman 3MM. Revelou-se o cromatograma utilizando um sistema dissolvente composto por butanol, ácido acético glacial e água, na proporção de



6 : 4 : 3. Os cromatogramas foram secos ao ar e tratados com uma solução preparada misturando 0,1 ml de uma solução aquosa saturada de nitrato de prata em 20 ml de acetona. Os açúcares e o ácido urônico reagem com o nitrato de prata para proporcionarem manchas cinzentas ou negras dependendo da concentração. As manchas foram identificadas por cromatografia usando padrões de açúcar e de ácido urônico. As localizações das manchas eram consistentes com uma composição constituída por manose, galactose, glucose e ácido glucurônico. Os açúcares presentes no produto da hidrólise foram identificados e qualificados por cromatografia gás-líquido dos derivados de acetato de alditol (Hisamatsu e col., Carb. Res. 61, 89 (1978)).

Com ambos os processos de hidrólise (isto é, com H_2SO_4 ou com TFA), obteve-se uma proporção de manose : galactose : glucose compreendida entre cerca de 1,3 : 1 : 3,6. Os substituintes do ácido orgânico do polímero 105-4 foram ensaiados depois da sua separação por hidrólise com ácido diluído (ácido sulfúrico 2 N, $100^\circ C$, sessenta minutos), procedendo de acordo com a maneira descrita por Hisamatsu supra.

A separação realizou-se por cromatografia isocrática com permuta de catiões (Biorad Aminex HPX-87H), utilizando uma fase móvel constituída por H_2SO_4 0,013 N, com detecção por ultravioletas a 206 mμ. O acetato era o único substituinte a cerca de 10 até cerca de 15% em peso do polímero. Determinou-se o ácido urônico pelo processo de Blumenkrantz e Asboe-Hansen, Anal. Biochem 54, x 484 (1973). Encontrou-se uma gama de 10 - 25% (calculada como ácido glucurônico).

O polímero 105-4 é extremamente eficaz como agente de formação de viscosidade em meios aquosos. Devido a este facto, assim como à sua pseudo-plasticidade, à sua compatibilidade com água doce, água de elevada salinidade e salmouras de elevada dureza, ele tem utilidade como agente

espessante, agente estabilizante e auxiliar de suspensão numa larga variedade de aplicações, mas não se limitando, a detergentes líquidos, agentes de limpeza industriais, agentes de-sinfectantes, aerossóis para combate a incêndios, perfurações de poços e fluidos de completamento, tintas de látex e produtos de higiene pessoal.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Maneira de proceder de fermentação para a produção do hétéro-polissacárido 105-4.

A. Manutenção da Cultura

A espécie Pseudomonas ATCC 53923 desenvolve-se bem no meio descrito na Tabela 1. Utilizou-se o mesmo meio, com variações mínimas como se especifica mais abaixo, para a preparação de semente de fermentação e para o meio de fermentação da última operação.

TABELA 1

Meio de placa de agar para a manutenção e purificação da cultura

Glucose	3%
KH_2PO_4	0,01%
Extracto de levedura	0,025%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025%
NH_4NO_3	0,09%
CaCO_3	0,5%
Solução de metais vestigiais	0,5 ml/litro de meio
Agar	1,8%

Composição da solução de armazenagem de metais vestigiais:

Ingrediente	mg/1 de água destilada
Ácido bórico	285
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1800
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1360
Tartarato de sódio	2098
CuCl_2	26,9
ZnCl_2	20,8
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	74,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25,2

Dissolveram-se ou suspenderam-se os ingredientes em água destilada e esterilizou-se a mistura por aquecimento em autoclave a 121°C durante trinta minutos. Depois de se arrefecer até 50°C , colocou-se o meio de agar em placas de Petri. As colônias de Pseudomonas Sp. ATCC 53923 desenvolvidas durante três dias a 30°C eram brancas, subidas e com consistência de borracha.

B. Preparação da semente

O meio foi o mesmo que se indicou na Tabela 1, com a exceção de se ter omitido agar e se ter reduzido o teor de CaCO_3 para 0,3%. Preparou-se o meio e distribuiu-se pelos vários balões (100 ml de meio em cada balão de 300 ml). Os balões foram esterilizados por aquecimento em autoclave a 121°C durante trinta minutos. Depois de se arrefecerem, os balões foram inoculados com uma quantidade de uma cultura com a idade de três dias de uma placa de agar. Os balões foram incubados a 30°C com sacudidelas a 200 rotações por minutos durante vinte e quatro horas e transferiu-se 1 ml de cultura para novos balões de sementeira (inóculo do segundo andar) com composição idêntica e com volume idêntico que foram incubados com sacudidelas a 30°C durante quarenta e oito horas.

C. Meio de produção para a fermentação

O meio, foi o mesmo que se indicou na Tabela 1, com a exceção de se terem omitido o agar e o CaCO_3 e o volume se basear no volume inoculado do fermentador, como se descreve abaixo.

Preparou-se o meio e introduziu-se num fermentador New Brunswick de 15 litros, procedendo como se descreve seguidamente. Misturaram-se os ingredientes necessários para 10 litros de meio (omitindo a glucose) em 8,5 litros de água destilada. Ajustou-se o pH do meio de modo a ser igual a 8,1 com hidróxido de sódio. Esterilizou-se o conteúdo do fermentador por aquecimento em autoclave a 121°C durante uma hora. Esterilizou-se separadamente 1 litro de uma solução de glucose a 30% a 121°C durante uma hora e adicionou-se ao fermentador em condições assépticas. Inoculou-se o fermentador com 0,5 litros de inóculo proveniente do inóculo do segundo andar. Manteve-se a temperatura de fermentação igual a 30°C e o caudal de ar foi igual a 3 litros por minuto. Manteve-se o pH compreendido entre 6,5 e 7,5 durante a fermentação por adição de hidróxido de sódio usando um controlador de pH New Brunswick. A velocidade inicial de agitação foi igual a 300 rotações por minuto, que foi elevada para 400 e 500 rotações por minuto ao fim de vinte e quatro e quarenta e oito horas, respectivamente. Terminou-se a fermentação ao fim de 72 - 96 horas.

A viscosidade do caldo de fermentação medida com o viscosímetro Brookfield, de modelo LVT, com haste número 4, a 30 rotações por minuto, estava compreendida entre 9.000 e 14.000 centipoise. Preservou-se o caldo do fermentador adicionando-lhe 3.000 ppm de formaldeído ou de outro biocida apropriado.

A concentração do polímero, determinada por precipitação em isopropanol de uma preparação clari-

ficada para remover as células, era igual a 0,8%. A viscosidade de uma solução com 1.425 ppm em solução contendo 500 ppm de cloreto de sódio era igual a 1.000 cps a 5,1 segundo⁻¹ usando um viscosímetro Fann, modelo número 35A e um agitador B-1 com rotor R-1.

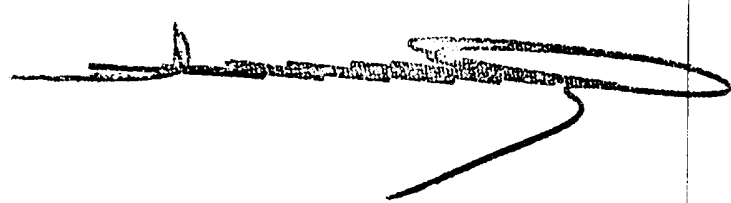
Classificação ATCC

Morfologia

Esta estirpe é constituída por um bastonete móvel Gram-negativo. Os flagelos são monotricos polares. As colônias sobre o agar nutritivo são uniformes, completas e brilhantes e aderem ao agar. Nos meios líquidos, forma-se uma película floculenta à superfície. Quando desenvolvidas em meio deficiente de azoto, as células contêm inclusões de poli-B-hidroxi-butirato. Não se formam pigmentos fluorescentes em piocianina.

Fisiologia e Bioquímica

Gram positivo	-	Hidrólise de amido	+
Gram negativo	+	Gelatinase	+
Gram variável	-	Hidrólise de Tween 20	+
Móvel à temperatura ambiente	+	Hidrólise de Tween 80	+
Flagelos peritricosos	-	Indol	-
Flagelos lofatricosos	-	Desenvolvimento em citrato de Simmons	+
Flagelos monotricosos	+	Urease	+
Flagelos laterais	-	Redução de nitrato a nitrito	-
Desenvolvimento a 4°C	-	Redução de nitrito	-
Desenvolvimento a 25°C	+	Redução de nitrato a azoto	-
Desenvolvimento a 30°C	+	Sulfureto de hidrogênio (TSI)	-



Desenvolvimento a 37°C	+	Lysina-descarboxilase	-
Desenvolvimento a 41°C	+	Arginina (Mollers)	-
Fluoresceína produzida	-	Ornitina-descarboxilase	-
Piocianina produzida	-	Desaminação fenilalamina	-
Laranja difusível	-	Lecitinase	W
Amarelo difusível	-	Fosfatase	+
Púrpura difusível	-	Catalase	+
Vaerde não difusível	-	Oxidase	+
Outros pigmentos não difusíveis	-	Desenvolvimento em malonato como SCS	+
Pigmento de melanina produzido	+	dl-hidroxibutirato	+
Desenvolvimento a pH 6,0	+	Acumulação em PHB	+
Desenvolvimento em NaCl a 3%	-	Desenvolvimento em 0,05% de cetrimida	-
Desenvolvimento em NaCl a 6,5%	-	Degradação de testosterona	-
Desenvolvimento em agar de MacConkey	+	3-Cetolactose a partir de lactose	-
Desenvolvimento em agar com leite desnatado	+	Desenvolvimento de Mucoide em agar com glucose agar	+
Hidrólise de Esculina	W	Oxidação de gluconato	-
Hidrólise de caseína	+	Desenvolvimento em acetato como SCS	+
		Degradação de tirosina	+

W = fracamente positivo

Reacções de fermentação oxidante em meio de Hugh e Leifson

Ácido a partir de:

L-arabinose	W
celobiose	W
etanol	K
D-frutose	W
D-glucose Aeróbico	W
D-glucose Anaeróbico	-
pH alkaline em D-glucose	-

Ácido a partir de:

glicerol	W
i-inositol	K
lactose	K
maltose	+
D-manitol	W
D-manose	+
L-ramnose	K
D-ribose	W
sacarose	K
trehalose	K
D-xilose	W
Controlo	K

+ = ácido

- = sem alteração

K = reacção alcalina forte

W = ácido na superfície mas alguma reacção alcalina no corpo do tubo

+ - ácido

- - ausência de alteração

K - reacção fortemente alcalina

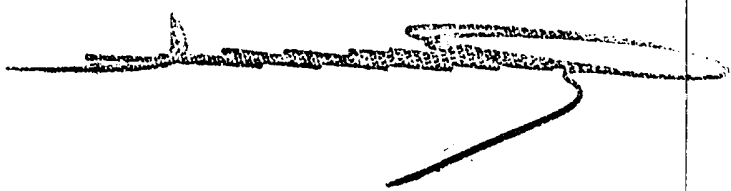
W - ácido sobre a superfície mas alguma reacção alcalina residual no corpo do tubo.

Fontes de carbono únicas em base mineral de Stanier

L-arabinose	+	D-xylose	+
celobiose	+	adonitol	-
D-frutose	+	eritaritol	-
D-glucose	+	glicerol	+
lactose	-	etanol	-
maltose	+	geraniol	-
D-manitol	+	i-inositol	-
L-ramnose	-	ácido sebácico	+
D-ribose	+	acetamida	-
D-sorbitol	-	adipato	-
sacarose	-	benzoato	-
trehalose	-	butirato	+
citraconato	-	glicina	-
D-gluconato	+	L-histidina	+
M-hidroxibenzoato	-	DL-norleucina	-
2-Cetogluconato	-	L-prolina	+
DL-lactato	+	D-triptofano	-
L-malato	+	L-valina	-
pelargonato	-	DL-arginina	-
propionato	+	benzilamina	-
quinato	-	butilamina	-
succionato	+	putrescina	-
L-tartarato	-	mesoconato	-
valerato	-	DL-glicerato	-
B-alanina	-	L-triptofano	-
D-A-alanina	+	Metanol	-
betaína	-		

Comentários

A comparação das características desta estirpe com os dados da estirpe ATCC e os dados da literatura não são totalmente idênticos.



A estirpe parece a Pseudomonas solanacearum no que diz respeito ao seu aspecto nutricional, mas não nas suas propriedades bioquímicas, particularmente, a hidrólise de caseína, amido e gelatina em redução de nitratos. A P. solanacearum é descrita como tendo um a quatro flagelos polares, enquanto o 105-4 isolado tem apenas um flagelo polar.

Exemplo 2

Na Tabela 2, mostram-se as invulgarmente elevadas viscosidades obtidas com soluções 0,1 a 1,0% de 105-4 a pequena taxa de corte (TDS = sais dissolvidos totais). A natureza elevadamente pseudoplástica ou de liquefação por corte das soluções de 105-4, que proporciona elevadas viscosidades a pequenas taxas de corte para boa suspensão de sólidos, assim como pequenas viscosidades a elevadas taxas de corte para facilidade de mistura e bombagem, estão representadas na Figura 1.

Esta Figura também mostra a excelente compatibilidade e intensidade de espessamento de 105-4 com salmouras de salinidade muito elevada e dureza.

Por exemplo, prepararam-se soluções num misturador Waring^(R) por adição lenta de biopolímero num vórtex (mantido por ajustamento contínuo da tensão do reóstato do misturador) do dissolvente, seguido de dois minutos de corte a 50 vólt. As viscosidades das soluções foram medidas com reômetro da firma Haake Instruments, modelo RV20.

Exemplo 3

Verificou-se que a produção do polímero 105-4 era sensível à concentração do fosfato presente no meio de produção de fermentação. Os resultados indicados na

Tabela 3 confirmam esta sensibilidade.

TABELA 3

Efeito da concentração de fosfato sobre a produção de polímero

Concentração de fosfato ¹ g/l	Polímero produzido (%w/w) ²
0,07	1,31
0,30	0,39

1. - Expressa como PO_4
2. - Fermentação efectuada como se descreveu no Exemplo 1, com a diferença de ter variado a concentração de fosfatos.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de um heteropolissacárido designado 105-4, contendo o referido polissacárido manose, galactose e glucose na proporção molar aproximada de 1,3 : 1 : 3,6, contendo o referido polissacárido também como base no peso do polissacárido, desde cerca de 10 a cerca de 25% em peso de ácido urónico e de cerca de 10 a cerca de 15% em peso de grupos acetato, caracterizado por compreender cultivar-se a espécie Pseudomonas ATCC 53923 num meio nutriente aquoso por fermentação aeróbia de uma fonte de carbono assimilável.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindica
ção 1, caracterizado por o meio aquoso nutriente conter ião
fosfato inorgânico dentro do intervalo de 0,001 - 1 grama por
litro.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindica
ção 1, caracterizado por o meio nutriente aquoso conter ião
fosfato inorgânico numa quantidade menor do que 0,5 gramas/li
tro.

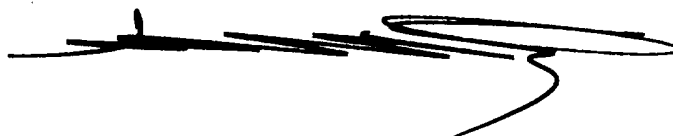
- 4ª -

Processo para espessar, suspender
ou estabilizar um sistema líquido caracterizado por compreen
der incorporar-se uma quantidade de espessamento, suspensão
ou estabilização de um heteropolissacárido quando preparado
de acordo com a reivindicação 3.

A requerente reivindica a priorida
de do pedido norte-americano apresentado em 25 de Julho de
1989, sob o número de série 384,939.

Lisboa, 24 de Julho de 1990

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL





RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO HETEROPOLISSACÁRIDO 105-4"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um heteropolissacárido designado 105-4, contendo o referido polissacárido manose, galactose e glucose na proporção molar aproximada de 1,3 : 1 : 3,6, contendo o referido polissacárido também como base no peso do polissacárido, desde cerca de 10 a cerca de 25% em peso de ácido urônico e de cerca de 10 a cerca de 15% em peso de grupos acetato, que compreende cultivar-se a espécie *Pseudomonas* ATCC 53923 num meio nutriente aquoso por fermentação aeróbia de uma fonte de carbono assimilável.

Tabela 2 Viscosidades das soluções do heteropolifosfato 105-4, a baixa intensidade de corte

0,1-1% ativo em salmoura a 500 ppm de TDS

VISCOSIDADES (cps) a

<u>Dosagem % ativa</u>	<u>0,01</u>	<u>0,1</u>	<u>1 seg⁻¹</u>
0,1 %	1,000,000	14,000	3,130
1,0 %	> 20,000,000	770,000	90,000

Fig.1 variação da salinidade/dureza e taxa de corte

