

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 025**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/04** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2015 PCT/EP2015/079004**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16091892**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2015 E 15805513 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 3230464**

54 Título: **Procedimiento para la fermentación de cepas fúngicas**

30 Prioridad:

**12.12.2014 EP 14197750**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**27.02.2019**

73 Titular/es:

**WINTERSHALL HOLDING GMBH (100.0%)  
Friedrich-Ebert-Strasse 160  
34119 Kassel, DE**

72 Inventor/es:

**BRIECHLE, SEBASTIAN;  
HOLLMANN, RAJAN;  
KAEPLER, TOBIAS;  
LEHR, FLORIAN;  
SCHMIDT, JULIA KRISTIANE y  
FREYER, STEPHAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 702 025 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para la fermentación de cepas fúngicas

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la fermentación de cepas fúngicas que secretan glucanos con una cadena principal unida  $\beta$ -1,3-glicosídicamente y grupos laterales unidos  $\beta$ -1,6-glicosídicamente a este, en una cascada de tanques usando mezcladores de alta cizalla.

**Antecedentes de la invención**

- 10 En ocurrencias naturales de petróleo, el petróleo se presenta en los vacíos de rocas de almacenamiento porosas, que se cierran con respecto a la superficie de la Tierra mediante capas de recubrimiento impermeable. Los vacíos puede ser vacíos muy finos, capilares, poros o similares. Los cuellos de poros finos pueden tener, por ejemplo, un diámetro de tan solo alrededor de 1 m. Además, del petróleo, incluyendo proporciones de gas natural, un reservorio comprende más o menos agua que comprende sal.

- 15 En la recuperación de petróleo, se hace una distinción entre recuperación primaria, secundaria y terciaria. En la recuperación primaria, el petróleo fluye de manera espontánea bajo presión del propio reservorio a través del pozo a la superficie después de perforar el reservorio. Dependiendo del tipo de reservorio, generalmente solo es posible, sin embargo, recuperar alrededor del 5 al 10 % de la cantidad de petróleo que se presenta en el reservorio por medio de la recuperación primaria; luego, la presión intrínseca no dura lo suficiente para la recuperación. En la recuperación secundaria, la presión en el reservorio se mantiene mediante inyección de agua y/o vapor, pero el petróleo no puede recuperarse por completo incluso con esta tecnología. La recuperación de petróleo terciaria incluye procedimientos en los que se usan productos químicos adecuados como auxiliares para recuperación de petróleo. Estos incluyen los así denominados "inundación con polímeros". En la inundación con polímeros, se inyecta una solución acuosa de un polímero espesante en el reservorio de petróleo por medio de los pozos de inyección en lugar de agua. Esto permite que se aumente el rendimiento en mayor medida en comparación con el uso de agua o vapor.

- 25 Los polímeros espesantes adecuados para recuperación de petróleo terciaria (también conocida como recuperación de petróleo mejorada (EOR)) deben cumplir un número de requisitos específicos. Además de tener suficiente viscosidad, los polímeros deben ser también térmicamente muy estables y retener su efecto espesante incluso a altas concentraciones de sal.

- 30 Se han propuesto un gran número de diferentes polímeros solubles en agua para inundación con polímeros, específicamente ambos polímeros sintéticos, tales como poli(acrilamidas) o copolímeros que comprenden acrilamida y otros monómeros, y también polímeros solubles en agua de origen natural.

- 35 Una importante clase de polímeros de origen natural para inundación con polímeros se forma mediante homopolisacáridos ramificados a partir de glucosa. Los polisacáridos que se componen de unidades de glucosa se denominan también glucanos. Los homopolisacáridos ramificados específicos tienen una cadena principal que se compone de unidades de glucosa de unión 1-3, de las que, estadísticamente, alrededor de cada tercera unidad se encuentra unida 1-6-glicosídicamente con una unidad de glucosa adicional. Las soluciones acuosas de tales homopolisacáridos ramificados tienen propiedades fisicoquímicas ventajosas lo que significa que se adecúan particularmente bien a la inundación con polímeros.

- 40 Los glucanos particularmente importantes en este contexto son beta-glucanos. Los beta-glucanos se conocen por ser componentes bien conservados de paredes celulares en varios microorganismos, en especial, en hongos y levaduras (Novak, Endocrine, Metabol & Immune Disorders - Drug Targets (2009), 9: 67-75). Bioquímicamente, los beta-glucanos son polímeros no celulósicos de beta-glucosa que se unen por medio de uniones beta(1-3) glicosídicos que exhiben un cierto patrón de ramificación con moléculas de glucosa de unión beta(1-6) (Novak, loc cit). Una gran cantidad de beta-glucanos estrechamente relacionados exhiben un patrón de ramificación similar tal como schizophyllano, escleroglucano, pendulano, cineriano, laminarina, lentinano y pleurano, todos los cuales exhiben una cadena principal lineal de unidades beta-D-(1-3)-glucopiranosil con una sola unidad beta-D-glucopiranosil de unión (1-6) con una unidad beta-D-glucopiranosil de la cadena principal lineal con un grado de ramificación promedio de alrededor de 0,3 (Novak, loc cit; EP-B1 463540; Stahmann, Appl Environ Microbiol (1992), 58: 3347-3354; Kim, Biotechnol Letters (2006), 28: 439-446; Nikitina, Food Technol Biotechnol (2007), 45: 230-237).
- 50 Al menos dos de dichos beta-glucanos - schizophyllano y escleroglucano - comparten incluso una estructura idéntica y solo difieren ligeramente en su masa molecular, a saber, en su longitud de cadena (Survase, Food Technol Biotechnol (2007), 107-118).

- 55 Los homopolisacáridos de dicha estructura se secretan mediante diversas cepas fúngicas, por ejemplo, mediante el basidiomiceto Schizophyllum commune de crecimiento filamentoso que secreta, durante el crecimiento, un homopolisacárido de dicha estructura que tiene un peso molecular Mw normal de alrededor de 5 a alrededor de  $25 \times 10^5$  g/mol (nombre común schizophyllano). Se debe hacer mención, además, a homopolisacáridos de dicha estructura que se secretan por Sclerotium rolfsii (nombre común: escleroglucanos).

Se conocen procedimientos para producir homopolisacáridos ramificados a partir de unidades de glucosa de unión 1-3 mediante fermentación de cepas fúngicas.

5 Los documentos EP 0 271 907 A2 y EP 0 504 673 A1 divulgan procedimientos y cepas fúngicas para producir homopolisacáridos ramificados que se componen de unidades de unión 1,3 en la cadena principal. La producción se lleva a cabo mediante fermentación discontinua de las cepas con agitación y aireación. El medio nutritivo consiste esencialmente de glucosa, extracto de levadura, fosfato de dihidrógeno de potasio, sulfato de magnesio y agua. El polímero se secreta mediante el hongo en el caldo de fermentación acuoso, y, por último, se separa una solución de polímero acuosa a partir del caldo de fermentación que comprende biomasa mediante, por ejemplo, centrifugación o  
10 filtración.

El documento DE 40 12 238 A1 divulga un procedimiento para aumentar el rendimiento espacio-tiempo durante la producción de biopolímeros no iónicos, en especial, de las cepas fúngicas que se divulgan en EP 0 271 907 A2. Para aumentar el rendimiento espacio-tiempo, se divulga la limitación de oxígeno por un lado, y, además, el cizallamiento de las paredes celulares con homogeneización del caldo de cultivo, y también, la evasión de la  
15 formación de gránulos durante el cultivo. Para el cizallamiento, se propone una bomba de rueda dentada en una derivación.

Los procedimientos para fermentación de cepas fúngicas se conocen a partir de, por ejemplo, EP 0 271 907 A2, EP 0 504 673 A1, DE 40 12 238 A1, WO 03/016545 A2.

20 En especial, los documentos EP 0 271 907 A2, EP 0 504 673 A1 y DE 40 12 238 A1 divulgan procedimientos para la preparación, a saber, la preparación se efectúa mediante fermentación por lotes del hongo *Schizophyllum commune* con agitación y aireación. El medio de cultivo comprende sustancialmente glucosa, extracto de levadura, fosfato de dihidrógeno de potasio, sulfato de magnesio y agua. El documento EP 0 271 907 A2 describe un procedimiento para separar el polisacárido, en el que la suspensión de cultivo se centrifuga en primer lugar y el polisacárido se precipita a partir del sobrenadante con isopropanol. Un segundo procedimiento comprende una filtración por presión seguida  
25 por una ultrafiltración de la solución que se obtiene, sin detalles del procedimiento que se ha divulgado. "Udo Rau, "Biosynthese, Produktion und Eigenschaften von extrazellulären Pilz-Glucanen", Habilitationsschrift, Universidad Técnica de Brunswick, 1997, páginas 70 a 95" y "Udo Rau, Biopolymers, Editor A. Steinbüchel, Volumen 6, páginas 63 a 79, WILEY-VCH Publishers, Nueva York, 2002" describen la preparación de schizophyllano mediante fermentación continua o por lotes. Para impedir la formación de gránulos, el caldo de fermentación se hizo circular en un circuito externo equipado con una bomba de rueda dentada. "GIT Fachzeitung Labor 12/92, páginas 1233 - 1238" describe una preparación continua de glucanos de unión  $\beta$ -1,3 ramificados con reciclaje celular. El documento WO 03/016545 A2 divulga un procedimiento continuo para la preparación de escleroglucanos usando *Sclerotium rolfsii*.  
30

35 Los documentos US 5,010,186 y US 4,873,323 divulgan biopolímeros de polisacáridos que tienen capacidad de filtro mejorada que se preparan mediante acidificación de una composición de polisacáridos acuosa con ácido nítrico a un valor de pH de alrededor de 2 a 0,1 y tratando dicha composición acidificada a una temperatura de entre alrededor de 50 °C a 100 °C durante alrededor de 5 a 60 minutos.

El documento US 4,667,026 describe una solución acuosa de biopolímeros de polisacáridos que se trata con calor durante más de 5 minutos a un valor de pH que varía de entre 3,5 a 6,2 para mejorar la capacidad de filtro de esta.

40 Resulta esencial que una solución acuosa que comprende al menos un beta-glucano que se usa para inundación con polímeros no comprenda ninguna partícula de gel u otras partículas pequeñas en absoluto. Incluso un pequeño número de partículas que tienen dimensiones del orden del micrón bloquea los poros finos en la formación que contiene petróleo mineral y, de este modo, al menos complica o incluso detiene la producción de petróleo mineral.

45 Por consiguiente, resulta, por lo tanto, importante, además, que las soluciones acuosas que contienen al menos un beta-glucano se encuentren sustancialmente libres de células y fragmentos celulares debido a que estas células y/o fragmentos celulares bloquean por lo demás la formación de petróleo mineral que complica la extracción del petróleo mineral o incluso la hace imposible. La así denominada Tasa de Filtración (valor FR) puede usarse para caracterizar la calidad de soluciones acuosas que comprende al menos un beta-glucano.

50 En principio, el retiro de fragmentos celulares, partículas de gel y otras partículas pequeñas podría mejorarse mediante el uso de membranas de filtro con un tamaño de poro pequeño. Sin embargo, al reducir el tamaño de poro, las membranas de filtro retienen también los beta-glucanos cada vez más, en especial, las fracciones de los beta-glucanos que tienen pesos moleculares muy altos. La retención de beta-glucanos con un peso molecular muy alto conduce a una pérdida de beta-glucanos y hace que el procedimiento general para la producción de beta-glucanos sea menos económico.

55 De manera, adicional, una solución acuosa de beta-glucanos resulta susceptible a invasión bacteriana. Como los beta-glucanos actúan como un nutriente para la bacteria, los beta-glucanos se degradan. Al producirse la degradación de los beta-glucanos, se excretan productos no convenientes a partir del metabolismo de la bacteria en la solución acuosa tales como, por ejemplo, ácido sulfhídrico. Debido a la formación de productos no deseados, la solución acuosa que contiene, al menos, un beta-glucano no puede usarse para aplicaciones de campo de petróleo.

5 De manera general, a pesar de que se conocen procedimientos para producir homopolisacáridos ramificados que se forman de unidades de glucosa de unión 1,3 mediante fermentación de cepas fúngicas a partir del estado de la técnica anterior, existe un problema con la producción en cuanto a que los hongos tienen una tendencia hacia la formación de gránulos durante el crecimiento. Si el tamaño de los gránulos excede un diámetro de alrededor de 0,3 cm, los hongos en el núcleo de los gránulos no pueden ser provistos de manera adecuada con oxígeno. El fenómeno de limitación de oxígeno hace su aparición. Esta condición conduce entonces a muerte celular de los hongos y a la formación de productos secundarios no convenientes tal como etanol, lo que significa que el rendimiento espacio-tiempo durante la producción de los homopolisacáridos se reduce drásticamente.

10 Los procedimientos que se especifican en el estado de la técnica anterior para impedir la formación de gránulos de hongos no se pueden reproducir de manera adecuada y no pueden usarse, por lo tanto, para procedimientos que se llevan a cabo a escala industrial, que se llevan a cabo en especial en tanques de fermentación mayores que 5 m<sup>3</sup>. Existió, por lo tanto, la necesidad de proporcionar procedimientos adicionales para la fermentación de cepas fúngicas que hacen posible la producción de homopolisacáridos con un rendimiento espacio-tiempo (STY) alto.

15 Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar, de este modo, un procedimiento para la fermentación de cepas fúngicas que secretan glucanos con una cadena principal unida  $\beta$ -1,3-glicosídicamente y grupos laterales unidos  $\beta$ -1,6-glicosídicamente a esta con un rendimiento espacio-tiempo alto.

### Sumario de la invención

20 La presente invención proporciona un procedimiento para la fermentación de cepas fúngicas que secretan glucanos con una cadena principal unida  $\beta$ -1,3-glicosídicamente y grupos laterales unidos  $\beta$ -1,6-glicosídicamente a esta de acuerdo con el objeto de la reivindicación(es) independiente. Realizaciones adicionales se incorporan en las reivindicaciones dependientes.

25 De acuerdo con una realización de ejemplo, se proporciona un procedimiento para la fermentación de cepas fúngicas que secretan glucanos con una cadena principal unida  $\beta$ -1,3-glicosídicamente y grupos laterales unidos  $\beta$ -1,6-glicosídicamente a esta, en una cascada de tanques que comprende, al menos, un primer tanque con un primer volumen y un segundo tanque con un segundo volumen, que comprende, al menos, las etapas de

a) fermentación de las cepas fúngicas en un primer medio acuoso en el primer tanque y el volumen del primer medio acuoso, dando como resultado una primera mezcla,

b) transferencia de la primera mezcla al segundo tanque, y

30 c) fermentación de las cepas fúngicas en la primera mezcla en un segundo medio acuoso en el segundo tanque y el volumen del segundo medio acuoso, dando como resultado una segunda mezcla, donde la proporción del volumen de la primera mezcla con respecto al volumen del segundo tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 0,1$  % al  $\leq 50$  % y donde la primera mezcla en la etapa b) se pasa a través de, al menos, un mezclador de cizalla o mezclador de alta cizalla, el mezclador de cizalla o mezclador de alta cizalla tiene una geometría de cizallamiento, de manera tal que la primera mezcla entera pasa por completo a través de la geometría de cizallamiento del, al menos, un mezclador de cizalla o mezclador de alta cizalla.

40 De este modo, resulta posible tratar la primera mezcla mediante un mezclador de alta cizalla con el fin de mantener un tamaño pequeño de aglomerados fúngicos antes de que se inicie una segunda etapa de fermentación. Esto aumentará significativamente la eficiencia del procedimiento de fermentación. Los aglomerados crecen en tamaño durante la fermentación. Aglomerados más grandes tienen una tasa de fermentación relativamente menor, de manera tal que podría resultar conveniente si se mantiene el tamaño menor de los aglomerados. Mediante el tratamiento de los aglomerados con un procedimiento de cizallamiento, el tamaño disminuye, de manera tal que el procedimiento de fermentación posterior resulta más eficiente.

45 Como el proceso para fermentación de glucanos con una etapa de fermentación en un primer tanque y una etapa adicional de fermentación en un segundo tanque que incluye una transferencia a partir del primer tanque al segundo tanque incluye un mezclador de alta cizalla, de manera tal que la mezcla entera pasa a través de la geometría de cizallamiento del mezclador de alta cizalla, el resultado de cizallamiento se vuelve más homogéneo con respecto a un cizallamiento en un procedimiento por lotes, donde el mezclador de alta cizalla se dispone dentro del tanque. En el último caso, algunas partes de la mezcla pasan de manera regular por el mezclador de alta cizalla dos veces o más, mientras que otras partes no pasan por el mezclador de alta cizalla en absoluto. Por consiguiente, sin una mezcla de alta cizalla durante la cual la mezcla entera pasa a través de la geometría de cizallamiento del mezclador de alta cizalla, tiene lugar un amplio espectro de tamaño de partículas que incluye partículas muy pequeñas (que pasaron dos veces o más) y muy grandes (que no pasaron). La invención proporciona, sin embargo, un procedimiento en el que un mezclador de alta cizalla en un procedimiento de flujo impulsa a la mezcla entera para que pase por el mezclador, de manera tal que el espectro de tamaño de partícula es mucho más pequeño, ya que cada parte de la mezcla pasa la geometría del mezclador de alta cizalla. Un espectro pequeño da como resultado una fermentación posterior más equilibrada, de manera tal que el mezclador de alta cizalla en línea con la invención da como resultado un resultado de fermentación mejor, más rápido y de mayor confianza. Por lo tanto, los

mezcladores por lotes como, por ejemplo, una máquina Ultraturax para un procedimiento de cizallamiento no brindan resultados de fermentación comparables.

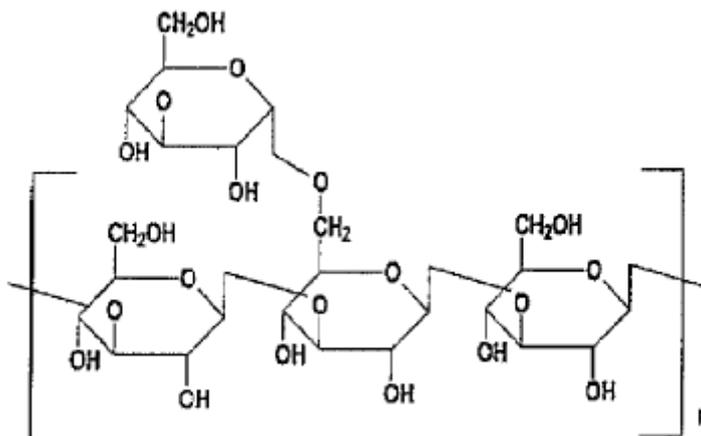
5 Los glucanos son una clase de homopolisacáridos cuyo bloque estructural monomérico es exclusivamente glucosa. La molécula de glucosa puede unirse  $\alpha$ -glicosídicamente o  $\beta$ -glicosídicamente, ramificarse en diversos grados o ser lineal. Se prefiere que los glucanos se seleccionen a partir del grupo que consiste de celulosa, amilosa, dextrano, glicógeno, lichenina, laminarina a partir de alga, pachyman a partir de hongos de árbol y glucanos de levadura con enlaces  $\beta$ -1,3; nigerano, un micodextrano aislado a partir de hongos ( $\alpha$ -1,3-glucano,  $\alpha$ -1,4-glucano), curdlano ( $\beta$ -1,3-glucano), pululano (unión  $\alpha$ -1,4 y unión  $\alpha$ -1,6 D-glucano) y schizophyllano ( $\beta$ -1,3 cadena principal,  $\beta$ -1,6 cadena lateral) y pustulano ( $\beta$ -1,6-glucano).

10 El glucano comprende preferiblemente una cadena principal que se compone de unidades de glucosa unidas  $\beta$ -1,3 glicosídicamente y grupos laterales que se componen de unidades de glucosa y se unen  $\beta$ -1,6 glicosídicamente a la cadena principal. Los grupos laterales consisten preferiblemente de una sola unidad de glucosa unida  $\beta$ -1,6 glicosídicamente, con, de manera estadística, cada tercera unidad de la cadena principal, uniéndose  $\beta$ -1,6 glicosídicamente con una unidad de glucosa adicional. Dependiendo de la fuente y procedimiento de aislamiento, los beta-glucanos tienen diversos grados de ramificación y uniones en las cadenas laterales.

20 De manera general, en el contexto de la invención que se reivindica actualmente, el beta-glucano según se describe en la presente puede ser cualquier beta-glucano, tal como beta-1,4-glucanos, beta-1,3-glucanos, beta-1,6-glucanos y beta-1,3(1,6)-glucanos. En una realización, el beta-glucano es un polímero que consiste de una cadena principal lineal de unidades beta-D-(1,3)-glucopiranosil que tienen una sola unidad beta-D-glucopiranosil (1-6) unida a una unidad beta-D-glucopiranosil de la cadena principal lineal con un grado de ramificación promedio de alrededor de 0,3. En el contexto de la invención que se reivindica actualmente, el término "grado de ramificación promedio de alrededor de 0,3" significa que en promedio alrededor de 3 de 10 unidades beta-D-(1,3)-glucopiranosil se encuentran (1,6) unidas a una sola unidad beta-D-glucopiranosil. En este contexto, el término "alrededor de" significa que el grado de ramificación promedio puede encontrarse dentro del rango de 0,25 a 0,35, preferiblemente, de 0,25 a 0,33, más preferiblemente, de 0,27 a 0,33, de mayor preferencia, de 0,3 a 0,33. Podría ser, además, de 0,3 a 0,33. El grado de ramificación promedio de un beta-glucano puede determinarse mediante procedimientos que se conocen en el estado de la técnica, por ejemplo, mediante análisis de oxidación periódica, análisis de azúcar metilada y NMR (Brigand, Industrial Gums, Academic Press, Nueva York/USA (1993), 461-472).

30 En el contexto de la invención que se reivindica actualmente, el, al menos, un beta-glucano para producirse según se describe en la presente se selecciona preferiblemente a partir del grupo que consiste de schizophyllano y escleroglucano, en especial, preferiblemente el, al menos, un beta-glucano es schizophyllano.

35 Schizophyllano y escleroglucano pueden ambos referirse como beta-1,3-glucanos. Schizophyllano y escleroglucano tienen un grado de ramificación promedio de entre 0,25 y 0,33 (Novak, loc cit, Survase, loc cit); por ejemplo, escleroglucano y schizophyllano tienen un grado de ramificación promedio de 0,3 a 0,33. Las cadenas del polisacárido forman normalmente una estructura tridimensional de triple hélices; cadenas de polímeros que consisten de unidades de glucosa cuyo grupos hidroxilo en la posición 1 y 3 se encuentran  $\beta$ -unidos para formar la cadena principal de polímeros, y en la que cada tercera unidad de glucosa contiene en la posición 6 una molécula de glucosa adicional unida mediante su función hidroxilo en la posición 1 (unión beta-1,3-glucopiranososa como la cadena principal y unión beta-1,6-glucopiranososa como cadenas laterales) y tiene la formula estructural donde n es un número en el rango de 7000 a 35000:



en la que n es un número que proporciona el componente beta-1,3-glucano con un peso molecular promedio (Mw) de  $5 \cdot 10^5$  g/mol to  $25 \cdot 10^6$  g/mol, que se determina mediante GPC (Cromatografía por permeación de gel).

- Las cepas fúngicas que secretan tales glucanos se conocen por la persona capacitada en el estado de la técnica. Las cepas fúngicas se seleccionan preferiblemente a partir del grupo que consiste de *Schizophyllum commune*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium glaucanicum*, *Monilinia fructigena*, *Lentinula edodes* y *Botrytis cinera*. Las cepas fúngicas adecuadas se mencionan además, por ejemplo, en EP 0 271 907 A2 y EP 0 504 673 A1. Las cepas fúngicas que se usan son preferiblemente, en especial, *Schizophyllum commune* o *Sclerotium rolfsii* y muy en especial, preferiblemente, *Schizophyllum commune*. Esta cepa fúngica secreta un glucano en el que, en una cadena principal que se compone de unidades de glucosa unidas  $\beta$ -1,3-glicosídicamente, cada tercera unidad – vista de manera estadística- de la cadena principal se une  $\beta$ -1,6-glicosídicamente a una unidad de glucosa adicional; a saber, el glucano es preferiblemente el así denominado schizophyllano.
- Schizophyllanos comunes tienen un peso molecular promedio en peso Mw de alrededor de  $5 \cdot 10^5$  g/mol a  $25 \cdot 10^6$  g/mol.
- Las cepas fúngicas se fermentan en un medio acuoso o medio nutritivo adecuados. Durante la fermentación, los hongos secretan la clase de glucanos que se mencionan anteriormente en el medio acuoso.
- Los procedimientos para la fermentación de las cepas fúngicas que se mencionan anteriormente se conocen en principio por la persona capacitada en el estado de la técnica, a partir de, por ejemplo, EP 0 271 907 A2, EP 0 504 673 A1, DE 40 12 238 A1, WO 03/016545 A2, y "Udo Rau, "Biosynthese, Produktion und Eigenschaften von extrazellulären Pilz- Glucanen [Biosynthesis, production and properties of extracellular fungal glucans]", Tesis postdoctoral, Universidad Técnica de Braunschweig, 1997". Estos documentos describen cada uno, además, medios acuosos o medios nutritivos adecuados.
- Las cepas fúngicas se cultivan preferiblemente en un medio acuoso a una temperatura en el rango de 15 °C a 40 °C, en especial, preferiblemente, en el rango de 25 a 30 °C, preferiblemente con aireación y agitación, usando, por ejemplo, un agitador.
- Con el fin de asegurar un procedimiento eficiente para la fermentación de las cepas fúngicas, la fermentación se lleva a cabo en una cascada de tanques. En esta conexión, en un tanque anterior, se produce una cantidad de cepas fúngicas y, de este modo, además, un volumen del medio acuoso que resultan adecuado para producir una fermentación, tan rápido como sea posible, en el tanque posterior.
- De acuerdo con una realización de ejemplo, el mezclador de alta cizalla es un mezclador de rotor/estator que tiene un rotor y un estator.
- De este modo, resulta posible proporcionar un procedimiento de corte eficiente, en especial cuando se transfiere la mezcla a partir del primer tanque al segundo tanque. Un mezclador de rotor/estator tiene una alta capacidad de flujo y una característica de cizallamiento confiable. Además, un mezclador de rotor/estator permite un procedimiento en línea que significa que una vez que la mezcla pasa una vez la geometría de cizallamiento y luego se corta lo suficiente. De acuerdo con una realización de ejemplo, el mezclador(es) de rotor/estator incluye tipos de, por ejemplo, dispersores de corona dentada, fresadoras de espacio anular y fresadoras coloides.
- De acuerdo con una realización de ejemplo, el mezclador de rotor/estator es una máquina dispersora de corona dentada.
- De este modo, resulta posible proporcionar una geometría de cizallamiento confiable. Si los aglomerados luego del procedimiento de cizallamiento son demasiado pequeños, o se destruyen durante cizallamiento, el procedimiento de fermentación podría ser, además, menos eficiente. Una máquina dispersora de corona dentada permite un cizallamiento suficiente sin destruir demasiado a los aglomerados.
- De acuerdo con una realización de ejemplo se usan mezcladores de rotor/estator que tienen medios para generar fuerzas de cavitación. Los medios de este tipo pueden ser elevaciones en el lado del rotor y/o estator que se proyectan en la cámara de mezcla y que tienen, al menos, una cara donde la normal tiene una porción tangencial, tal como, por ejemplo, pasadores, dientes o cuchillas o anillos coaxiales que tienen hendiduras que se disponen radialmente.
- De acuerdo con una realización de ejemplo, el mezclador de rotor/estator tiene en el lado del rotor, al menos, una corona dentada giratoria que se dispone simétricamente y/o, al menos, un anillo giratorio que se dispone simétricamente que tiene hendiduras radiales (anchos espaciales). Los aparatos de este tipo se denominan, además, como dispersores de corona dentada o máquinas dispersoras de corona dentada. En especial, el mezclador de rotor/estator tiene, tanto en el lado del rotor como en el lado del estator, al menos, una corona dentada giratoria que se dispone simétricamente y/o anillo con hendiduras radiales (anchos espaciales), donde las coronas dentadas/anillos que se disponen en el lado del rotor y estator se disponen coaxialmente y ensamblan mutuamente para formar un espacio anular.
- De acuerdo con una realización de ejemplo, el mezclador de rotor/estator tiene una construcción que corresponde a un soporte con rebordes anulares con hendiduras que se cortan en estos y un rotor con rebordes anulares con hendiduras que se cortan en estos que se disponen concéntricamente y que se disponen a una distancia tal que se

- 5 ensamblan unos con respecto a los otros. Con este mezclador de rotor/estator, el medio acuoso o mezclas se alimentan en la sección media entre el soporte/estator y el rotor, mientras que el rotor se deja para que gire, de manera tal que presiona el medio acuoso o mezcla a través de la hendidura y el espacio se posiciona en el medio de la sección media en la dirección del perímetro.
- 10 De acuerdo con una realización de ejemplo, al menos, uno del rotor y el estator del mezclador de rotor/estator tiene, al menos, dos coronas dentadas concéntricas y el otro del rotor y el estator tiene, al menos, una corona dentada, en la que la, al menos, una corona dentada del otro del rotor y el estator se intercala concéntricamente con las, al menos, dos coronas dentadas, en la que el primer medio acuoso pasa a través de las coronas dentadas intercaladas.
- 15 De este modo, resulta posible tener una trayectoria de flujo definida a través del mezclador de alta cizalla. La geometría de cizallamiento puede tener una geometría, que permite un procedimiento de cizallamiento bien definido, que da como resultado aglomerados que tienen una distribución de tamaño adecuado.
- 20 De acuerdo con una realización de ejemplo las, al menos, dos coronas dentadas concéntricas de uno del rotor y el estator y la, al menos, una corona dentada del otro del rotor y el estator tienen una geometría de diente equidistante, en la que la distancia entre los dientes adyacentes de la respectiva corona dentada externa es mayor que la distancia entre los dientes adyacentes de la respectiva corona dentada interna, en la que el primer medio acuoso pasa a través de las coronas dentadas intercaladas en una dirección de distancia de dientes en ascenso.
- 25 De este modo, resulta posible proporcionar un procedimiento de cizallamiento cuasi escalonado dentro del mezclador de rotor/estator. Como todas las coronas dentadas del rotor giran con el mismo número de revoluciones por minuto, la velocidad en pista de las coronas externas radiales es mayor con respecto a la velocidad en pista de las coronas internas radiales. Cuando se proporciona una mayor distancia entre dientes en las coronas externas radiales, el efecto de cizallamiento puede adaptarse y se puede evitar una destrucción de los aglomerados, en especial, en las coronas externas. Además, se puede evitar un efecto antiobturación en la trayectoria de flujo del mezclador de alta cizalla.
- 30 De acuerdo con una realización de ejemplo, la primera mezcla pasa a través de un espacio en dirección radial, cuyo espacio en una dirección radial se forma mediante el intercalado de manera concéntrica de, al menos, dos coronas dentadas concéntricas de uno del rotor y el estator y de la, al menos, una corona dentada del otros del rotor y el estator, en la que el espacio entre el diámetro externo de una corona dentada y un diámetro interno de una corona dentada adyacente exteriormente radial tiene un ancho de entre 0,2 mm y 2,0 mm, preferiblemente, de 0,4 mm y 1,2 mm, más preferiblemente, de entre 0,8 mm y 0,9 mm.
- 35 De este modo, el tamaño de los aglomerados cuando dejan el mezclador de cizallamiento puede ser de un rango de tamaño en particular. Este rango de tamaño puede conducir a un procedimiento de fermentación especialmente eficiente en el tanque posterior por detrás del mezclador de alta cizalla.
- 40 De acuerdo con una realización de ejemplo, la primera mezcla permanece por entre 0,01 s y 0,004 s, preferiblemente entre 0,02 y 0,07 s, más preferiblemente, 0,01 s +/- 0,005 s mientras pasa las, al menos, dos coronas dentadas concéntricas de uno del rotor y el estator y la, al menos, una corona dentada del otro del rotor y el estator.
- 45 De este modo, el procedimiento de cizallamiento puede optimizarse. Cuanto más tiempo permanece la mezcla en el mezclador de cizalla, más demora el procedimiento de cizallamiento. Por otro lado, un pasaje rápido puede destruir los aglomerados o puede conducir a un tamaño de aglomerado muy grande para un procedimiento de fermentación efectivo.
- De acuerdo con una realización de ejemplo, los bordes de los dientes a lo largo de la trayectoria de flujo a través de la geometría de cizallamiento tienen bordes redondeados con un radio de, al menos, 0,2 mm, en especial, más de 3 mm.
- De este modo, los aglomerados no chocan con bordes filosos y no conllevan un corte. Los bordes redondeados permiten un cizallamiento de los aglomerados y, al mismo tiempo, protegen a los aglomerados de un corte no deseado dentro del mezclador de alta cizalla. Además, pueden evitarse los aglomerados particulares o partes de estos y otros residuos que permanecen en la geometría de cizallamiento.
- 50 De acuerdo con una realización de ejemplo, el rotor gira a una velocidad con respecto al estator de entre 250 y 7200, preferiblemente de entre 1800 y 6000, más preferiblemente de entre 4000 y 4500 revoluciones por minuto.
- De este modo, el procedimiento de cizallamiento, en especial, en vista de las geometrías y dimensiones que se describen anteriormente, resulta eficiente y el procedimiento de fermentación posterior resulta también eficiente.
- 55 De acuerdo con una realización de ejemplo, el rotor gira a una velocidad periférica/en pista de la corona dentada más externa de entre 2 m/s y 60 m/s, preferiblemente, de entre 15 m/s y 50 m/s, más preferiblemente, de entre 35 m/s y 45 m/s.

De este modo, la fuerza máxima puede mantenerse en un rango particular dentro del mezclador de alta cizalla. En especial, los aglomerados no sufren de un tratamiento de tensión demasiado alta lo que conduciría posiblemente a una destrucción de los aglomerados.

- 5 De acuerdo con una realización de ejemplo, la proporción del volumen de la primera mezcla con respecto al volumen del segundo tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 1\%$  al  $\leq 20\%$ .

De este modo, el procedimiento de fermentación puede volverse más eficiente. De acuerdo con una realización de ejemplo, la proporción del volumen de la primera mezcla con respecto al volumen del segundo tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 2,5\%$  al  $\leq 15\%$ .

- 10 De acuerdo con una realización de ejemplo el, al menos, un beta-glucano se selecciona a partir del grupo que consiste de *Schizophyllan* y *Scleroglucan*, en el que *Schizophyllan* o *Scleroglucan* se obtienen mediante fermentación de cepas fúngicas. De acuerdo con una realización de ejemplo, las cepas fúngicas son *Schizophyllum commune* o *Sclerotium rolfsii*.

- 15 De acuerdo con una realización de ejemplo, el procedimiento para la fermentación de cepas fúngicas se lleva a cabo en una cascada de tanques que comprende, además, un tercer tanque con un tercer volumen, y el procedimiento comprende, además, al menos, las etapas de

d) transferencia de la segunda mezcla al tercer tanque, y

- 20 e) fermentación de las cepas fúngicas en la segunda mezcla en un tercer medio acuoso en el tercer tanque, en la que la proporción de la segunda mezcla con respecto al volumen del tercer tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 0,1\%$  al  $\leq 50\%$ .

De este modo, se puede proporcionar una etapa en cascada adicional. El procedimiento de fermentación puede mejorarse por completo. Tres etapas de fermentación con dos procedimientos de cizallamiento intercalados permiten un procedimiento más controlado para la fermentación de cepas fúngicas. El procedimiento completo puede acelerarse y la eficiencia puede aumentarse.

- 25 De acuerdo con una realización de ejemplo, la segunda mezcla en la etapa d) pasa a través de, al menos, un mezclador de alta cizalla, el mezclador de alta cizalla tiene una geometría de cizallamiento, de manera tal que la segunda mezcla entera pasa por completo a través de la geometría de cizallamiento del, al menos, un mezclador de alta cizalla.

- 30 De acuerdo con una realización de ejemplo, la proporción de la segunda mezcla con respecto al volumen del tercer tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 1\%$  al  $\leq 20\%$ , en especial, en el rango de entre el  $\geq 2,5\%$  al  $\leq 15\%$ .

El mezclador de alta cizalla es preferiblemente un mezclador de alta cizalla que se selecciona a partir del grupo que consiste de mezcladores de rotor/estator y homogeneizadoras de alta presión, según se describen anteriormente.

- 35 De acuerdo con una realización de ejemplo, se proporciona un procedimiento para la fermentación de cepas fúngicas que secretan glucanos con una cadena principal unida  $\beta$ -1,3-glicosídicamente y grupos laterales unidos  $\beta$ -1,6-glicosídicamente a esta en una cascada de tanques que comprende, al menos, un primer tanque con un primer volumen, un segundo tanque con un segundo volumen, un tercer tanque con un tercer volumen y un cuarto tanque con un cuarto volumen, que comprende, al menos, las etapas de

a) fermentación de cepas fúngicas en un primer medio acuoso en el primer tanque y el volumen del primer medio acuoso dando como resultado una primera mezcla,

- 40 b) transferencia de la primera mezcla al segundo tanque,

c) fermentación de cepas fúngicas en la primera mezcla en un segundo medio acuoso en el segundo tanque y el volumen del segundo medio acuoso dando como resultado una segunda mezcla,

d) transferencia de la segunda mezcla al tercer tanque,

- 45 e) fermentación de cepas fúngicas en la segunda mezcla en un tercer medio acuoso en el tercer tanque y el volumen del tercer medio acuoso dando como resultado una tercera mezcla,

f) transferencia de la tercera mezcla al cuarto tanque,

g) fermentación de cepas fúngicas en la tercera mezcla en un cuarto medio acuoso en el cuarto tanque,

- 50 donde la proporción del volumen de la primera mezcla con respecto al volumen del segundo tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 0,1\%$  al  $\leq 50\%$ , la proporción del volumen de la segunda mezcla con respecto al volumen del tercer tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 0,1\%$  al  $\leq 50\%$ , y la proporción del volumen de la tercera mezcla con respecto al volumen del cuarto tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 0,1\%$  al  $\leq 50\%$ , en la que

- la primera mezcla en la etapa b) se pasa a través de, al menos, un mezclador de alta cizalla y/o la segunda mezcla en la etapa d) se pasa a través de, al menos, un mezclador de alta cizalla y/o la tercera mezcla en la etapa f) se pasa a través de, al menos, un mezclador de alta cizalla, en la que, al menos, uno de los mezcladores de alta cizalla tiene una geometría de cizallamiento, de manera tal que la mezcla entera respectiva pasa por completo a través de la geometría de cizallamiento del, al menos, un mezclador de alta cizalla.
- 5
- De acuerdo con una realización de ejemplo, la proporción del volumen del primer medio acuoso con respecto al volumen del segundo tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 0,1\%$  al  $\leq 20\%$ , especialmente, en el rango de entre el  $\geq 2,5\%$  al  $\leq 15\%$ .
- 10
- De acuerdo con una realización de ejemplo, la proporción del volumen del segundo medio acuoso con respecto al volumen del tercer tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 1\%$  al  $\leq 20\%$ , especialmente, en el rango de entre el  $\geq 2,5\%$  al  $\leq 15\%$ .
- De acuerdo con una realización de ejemplo, la proporción del volumen del tercer medio acuoso con respecto al volumen del cuarto tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 1\%$  al  $\leq 20\%$ , especialmente, en el rango de entre  $\geq 2,5\%$  a  $\leq 15\%$ .
- 15
- De acuerdo con una realización de ejemplo, la fermentación se lleva a cabo de manera tal que la concentración de los glucanos para prepararse en el medio acuoso al final del procedimiento de fermentación en el último tanque del reactor en cascada es de, al menos, 3 g/l. El límite superior no se limita en principio. Este resulta a partir de cuanta viscosidad puede manejarse todavía en el tanque que se usa.
- 20
- De acuerdo con una realización de ejemplo, los mezcladores de alta cizalla que se usan en la etapa de transferencia tienen un diseño idéntico o diferente en las etapas individuales. De acuerdo con una realización de ejemplo, los mezcladores de rotor/estator que se usan en la etapa de transferencia en las etapas individuales tienen un diseño idéntico o diferente.
- 25
- Los mezcladores de rotor/estator pueden comprender, además, en principio, todos los tipos de mezcladores dinámicos en los que un rotor de alta velocidad, que puede ser de rotación simétrica, coopera con un estator para formar una o más regiones de procesamiento que tienen esencialmente la forma de un espacio anular. En estas regiones de procesamiento, el material de mezcla se somete a tensiones cortantes severas mientras que el alto nivel de turbulencia que prevalece frecuentemente dentro de los espacios anulares promueve asimismo la operación de mezcla.
- 30
- En una realización adicional, el mezclador de alta cizalla es una homogeneizadora de alta presión. En un mezclador como tal, el medio acuoso se fuerza a través de una pequeña abertura bajo alta presión.
- Preferiblemente, la alta presión se encuentra en el rango de 100 bares a 2000 bares, en especial, preferiblemente, en el rango de 200 bares a 1000 bares.
- 35
- Preferiblemente, la pequeña abertura tiene un diámetro en el rango de 0,5 a 2,5 cm, en especial, preferiblemente, en el rango de 0,8 a 2,0 cm.
- En una realización adicional, el caldo de fermentación que comprende, al menos, un beta-glucano y biomasa (células fúngicas con o sin constituyentes celulares) se filtra al final del procedimiento de fermentación.
- Preferiblemente, el contenido del tanque de fermentación se filtra después de la fermentación con el uso de membranas de filtro asimétricas o membranas de filtro simétricas.
- 40
- De manera alternativa, el caldo de fermentación se retira de manera continua o de manera periódica de la planta mediante una corriente lateral y una solución acuosa que comprende, al menos, un beta-glucano se separa a partir de este mediante microfiltración por flujo cruzado. El caldo de fermentación acuoso restante en el que la biomasa tiene una concentración más elevada que antes puede reciclarse, al menos parcialmente, con respecto al contenedor de fermentación.
- 45
- El procedimiento de microfiltración por flujo cruzado se conoce en principio por la persona capacitada en el estado de la técnica y se describe en, por ejemplo, "Melin, Rautenbach, Membranverfahren, Springer-Verlag, 3ra Edición, 2007, página 309 a página 366". Aquí, "microfiltración" se comprende por la persona capacitada en el estado de la técnica como que significa el retiro de partículas que tienen un tamaño de alrededor de 0,1  $\mu\text{m}$  a alrededor de 10  $\mu\text{m}$ .
- 50
- En la filtración por flujo cruzado, se aplica una corriente de líquido para filtrar, mediante, por ejemplo, una bomba de circulación adecuada, paralela con respecto a la superficie de la membrana que se usa como material de filtro. Por lo tanto, una corriente de líquido fluye de manera continua en la membrana de filtro, y se impide la formación de depósitos en la superficie de membrana o, al menos, se reduce de esta manera. En principio, todo tipo de bombas resultan adecuadas como la bomba. Debido a la alta viscosidad del medio para transportarse, sin embargo, en

especial bombas de desplazamiento positivo o bombas de tornillo muy excéntricas en particular y bombas de pistón rotativo han demostrado ser muy útiles.

5 Preferiblemente, membranas de filtro asimétricas o membranas tubulares simétricas se usan para la microfiltración por flujo cruzado. Las membranas de filtro asimétricas consisten de, al menos, dos capas diferentes que tienen diferente tamaño de poro, a saber, de, al menos, una capa de soporte y una capa separadora. La capa de soporte es gruesa en comparación y tiene poros comparativamente más grandes. Esta transmite la fuerza mecánica a la membrana de filtro. Al menos, una capa separadora que tiene poros más finos en comparación con los poros de la capa de soporte se aplica a la capa de soporte. Por ejemplo, la porosimetría de mercurio puede usarse en una  
10 manera que se conoce en principio para medir los tamaños de poro. De manera opcional, una o más capas intermedias pueden disponerse, además, entre la capa separadora y la capa de soporte.

Las membranas asimétricas pueden ser, por ejemplo, membranas metálicas o membranas cerámicas. Las membranas asimétricas que se usan son preferiblemente membranas cerámicas asimétricas. Detalles de membranas cerámicas asimétricas se describen en, por ejemplo, "Melin, Rautenbach, Membranverfahren, Springer-Verlag, 3ra edición, 2007, página 51 a página 52".  
15

Las membranas tubulares simétricas son membranas tubulares que tiene una distribución de poro que resulta esencialmente constante en toda la sección transversal de la pared de membrana. Las membranas tubulares simétricas se conocen por aquellos capacitados en el estado de la técnica y se describen en, entre otros, "Melin, Rautenbach, Membranverfahren, Springer-Verlag, 3ra edición, 2007, página 20".

20 La buena calidad de la solución acuosa que comprende, al menos, un beta-glucano puede resultar evidente a partir de buenas propiedades de filtración, que se expresan mediante la baja tasa de filtración (valor FR). En una realización preferida, el valor FR del producto puede encontrarse preferiblemente en el rango de  $\geq 10$  a  $\leq 1,8$ , más preferiblemente, en el rango de  $\geq 10$  a  $\leq 1,5$ , incluso más preferiblemente, en el rango de  $\geq 10$  a  $\leq 1,3$ .

En otra realización preferida, el rendimiento de, al menos, un beta-glucano después de la filtración, a saber, la cantidad de, al menos, un beta-glucano que puede recuperarse a partir del caldo de fermentación, que se basa en la cantidad de, al menos, un beta-glucano que se presenta en el caldo de fermentación antes de la filtración, se encuentra preferiblemente en el rango del  $\geq 25$  % al  $\leq 97$  %, más preferiblemente en el rango del  $\geq 30$  % al  $\leq 95$  % y de mayor preferencia en el rango del  $\geq 50$  % al  $\leq 93$  %.  
25

La solución acuosa que contiene, al menos, un beta-glucano puede trabajarse y concentrarse de manera adicional con el fin de obtener el, al menos, un beta-glucano en forma altamente concentrada. En una realización, la solución acuosa que comprende, al menos, un beta-glucano puede ponerse en contacto con, al menos, un agente precipitante para obtener, al menos, un beta-glucano precipitado en una mezcla de solventes que comprende agua y el, al menos, un agente precipitante. Preferiblemente, el agente precipitante se selecciona a partir del grupo que consiste de líquidos de bajo punto de ebullición, líquidos de alto punto de ebullición y mezclas de estos. Ejemplos de  
30 líquidos de bajo punto de ebullición son formatos como formato de metilo, éteres no cíclicos como dimetoximetano, éteres cíclicos como tetrahidrofurano, 2-metil-1,2-dioxalano, ésteres de ácido carboxílico como etanoato de etilo, alcoholes como metanol, etanol, isopropanol o propanol, cetonas como acetona o metiletilcetona, o mezclas de, al menos, dos de estos. Ejemplos de líquidos de alto punto de ebullición son polietilenglicoles que tienen pesos moleculares preferiblemente en el rango de 10 a 200 kD, más preferiblemente, en el rango de 15 a 120 kD, polipropilenglicoles que tienen pesos moleculares en el rango de 5 a 100 kD, más preferiblemente, 10 a 30 kD, o mezclas de, al menos, dos de estos. El, al menos, un agente precipitante se agrega, de manera general, a la solución acuosa que comprende, al menos, un beta-glucano, de manera tal que la proporción de volumen del agente precipitante con respecto a la solución acuosa se encuentra en el rango de, preferiblemente, 0,1:1 a 20:1, más preferiblemente, de 0,2:1 a 2:1, más preferiblemente, de 0,2:1 a 1,5:1, en cada caso sobre la base de la mezcla total que se obtiene.  
35  
40  
45

El, al menos, un beta-glucano precipitado puede separarse a partir de la mezcla de solventes que comprende agua y el, al menos, un agente precipitante para obtener un beta-glucano precipitado en forma altamente concentrada. La separación puede conducirse de manera general mediante cualquiera de los procedimientos conocidos por el experto capacitado, por ejemplo, *inter alia*, centrifugación, sedimentación, flotación y filtración.

50 El beta-glucano tal como schizophyllano que se obtiene de acuerdo con el procedimiento que se reivindica de manera inventiva puede modificarse adicionalmente después de la filtración y, de manera opcional, la concentración. El beta-glucano tal como schizophyllano puede convertirse mediante oxidación, conversión enzimática, hidrólisis ácida, calor y/o dextrinización ácida o corte. El beta-glucano tal como schizophyllano puede modificarse, además, químicamente, enzimáticamente o físicamente. Los derivados químicos del schizophyllano adecuados incluyen ésteres, tal como acetato y monoésteres, tal como succinato, succinato octenilo y succinato tetradecenilo, derivados del fosfato, éteres tal como éteres de hidroxialquilos y éteres catiónicos, y cualquiera de otros derivados o combinaciones de estos. Las modificaciones pueden ser, además, por entrecruzamiento químico. Los agentes de entrecruzamiento que resultan adecuados para uso en la presente incluyen oxiclورو de fósforo, epiclорhidrina, trimetafosfato de sodio y anhídridos que se mezclan con ácido adipico/ácido acético.  
55

Debería tenerse en cuenta que las características anteriores pueden también combinarse. La combinación de las características anteriores puede conducir, además, a efectos sinérgicos, incluso si no se describen en detalle de manera explícita.

- 5 Estos y otros aspectos de la presente invención se volverán aparentes a partir de y se elucidarán con referencia a las realizaciones que se describen a continuación.

**Breve descripción de los dibujos**

Las realizaciones de ejemplo de la presente invención se describirán a continuación con referencia a los siguientes dibujos.

- 10 La Fig. 1 ilustra un procedimiento de fermentación en dos etapas con un procedimiento de cizallamiento intercalado de acuerdo con una realización de ejemplo.
- La Fig. 2 ilustra un procedimiento de fermentación en tres etapas con un procedimiento de cizallamiento intercalado de acuerdo con una realización de ejemplo.
- 15 La Fig. 3 ilustra un procedimiento de fermentación en cuatro etapas con un procedimiento de cizallamiento intercalado de acuerdo con una realización de ejemplo.
- La Fig. 4 ilustra una vista en sección transversal de una geometría de mezcla de alta cizalla de acuerdo con una realización de ejemplo.
- La Fig. 5a ilustra una vista superior de uno de un rotor y un estator de un mezclador de alta cizalla de acuerdo con una realización de ejemplo.
- 20 La Fig. 5b ilustra una vista superior del otro de un rotor y un estator de un mezclador de alta cizalla de acuerdo con una realización de ejemplo en vista de la Fig. 5a.
- La Fig. 6 ilustra un corte detallado de una vista en sección transversal de una geometría de mezclador de alta cizalla de acuerdo con una realización de ejemplo.
- 25 La Fig. 7 ilustra un gráfico de ejemplo de rendimiento espacio-tiempo con el tiempo para un fermentador de laboratorio con/sin control morfológico.
- La Fig. 8 ilustra un gráfico de ejemplo de rendimiento espacio-tiempo con el tiempo para un fermentador de planta piloto con/sin control morfológico.

**Descripción detallada de realizaciones de ejemplo**

- 30 La Fig. 1 ilustra un procedimiento de fermentación en dos etapas con un procedimiento de cizallamiento intercalado de acuerdo con una realización de ejemplo. La Fig. 1 ilustra en especial la configuración general de la estructura de tanque y mezclador de cizalla. Un primer tanque K1 que tiene un primer volumen VK1 de tanque y recibe un primer medio M1 acuoso. Una fermentación de cepas fúngicas se lleva a cabo en el primer medio M1 acuoso, dando como resultado una primera mezcla S1. Durante la fermentación, las cepas fúngicas forman aglomerados. La primera mezcla S1 que incluye los aglomerados de cepas fúngicas se transfiere a un segundo tanque K2 que tiene un
- 35 segundo volumen VK2 de tanque. Un segundo medio M2 acuoso puede agregarse a la primera mezcla S1, de manera tal que tiene lugar una fermentación adicional de cepas fúngicas en la primera mezcla en un segundo medio acuoso en el segundo tanque, dando como resultado una segunda mezcla S2. Como los aglomerados en la primera mezcla antes de ser transferidos desde el primer tanque K1 al segundo tanque K2 son grandes y no permiten un procedimiento de fermentación eficiente en el segundo tanque, la primera mezcla S1 fluye a través de un mezclador
- 40 1 de alta cizalla que se dispone entre el primer tanque K1 y el segundo tanque K2. La proporción del volumen VM1 de la primera mezcla con respecto al volumen VK2 del segundo tanque se encuentra en el rango de entre el 0,1 % al 50 %. El mezclador 1 de alta cizalla es de un tipo en vista de una geometría de cizallamiento, de manera tal que la primera mezcla S1 entera pasa por completo a través de la geometría de cizallamiento del mezclador 1 de alta cizalla. La geometría detallada del mezclador de alta cizalla se describe a continuación con respecto a las Figs. 4,
- 45 5a, 5b y 6.
- La Fig. 2 ilustra un procedimiento de fermentación en tres etapas con dos procedimientos de cizallamiento intercalados de acuerdo con una realización de ejemplo. La Fig. 2 ilustra un primer tanque K31 con un primer volumen VK31 de tanque. Un primer medio M31 acuoso se encuentra en el primer volumen VK31 de tanque. Una fermentación de cepas fúngicas tiene lugar en el primer medio M31 acuoso, en el primer volumen VK31 de tanque,
- 50 dando como resultado una primera mezcla S31. La primera mezcla S31 se transfiere a un segundo tanque K32 que tiene un segundo volumen VK32 de tanque. Un medio M32 acuoso se agrega a la primera mezcla S31 en el segundo volumen VK32 de tanque, de manera tal que tiene lugar una fermentación de cepas fúngicas en la primera mezcla en el segundo medio M32 acuoso. Como las cepas fúngicas forman aglomerados durante la fermentación en el primer tanque, el tamaño de los aglomerados debería reducirse mediante, por ejemplo, un procedimiento de cizallamiento por un mezclador 1 de alta cizalla que se dispone entre el primer tanque K31 y el segundo tanque K32.
- 55

Por consiguiente, la primera mezcla S31 fluye a través del mezclador 1 de alta cizalla y se cortará, y luego ingresa al segundo tanque K32. La proporción del volumen VM31 de la primera mezcla con respecto al volumen del segundo tanque K32 se encuentra en el rango de entre el 0,1 % al 50 %. La primera mezcla S31 entera pasa por completo a través del mezclador 1 de alta cizalla, en la que el mezclador 1 de alta cizalla tiene una geometría de cizallamiento de manera tal que la mezcla S31 entera pasa por completo a través de la geometría de cizallamiento del mezclador 1 de alta cizalla. Esto significa que el mezclador de cizalla tiene un flujo a través de la geometría. Después de una fermentación adicional de cepas fúngicas en la primera mezcla y el segundo medio M32 acuoso, la segunda mezcla S32 resultante se transferirá a un tercer tanque K33. La segunda mezcla S32 con este objetivo pasa a través de un mezclador 1 de alta cizalla adicional de manera tal que, de nuevo, los aglomerados formados se cortarán de nuevo antes de ingresar al tercer tanque K33. En el tercer tanque, la segunda mezcla S32 se agregará a un tercer medio M33 acuoso, de manera tal que una fermentación adicional puede tener lugar en el volumen VK33 del tercer tanque K33.

La Fig. 3 ilustra un procedimiento de fermentación en cuatro etapas con tres procedimientos de cizallamiento intercalados de acuerdo con una realización de ejemplo. Las cepas fúngicas en un primer medio M41 acuoso en un volumen VK41 en un primer tanque K41 se fermentan, dando como resultado una primera mezcla S41. Durante el procedimiento de fermentación, las cepas fúngicas forman aglomerados, que posiblemente no permiten una fermentación adicional eficiente, de manera tal que los aglomerados deberían cortarse antes de iniciar una fermentación adicional en el segundo tanque K42 que tiene un segundo volumen VK42 de tanque. De este modo, la primera mezcla S41 se transfiere al segundo tanque K42 y durante la transferencia pasa por el mezclador 1 de alta cizalla entre el primer tanque K41 y el segundo tanque K42. La primera mezcla S41 que incluye los aglomerados cortados se agregará a un segundo medio M42 acuoso, de manera tal que una fermentación adicional puede tener lugar, dando como resultado una segunda mezcla S42. La segunda mezcla S42 se transferirá entonces a un tercer tanque K43 que tiene un tercer volumen VK43 de tanque. La segunda mezcla S42 pasa por un mezclador 1 de alta cizalla, de manera tal que los aglomerados que se forman durante la segunda fermentación se cortarán. La segunda mezcla en el tercer tanque K43 se agregará a un tercer medio M43 acuoso. De este modo, un tercer procedimiento de fermentación puede tener lugar en el volumen VK43 de tanque, dando como resultado una tercera mezcla S43. Además, la tercera mezcla S43 puede incluir aglomerados que pueden reducir la eficiencia de una fermentación adicional. Por lo tanto, la tercera mezcla S43 pasa también por un mezclador 1 de alta cizalla antes de ingresar a un cuarto tanque K44 que tiene un cuarto volumen VK44 de tanque. En el cuarto volumen VK44 de tanque, la tercera mezcla S43 se agregará a un cuarto medio M44 acuoso. Una fermentación adicional puede tener lugar en el cuarto volumen VK44 de tanque.

Deberá tenerse en cuenta que, a pesar de que no se describe de manera explícita, se puede proporcionar además un procedimiento de fermentación que tiene más de cuatro etapas según se describe anteriormente con respecto a la Fig. 3. Debería tenerse en cuenta que los mezcladores 1 de alta cizalla entre los dos tanques respectivos pueden tener diferentes especificaciones de acuerdo con la estructura esperada de los aglomerados en el tanque respectivo después de la fermentación.

Además, debería tenerse en cuenta que en todas de las tres realizaciones según se describen anteriormente en las Figs. 1, 2 y 3, la proporción del volumen VM1, VM31, VM41 de la primera mezcla, con respecto al segundo tanque VK2, VK32, VK42 puede encontrarse en el rango de entre el 0,1 % y el 50 %. Además, debería tenerse en cuenta que para todas de las tres realizaciones que se describen anteriormente con respecto a las Fig. 1, 2 y 3, la proporción del volumen VM1, VM31, VM41 de la primera mezcla, con respecto al volumen del segundo tanque VK2, VK32, VK42 puede encontrarse en el rango de entre el 1 % y el 20 %.

Además, debería tenerse en cuenta que para las realizaciones que se describen con respecto a la Fig. 2 y 3, a saber, el procedimiento de fermentación en tres etapas y el procedimiento de fermentación en cuatro etapas, la proporción de la segunda mezcla S32, S42, con respecto al volumen VK33, VK43 del tercer tanque puede encontrarse en un rango de entre el 1 % y el 50 %, y, en especial, entre el 1 % y el 20 %.

De manera adicional, la proporción de la tercera mezcla S43 con respecto al volumen VK44 del cuarto tanque en la realización que se describe con respecto a la Fig. 3 puede encontrarse en el rango de entre el 0,1 % al 50 %, y en especial, entre el 1 % y el 20 %.

La Fig. 4 ilustra una vista en sección transversal de una geometría mezcla de alta cizalla de acuerdo con una realización. Un mezclador de alta cizalla de acuerdo con la realización que se ilustra en la Fig. 4 comprende un rotor 10 y un estator 20. El rotor tiene una primera corona 11 dentada que tiene una pluralidad de dientes 13. El rotor 10 tiene, además, una segunda corona 12 dentada que comprende, además, una pluralidad de dientes 13. El estator 20 tiene también una primera corona 21 dentada que tiene una pluralidad de dientes 23. Además, el estator tiene una segunda corona 22 dentada que tiene además una pluralidad de dientes 23. Los dientes de cada una de las coronas 11, 12, 21, 22 dentadas se disponen a lo largo de un circuito que resulta concéntrico con respecto al eje giratorio del mezclador 1 de alta cizalla. Las coronas 11, 12 dentadas del rotor y las coronas 21, 22 dentadas del estator se intercalan de manera tal que forman un espacio 2 entre los dientes como tales, y el cuerpo del rotor y el estator, respectivamente. La mezcla para cortarse se alimentará a través de, por ejemplo, un agujero pasante del rotor 10 y fluye a lo largo de flechas dobles en la Fig. 4, de manera tal que la mezcla S1 se cortará entre los dientes de coronas adyacentes. Debería tenerse en cuenta que la alimentación de la mezcla S1 puede llevarse a cabo a través

de un agujero pasante del estator, a pesar de que esta especificación no se ilustra de manera explícita en la Fig. 4. Además, debería tenerse en cuenta que el número de coronas dentadas de tanto el rotor como el estator puede ser mayor que dos.

5 La Fig. 5a ilustra una vista superior de uno de un rotor y un estator de un mezclador de alta cizalla de acuerdo con una realización. En especial, la Fig. 5a ilustra un rotor 10 que tiene una primera corona 11 dentada que incluye una pluralidad de dientes 13. Además, una segunda corona 12 dentada se proporciona en el rotor. Debería tenerse en cuenta que la configuración que se ilustra en la Fig. 5a puede ser, además, una configuración para un estator. Los  
10 dientes 13 de las coronas 11, 12 dentadas primera y segunda pueden ser diferentes así como también el ancho de los dientes y el ancho del espacio entre ellos en una dirección circunferencial.

La Fig. 5b ilustra una vista superior del otro de un rotor y un estator de un mezclador de alta cizalla de acuerdo con una realización en vista de la Fig. 5a, y en especial, un estator 20. El estator 20 tiene, al menos, una corona 21 que tiene una pluralidad de dientes 23. Según se puede observar mediante las líneas de puntos entre la Fig. 5a y Fig. 5b, las coronas dentadas del rotor 10 y el estator 20 se intercalan cuando se acoplan según se ilustra en la Fig. 4.

15 La Fig. 6 ilustra un corte detallado de una vista en sección transversal de una geometría de mezclador de alta cizalla de acuerdo con una realización de ejemplo. La Fig. 6 ilustra el rotor 10 y el estator 20 con dientes respectivos de una corona dentada. Debería tenerse en cuenta que el rotor 10 y/o el estator 20 pueden tener una corona dentada adicional con una geometría similar. Los dientes 13 y 23 de las coronas 11 y 21 dentadas del rotor 10 y del estator  
20 20, respectivamente tienen bordes redondeados. Los bordes tienen un radio R de manera tal que proporcionan una transición suave entre los dientes y el cuerpo del estator o los dientes y el cuerpo del rotor, así como también entre los dientes y el espacio 2. Los bordes 14, 24 redondeados dan como resultado un impacto reducido en cuanto a los aglomerados de la mezcla, de manera tal que los aglomerados no se cortan o destruyen mediante bordes filosos de los dientes 13, 23, lo que dará como resultado un procedimiento de fermentación deteriorado. Debería tenerse en cuenta que los bordes redondeados pueden proporcionarse, en especial, en bordes entre los dientes de coronas  
25 adyacentes. Además, los bordes redondeados pueden proporcionarse, además, entre dientes adyacentes de una sola corona. El radio R de los dientes de coronas adyacentes puede adaptarse uno con respecto al otro de manera tal que tiene un ancho del espacio 2 más o menos continuo.

### Ejemplos

La cepa de *Schizophyllum commune* usada se expone en el documento EP 0 504 673.

30 Medios nutritivos adecuados para los precultivos y cultivos principales y condiciones de cultivo pueden encontrarse en, por ejemplo, la patente EP 504 6073, EP 0 271 907 y "Process and molecular data of branched 1,3-β-D-glucans in comparison with Xanthan, U. Rau, R. -J. Müller, K. Cordes, J. Klein, Bioprocess Engineering, 1990, Volumen 5, Número 2, pp 89-93" y "Udo Rau, "Biosynthese, Produktion und Eigenschaften von extrazellulären Pilz-Glucanen [Biosynthesis, production and properties of extracellular fungal glucans]", Tesis postdoctoral, Universidad Técnica de  
35 Braunschweig, 1997".

Los medios nutritivos que se usan: 30 g/l de glucosa, 3 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O.

#### 1. Precultivo

40 El mantenimiento de cepas y cultivo de la biomasa se describen en, por ejemplo, "Oxygen controlled batch cultivations of *Schizophyllum commune* for enhanced production of branched β-1,3-glucans, U. Rau, C. Brandt Bioprocess Engineering, Septiembre de 1994, Volumen 11, Número 4, pp 161-165". La proporción de los volúmenes al momento de la transferencia fue alrededor del 5 %.

45 Todos los tanques del precultivo se operaron a una velocidad constante y tasa de gasificación de manera tal que el pO<sub>2</sub> estuvo siempre por encima del 60 %. La duración de los precultivos se eligió de manera tal que la glucosa no cayó por debajo de 5 g/l.

#### 2. Cultivo principal

50 El cultivo principal se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento que se describe en la literatura bajo condiciones que limitan el oxígeno. El procedimiento para el cultivo principal se describe en, por ejemplo, "Oxygen controlled batch cultivations of *Schizophyllum commune* for enhanced production of branched β-1,3-glucans, U. Rau, C. Brandt Bioprocess Engineering, Septiembre de 1994, Volumen 11, Número 4, pp 161-165", "Udo Rau, "Biosynthese, Produktion und Eigenschaften von extrazellulären Pilz-Glucanen [Biosynthesis, production and properties of extracellular fungal glucans]", Tesis postdoctoral, Universidad Técnica de Braunschweig, 1997" y "Process and molecular data of branched 1,3-β-D-glucans in comparison with Xanthan, U. Rau, R. -J. Müller, K. Cordes, J. Klein, Bioprocess Engineering, 1990, Volumen 5, Número 2, pp 89-93",

55 3. Transferencia del precultivo al cultivo principal con mezclador de rotor/estator

5 El aumento de productividad volumétrica en el cultivo principal a través del uso de una bomba de rueda dentada en la derivación, según se describe en DE 4012238 A1, no podría recrearse. El efecto contrario se observó en experimentos en los que la recirculación mediante una derivación, según se describe en DE 4012238 A1, reduce de manera significativa la productividad volumétrica en el cultivo principal.

De manera sorprendente, se demostró que usando un mezclador de rotor/estator que se opera de manera continua cuando se transfiere el precultivo al cultivo principal conduce a un aumento significativo del STY. En este ejemplo, se usó un mezclador de rotor/estator de Cavitron, un instrumento de mesa CD 1000 equipado con un sistema de cámara, que se operó a 5-20 l/min, velocidad periférica: 3-50 m/s.

10 El mezclador de rotor/estator se incorporó en la tubería del último tanque del precultivo al tanque del cultivo principal en el reactor en cascada y se esterilizó con vapor antes de insertarse con el fin de permitir la operación aséptica.

#### 4. Determinación del rendimiento espacio-tiempo

15 El rendimiento espacio-tiempo (STY), también denominado productividad volumétrica, se determinó mediante la medición de la concentración de glucano en una muestra que se tomó después de un tiempo de ejecución de 72 h usando un procedimiento que se describe en la literatura. La concentración que se midió dividida por el tiempo de ejecución hasta que se tomó la muestra (72 h) brinda el rendimiento espacio-tiempo. A efectos de simplificación, se muestra el STY relativo. El STY que se logra sin usar un mezclador de alta cizalla se configuró como 100 %.

#### 5. Determinación de la tasa de filtración (valor FR)

Principio de medición:

20 En la determinación de la tasa de filtración (valor FR), la cantidad de filtrado que corre a través de un filtro definido se determina como una función del tiempo. El valor FR se determina de acuerdo con la siguiente fórmula (I)

$$FR = (t_{190g} - t_{170g}) / (t_{70g} - t_{50g}) \quad (I),$$

en la que las variables y la ecuación tienen el siguiente significado:

$t_{190g}$  = tiempo en el que se obtienen 190 g de filtrado,

25  $t_{170g}$  = tiempo en el que se obtienen 170 g de filtrado,

$t_{70g}$  = tiempo en el que se obtienen 70 g de filtrado,

$t_{50g}$  = tiempo en el que se obtienen 50 g de filtrado.

30 De este modo, en cada caso se determina el intervalo de tiempo que se requiere en cada uno de los casos para que 20 g de filtrado fluyan a través, a saber, en un período temprano y en un período tarde con respecto al procedimiento de filtración, y el cociente se calcula a partir de dos intervalos de tiempo. Cuanto mayor es el valor FR, más se reduce la velocidad de filtración con la duración aumentada del procedimiento de filtración. Esto indica un bloqueo del filtro en aumento, mediante, por ejemplo, geles o partículas.

El valor FR se determina mediante el siguiente procedimiento:

##### 5.1 Equipo

35 (a) Aparato de filtración por presión Sartorius 16249; diámetro de filtro 47 mm; con cilindro de digestión de 200 ml ( $\phi$  = 41 mm)

(b) Membrana Isopore 1,2  $\mu$ m;  $\phi$  47 mm; No. RTTP04700 disponible de Merck Millipore

(c) Balanza

##### 5.2 Preparación de la solución de glucano

40 En primer lugar, se preparan 50 g de una mezcla de la solución de glucano que se obtiene a partir de los experimentos y agua, a saber, en una proporción de manera tal que la concentración de glucano es 1,75 g/l. La mezcla se agita durante 10 min y se verifica visualmente en cuanto a homogeneidad. Si la mezcla continúa siendo no homogénea, se realiza agitación adicional hasta que la mezcla sea homogénea. La mezcla se lleva luego a una cantidad total de 250 g con 200 g de agua ultrapura. Después, la agitación se realiza durante, al menos, 1 h para  
45 homogeneización, después de lo cual se ajusta el pH a 6,0 con NaOH 0,1 M y luego se realiza agitación de nuevo durante 15 min. El pH de 6,0 se verifica de nuevo. La concentración final del glucano en la mezcla es 0,35 g/l.

##### 5.3 Realización de la prueba de filtración

La prueba de filtración se realiza a temperatura ambiente ( $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a una presión de 1,0 bares (aire comprimido o  $\text{N}_2$ ).

- colocar rejilla de soporte grueso en la bandeja de criba
- 5 - colocar rejilla de soporte fino en la bandeja de criba
- colocar filtro de membrana en la parte superior
- insertar sello (O-anillo)
- atornillar bandeja de criba y llave de salida al cilindro
- cerrar llave de salida
- 10 - introducir 220 g (alrededor de 220 ml) de solución
- atornillar cubierta superior al cilindro
- sujetar tubo de entrada de aire
- verificar la presión y ajustar a 1,0 bares
- colocar vaso en la balanza bajo el aparato de filtración. Pulsar tara.
- 15 - abrir la llave de salida
- la prueba se detiene cuando no emerge más filtración

Mediante la balanza, la cantidad de filtrado se determina como una función del tiempo. La masa que se indica en cada caso puede leerse visualmente pero, por supuesto, también de forma automática y evaluarse.

- 20 La Fig. 7 ilustra un gráfico de ejemplo de rendimiento espacio-tiempo relativo en el tiempo para un fermentador de laboratorio con/sin control morfológico. Según se puede observar a partir de la Fig. 7, un fermentador de laboratorio con control morfológico tiene un rendimiento espacio-tiempo relativo más alto en comparación con un fermentador de laboratorio sin control morfológico. De este modo, la eficiencia del fermentador de laboratorio con control morfológico es mayor en comparación con un fermentador de laboratorio sin un control morfológico. En especial, la Fig. 7 muestra la comparación del STY relativo para la producción a una escala de laboratorio (21 l) con un precultivo en tres etapas. Se puede observar que el STY aumenta de manera significativa en el caso de control morfológico para impedir la formación de gránulo o aglomerado.
- 25

- 30 La Fig. 8 ilustra un gráfico de ejemplo de rendimiento espacio-tiempo relativo en el tiempo para un fermentador de planta piloto con/sin control morfológico. Según se puede observar a partir de la Fig. 8, el rendimiento espacio-tiempo relativo de un fermentador de planta piloto con control morfológico es un poco más alto en comparación con un rendimiento espacio-tiempo relativo de un fermentador de planta piloto sin control morfológico. En especial, la Fig. 8 muestra la comparación del STY relativo para la producción a una escala de planta piloto ( $3\text{ m}^3$ ) con un precultivo en tres etapas. Se puede observar que el STY aumenta de manera significativa en el caso de control morfológico para impedir la formación de gránulo/aglomerado.

**Lista de referencias:**

- 35 1 mezclador de alta cizalla
- 2 espacio
- 10 rotor
- 11 corona dentada de rotor
- 12 corona dentada de rotor
- 40 13 diente/dientes de corona dentada de rotor
- 14 borde de diente
- 20 estator
- 21 corona dentada de estator
- 22 corona dentada de estator

- 23 diente/dientes de corona dentada de estator
- 24 borde de diente
- K1 primer tanque
- 5 K2 segundo tanque
- K31 primer tanque
- K32 segundo tanque
- K33 tercer tanque
- K41 primer tanque
- 10 K42 segundo tanque
- K43 tercer tanque
- K44 cuarto tanque
- M1 primer medio acuoso
- M2 segundo medio acuoso
- 15 M31 primer medio acuoso
- M32 segundo medio acuoso
- M33 tercer medio acuoso
- M41 primer medio acuoso
- M42 segundo medio acuoso
- 20 M43 tercer medio acuoso
- M44 cuarto medio acuoso
- S1 primera sustancia
- S2 segunda sustancia
- S31 primera mezcla
- 25 S32 segunda mezcla
- S41 primera mezcla
- S42 segunda mezcla
- S43 tercera mezcla
- VK1 volumen de primer tanque
- 30 VK2 volumen de segundo tanque
- VK31 volumen de primer tanque
- VK32 volumen de segundo tanque
- VK33 volumen de tercer tanque
- VK41 volumen de primer tanque
- 35 VK42 volumen de segundo tanque
- VK43 volumen de tercer tanque
- VK44 volumen de cuarto tanque
- VM1 volumen de primer medio acuoso

VM2 volumen de segundo medio acuoso

VM31 volumen de primer medio acuoso

VM32 volumen de segundo medio acuoso

5 VM33 volumen de tercer medio acuoso

VM41 volumen de primer medio acuoso

VM42 volumen de segundo medio acuoso

VM43 volumen de tercer medio acuoso

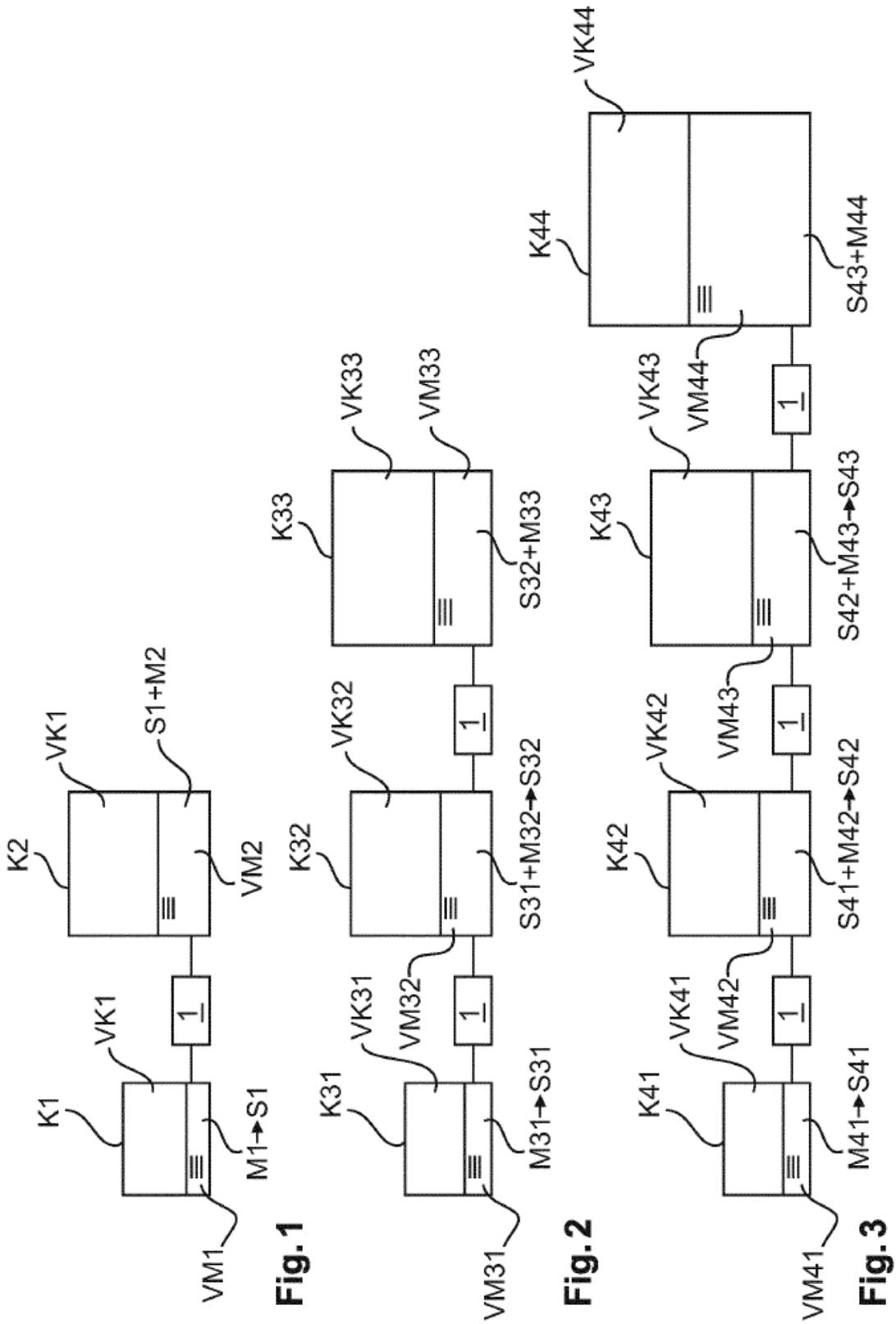
VM44 volumen de cuarto medio acuoso

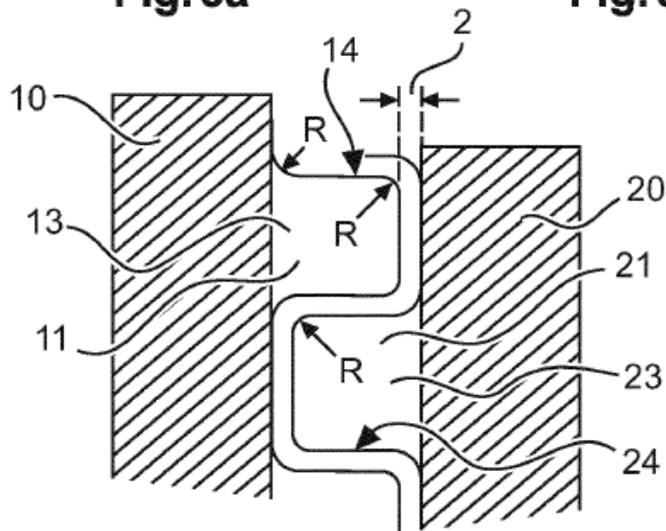
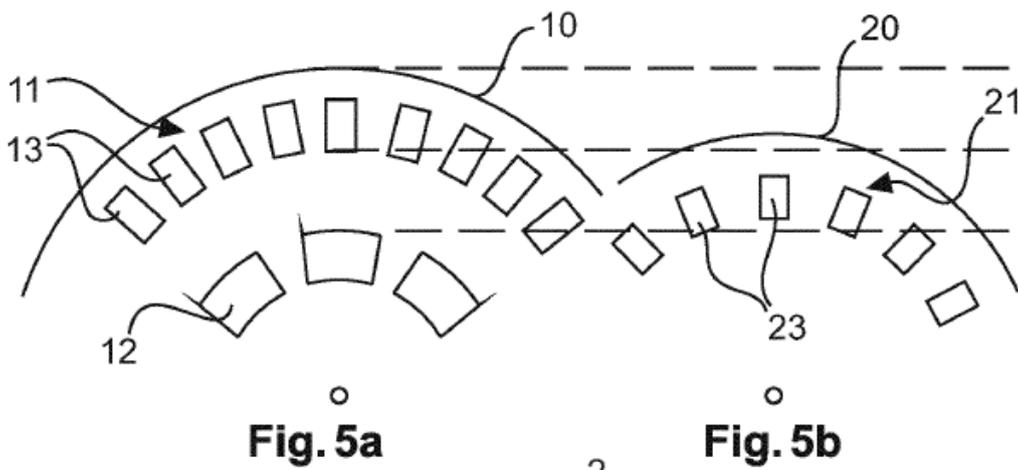
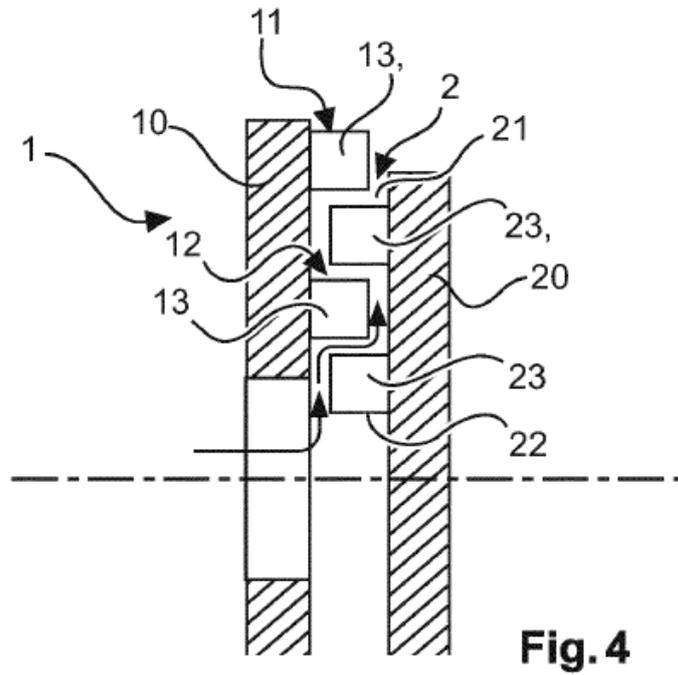
10

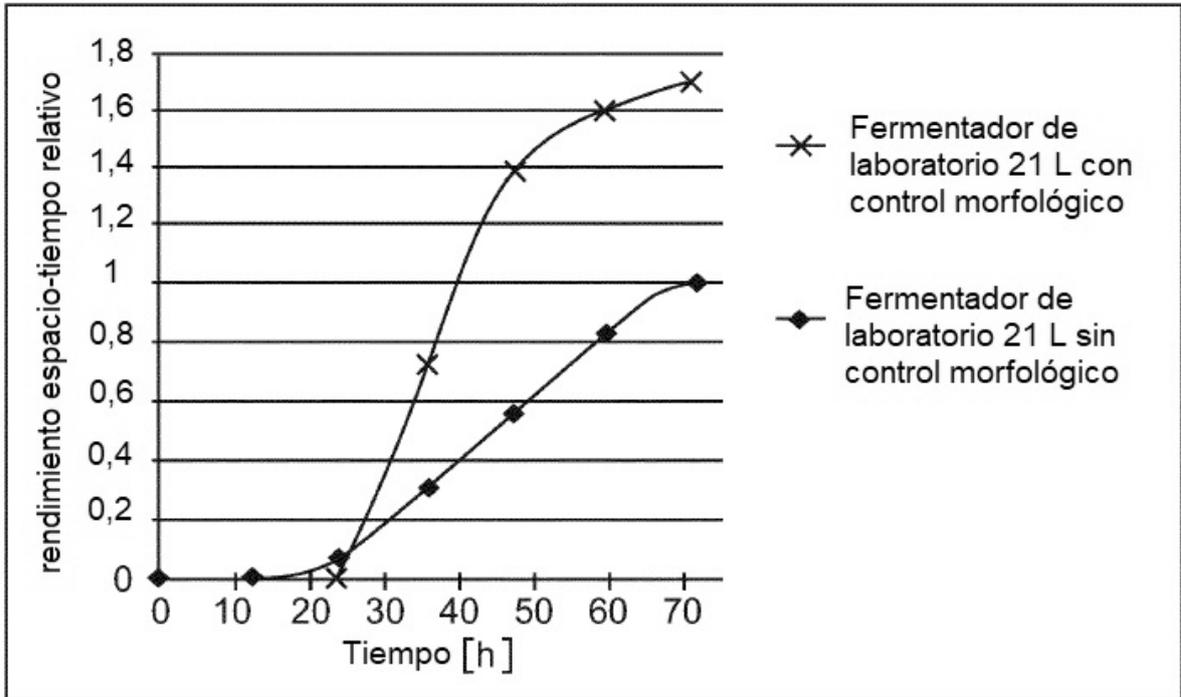
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de fermentación de cepas fúngicas que secretan glucanos con una cadena principal unida  $\beta$ -1,3-glicosídicamente y grupos laterales unidos  $\beta$ -1,6-glicosídicamente a esta, en una cascada de tanques que comprende, al menos, un primer tanque (K1, K31) con un primer volumen (VK1, VK31) y un segundo tanque (K2, K32) con un segundo volumen (VK2, VK32), que comprende, al menos, las etapas de
- 5 a) fermentación de cepas fúngicas en un primer medio (M1, M31) acuoso en el primer tanque (K1, K31) y el volumen (VM1, VM31) del primer medio acuoso, dando como resultado una primera mezcla (S1, S31),
- b) transferencia de la primera mezcla (S1, S31) al segundo tanque (K2, K32), y
- 10 c) fermentación de las cepas fúngicas en la primera mezcla (S1, S31) en un segundo medio (M2, M32) acuoso en el segundo tanque (K2, K32) y el volumen (VM2, VM32) del segundo medio acuoso, dando como resultado una segunda mezcla (S2, S32),
- en el que la proporción del volumen (VM1, VM31) de la primera mezcla con respecto al volumen (VK2, VK32) del segundo tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 0,1\%$  al  $\leq 50\%$  y en el que la primera mezcla (S1, S31) en la etapa b) se pasa a través de, al menos, un mezclador de alta cizalla, el mezclador (1) de alta cizalla tiene una geometría de cizallamiento, de manera tal que la primera mezcla (S1, S31) entera pasa por completo a través de la geometría de cizallamiento del, al menos, un mezclador de alta cizalla.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el mezclador (1) de alta cizalla es un mezclador de rotor/estator que tiene un rotor (10) y un estator (20).
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el mezclador de rotor/estator es una máquina dispersora de corona dentada.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, en el que, al menos, uno del rotor (10) y el estator del mezclador de rotor/estator tiene, al menos, dos coronas (11, 12) dentadas concéntricas y el otro del rotor y el estator (20) tiene, al menos, una corona (21, 22) dentada, en el que la, al menos, una corona dentada del otro del rotor y el estator se intercala concéntricamente con las, al menos, dos coronas dentadas concéntricas en el que el primer medio (M1, M31) acuoso pasa a través de las coronas dentadas intercaladas.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que, al menos, dos coronas (11, 12) dentadas concéntricas de uno del rotor (10) y el estator y la, al menos, una corona (21, 22) dentada del otro del rotor y el estator (20) tienen una geometría de diente equidistante, en el que la distancia entre los dientes (13) adyacentes de la respectiva corona (11) dentada externa es mayor que la distancia entre los dientes (23) adyacentes de la respectiva corona (21) dentada interna, en el que el primer medio M1 acuoso pasa a través de las coronas dentadas intercaladas en una dirección de distancia de dientes en ascenso.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, en el que la primera mezcla (S1) pasa a través de un espacio (2) en dirección radial, cuyo espacio en una dirección radial se forma mediante el intercalado de manera concéntrica de, al menos, dos coronas (11, 12) dentadas concéntricas de uno del rotor (10) y el estator y de, al menos, una corona (21, 22) dentada del otro del rotor y el estator (20), en el que el espacio (2) entre el diámetro externo de una corona dentada y un diámetro interno de una corona dentada adyacente exteriormente radial tiene un ancho de entre 0,2 mm y 2,0 mm, preferiblemente, de 0,4 mm y 1,2 mm, más preferiblemente, de entre 0,8 mm y 0,9 mm.
- 35 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la primera mezcla (S1) permanece por entre 0,01 s y 0,004 s, preferiblemente entre 0,02 y 0,07 s, más preferiblemente, 0,01 s +/- 0,001 s mientras pasa, al menos, dos coronas (11, 12) dentadas concéntricas de uno del rotor (10) y el estator y la, al menos, una corona (21, 22) dentada del otro del rotor y el estator (20).
- 40 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que los bordes (14, 24) de los dientes (13, 23) a lo largo de una trayectoria de flujo a través de la geometría de cizallamiento tienen bordes redondeados con un radio de, al menos, 0,2 mm, en especial, más de 3 mm.
- 45 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el rotor (10) gira a una velocidad con respecto al estator de entre 250 y 7200, preferiblemente de entre 1800 y 6000, más preferiblemente de entre 4000 y 4500 revoluciones por minuto.
- 50 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que el rotor (10) gira a una velocidad periférica de entre 2 m/s y 60 m/s, preferiblemente, de entre 15 m/s y 50 m/s, más preferiblemente, de entre 35 m/s y 45 m/s.
- 55 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la proporción del volumen (VM1, VM31) de la primera mezcla con respecto al volumen (VK2, VK32) del segundo tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 1\%$  al  $\leq 20\%$ .

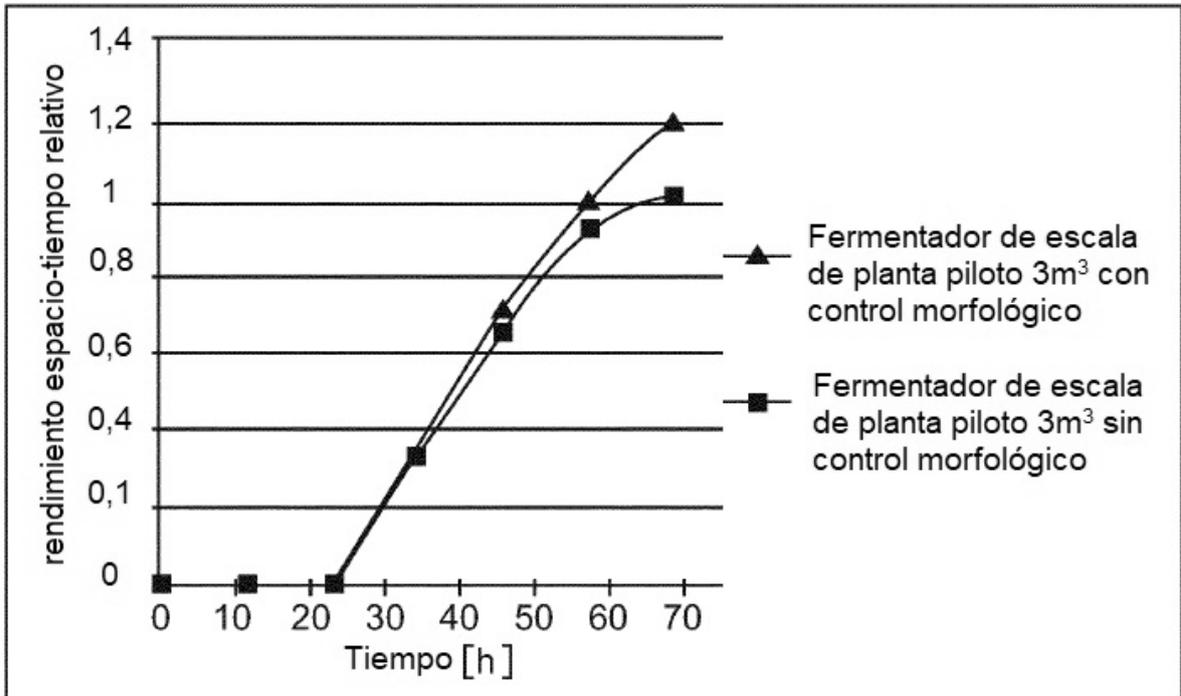
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que, al menos, un beta-glucano se selecciona a partir del grupo que consiste de *Schizophyllan* y *Scleroglucan*, en el que *Schizophyllan* o *Scleroglucan* se obtienen mediante fermentación de cepas fúngicas.
- 5 13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las cepas fúngicas son *Schizophyllum commune* o *Sclerotium rolfsii*.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la cascada de tanques comprende un tercer tanque (K33) con un tercer volumen (VK33), y el procedimiento para fermentación comprende, además, al menos, las etapas de
- 10 d) transferencia de la segunda mezcla (S32) al tercer tanque (K33), y
- e) fermentación de las cepas fúngicas en la segunda mezcla (S32) en un tercer medio (M33) acuoso en el tercer tanque (K33),
- en el que la proporción de la segunda mezcla con respecto al volumen (VK33) del tercer tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 0,1$  % al  $\leq 50$  %.
- 15 15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la segunda mezcla (S32) en la etapa d) se pasa a través de, al menos, un mezclador de alta cizalla, el mezclador (1) de alta cizalla tiene una geometría de cizallamiento, de manera tal que la segunda mezcla (S32) entera pasa por completo a través de la geometría de cizallamiento del, al menos, un mezclador de alta cizalla.
- 20 16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15, en el que la proporción de la segunda mezcla (S32) con respecto al volumen (VK33) del tercer tanque se encuentra en el rango de entre el  $\geq 1$  % al  $\leq 20$  %.







**Fig. 7**



**Fig. 8**