

P.- 45.729

MPB/FV/tj.



27 AGO

Memoria descriptiva

383074

SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I.P.C.	
CLASE C 12	C 07
SUBCLASE D	G

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de SOCIÉTÉ D'ASSISTANCE TECHNIQUE POUR PRODUITS
NESTLÉ, S.A.

entidad / ~~nacionalidad~~ suiza

con domicilio en Lausanne, Suiza,

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE PROTEINAS A PARTIR DE UNA BIOMASA PROCEDENTE DE UN CALDO DE CELULAS BACTERIANAS"

(Clase Internacional C12k)

**POOR
QUALITY**

383074

27



El presente invento se refiere a la separación de proteínas a partir de células bacterianas.

La producción de células bacterianas, especialmente en vista de la preparación de alimentos, se encuentra frente a dificultades importantes cuando se trata de extraer las proteínas de la pared celular. - Los procedimientos físicos de ruptura de las células - no pueden ser aplicados en escala industrial. Los métodos llamados "enzimáticos" generalmente no son interesantes desde el punto de vista económico y conducen frecuentemente a la producción, con rendimientos poco satisfactorios, de proteínas degradadas, con bajo peso molecular. También fueron propuestos procedimientos de extracción químicos, pero éstos exigen tratamientos complejos y una fuerte concentración de los agentes de extracción. El resultado obtenido consiste en productos degradados con un valor nutritivo relativamente bajo.

Otro factor importante en la producción de proteínas de origen bacteriana es la selección de microorganismos apropiados. Independientemente de las consideraciones relativas a la utilización de substratos específicos, a las relaciones de crecimiento máximo y a la realización de cultivos en continuo, el hecho de que el interés se haya concentrado principalmente sobre las levaduras se explica por la existencia de una industria que proporciona ya en grandes cantidades proteínas extraídas del cultivo de las levaduras para el enriquecimiento de los forrajes. Parece que para la producción de proteínas destinadas a la alimentación -

383074

27 AGO. 1970



humana, se hayan preferido las bacterias Gram-positivas en vista de que no contienen endotoxinas. Además, la separación de proteínas que responden a las exigencias de la alimentación humana plantea también el problema de eliminación de los constituyentes celulares -
5 indeseables, sobre todo la purina base y factores inhibidores de crecimiento.

El presente invento permite remediar a estos inconvenientes y se refiere a un procedimiento sencillo y económico para la separación de proteínas a partir de una biomasa procedente de un caldo de células -
10 bacterianas.

Este procedimiento es notable sobre todo por el hecho de que se somete la biomasa a un choque alcalino de corta duración, a una concentración de álcali comprendida entre 0,1 N y 2 N para liberar el citoplasma de la pared celular, que se añade entonces un ácido con el fin de obtener una concentración de ácido -
15 libre comprendida entre 0,1 N y 2 N, que se mantienen las condiciones ácidas durante un período suficiente -
20 para obtener la degradación y la solubilización de las materias celulares indeseables y que se separan entonces las proteínas liberadas.

La materia prima utilizada para la ejecución del procedimiento definido más arriba es un caldo de -
25 fermentación de microorganismos aerobios cultivados en un medio nutritivo comprendiendo fuentes de carbono y de nitrógeno, así como los complementos habituales -
tales como sales minerales, vitaminas, agentes de crecimiento, etc.... La fuente de carbono puede ser un hi-
30

383074

27 AGO. 1970



mdrocarburo parafínico (lineal o cíclico,) un hidro--
carburo oxigenado tal como el etanol, o un hidrato de
carbono.

5 El caldo de fermentación, que comprende la
biomasa, posee un tenor en materia celular seca situa-
do entre 1 y 2% aproximadamente (en peso) cuando es
extraído del fermentador. Sin embargo, bajo ciertas -
condiciones, puede alcanzar un 4%. De preferencia, el
caldo es primeramente concentrado, por ejemplo por -
10 evaporación o centrifugación, hasta obtener un tenor
en materia seca comprendido entre 7 y 15 %.

Según el invento, se somete la biomasa a un
choque alcalino añadiéndole al caldo una cantidad de
álcali suficiente para llevar la concentración a un va-
15 lor comprendido entre 0,1 N y 2 N. Una concentración
de álcali situada fuera de estos límites ha de ser ge-
neralmente evitada pues no ofrece ventajas notables. -
El álcali puede ser el hidróxido de sodio o el hidró-
xido de potasio; es de preferencia añadido al caldo -
20 bajo forma de una solución concentrada. Otras substan-
cias alcalinas, tales como el amoníaco y óxidos o hi-
dróxidos de un metal alcalinotérreo por ejemplo, pue-
den también ser utilizados. El tratamiento de la bio-
masa con álcali ha de ser ejecutado de manera que el
25 contacto se efectúe lo más rápidamente posible. Esta
condición es realizada, por ejemplo, manteniendo el -
caldo bajo fuerte agitación o poniendo en presencia el
caldo y la solución de álcali bajo forma de capas re-
lativamente delgadas. Tal como descrito más arriba, el
30 efecto que se espera de este tratamiento es la libera--

383074

27 AGO



5 ción del citoplasma de la pared celular; mediante una distribución homogénea del álcali, el resultado es obtenido después de un tratamiento de algunos minutos. - Un tratamiento de corta duración, o sea que no pasa - de 10 minutos, permite evitar la degradación de las --
proteínas.

10 El tratamiento con álcali es inmediatamente seguido de una adición de ácido destinada primeramente a suspender la acción del álcali sobre las células y - después a solubilizar diversas materias indeseables - que contienen las células, ante todo la purina base y factores inhibidores de crecimiento. El tratamiento en medio ácido es de preferencia efectuado a temperatura elevada, del orden de 50 a 100°C, y bajo agitación. El
15 ácido puede ser un ácido fuerte, por ejemplo el ácido - sulfúrico, el ácido clorhídrico o el ácido fosfórico. La cantidad de ácido añadido se calcula de manera a obtener una concentración comprendida entre 0,1 N y 2 N; tal como expuesto más arriba para el álcali, no se puede obtener ninguna ventaja substancial si la concentra-
20 ción de ácido alcanza un valor situado fuera de los límites antes mencionados. La duración del tratamiento con ácido ha de ser suficiente para producir la degrada-- ción y la solubilización de las substancias indeseables presentes en la biomasa; depende además de la tempera--
25 tura a la cual se ejecuta el tratamiento.

30 Durante o después del tratamiento en medio - ácido, es conveniente añadir otro ácido con propiedades de reducción y/o de quelato, por ejemplo el ácido tártaico, el ácido acético, el ácido cítrico o el ácido -



ascórbico. Estos ácidos producen un efecto inhibitor -
en cuanto a la oxidación de los pigmentos presentes -
en la biomasa, los cuales de lo contrario tendrían --
tendencia a formar compuestos de color oscuro. Además,
5 las propiedades de quelato de estos ácidos previenen -
la absorción de pigmentos por las proteínas y permiten
evitar que le den al producto un color poco satisfac--
torio.

La separación de las proteínas liberadas --
10 puede ser ejecutada por cualquier método apropiado. -
Como sea que las materias que sobrenadan contienen las
substancias solubilizadas indeseables, es preferible -
emplear, para separar las proteínas, la técnica de pre-
cipitación isoeléctrica y ejecutar la operación a un ϕ
15 pH correspondiente al punto isoeléctrico de las proteí-
nas presentes. Este valor puede variar según el tipo -
de microorganismo considerado, pero está generalmente -
comprendido entre pH 3 y pH 5. El método de precipita-
ción isoeléctrico es bien conocido y no parece necesa--
20 rio describirlo detalladamente. Hay lugar de destacar -
sin embargo que la utilización de esta técnica en la -
puesta en obra del invento permite producir una proteí-
na de calidad superior puesto que es precipitada en un
medio que, antes de ser ajustado al punto isoeléctrico,
25 era ácido más bien que básico. Según una forma de eje-
cución del procedimiento, el ácido orgánico te-niendo -
propiedades de reducción y/o de quelato, puede ser aña-
dido, durante esta fase, en la ejecución del procedi--
miento.

30 Las proteínas precipitadas pueden ser separa-

383074

27 AG



das por centrifugación, fáltración o decantación. Son entonces lavadas por atomización, criodesecación o mediante un secador de rodillos. El producto seco se presenta bajo forma de un polvo blanco de sabor neutro. Es fácilmente asimilable y constituye una fuente de proteínas de excelente calidad para la alimentación del hombre y de los animales.

El procedimiento que acaba de ser descrito es aplicable para todos los microorganismos convenientes, cualquiera sea el substrato sobre el cual ha sido cultivado. Puede ser utilizado para la separación de proteínas procedentes tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas pero es particularmente adaptado para el tratamiento de cepas Gram-positivas. A título de ejemplo de microorganismos que pueden ser utilizados para la ejecución del procedimiento según el invento, se puede citar los que pertenecen a los géneros Micrococcus, Pseudomonas, Alcalígeno y Artrobacter. Cabe señalar, sin embargo, que el invento se refiere esencialmente a la separación de proteínas a partir de células bacterianas más bien que a un método para el tratamiento de cepas bacterianas específicas.

Aunque la materia proteínica recuperada tal como descrito más arriba esté particularmente destinada al enriquecimiento de alimentos, puede también ser hilada bajo forma de fibras mediante técnicas convencionales o estructurada sobre procedimientos conocidos, en vista de fabricar productos alimenticios nuevos. Además, puede constituir una fuente de proteínas para la producción de resinas sintéticas, gomas y materias

383074

27 AGO



análogas.

Los ejemplos siguientes ilustran la puesta en obra del procedimiento según el invento, el cual - sin embargo no está limitado a las condiciones que en ellos se exponen.

5

EJEMPLO I

Se añaden 200 ml. de una solución al 20% de hidróxido de potasio a 5 litros de una suspensión de células de *Micrococcus cerificans* (ATCC 14987) -- mantenida bajo fuerte agitación. Esta suspensión, obtenida por centrifugación del caldo de fermentación inicial, contiene 425 g. de biomasa (materia celular seca) cultivada en un medio conteniendo, como fuente de carbono, parafinas lineales C₁₂ a C₁₈.

10
15

Después de algunos minutos, la suspensión - es acidificada por adición de 500 ml. de ácido clorhídrico al 20%. La concentración de ácido es entonces de 0.3 N. Se añaden igualmente 12 g. de ácido cítrico y después la suspensión es agitada durante 3 horas y mantenida a 60°C.

20

Mediante adición de una solución al 20 % de hidróxido de potasio se lleva la suspensión a pH 3.5 en vista de precipitar las proteínas, y después éstas son separadas, mediante centrifugación, de las materias que sobrenadan. La masa proteínica es entonces - lavada por suspensión en 5 litros de agua; el pH es - llevado a 7.5 y después las proteínas son precipitadas nuevamente a pH 3.5. Finalmente son separadas por cen-

25

30

383074

27A



trifugación, y secadas por criodesecación.

5 Se obtienen 250 g. de producto seco, conteniendo 12.8 % de nitrógeno proteínico, bajo forma de un polvo blanco con un sabor neutro. Este producto - es fácilmente asimilable y puede ser incorporado a - diversas composiciones alimenticias ricas en proteínas.

EJEMPLO II

10

200 ml. de una solución al 20 % de hidróxido de sodio son añadidos rápidamente, bajo fuerte -- agitación, a una suspensión de células de *Alcaligeno* sp (ATCC 15525). Esta suspensión contiene 350 g. de - biomasa (materia celular seca) cultivada en un medio conteniendo etanol como fuente de carbono; es obtenida por evaporación del caldo de fermentación inicial y calentada a 50°C al ser añadido el álcali.

15

Dicha suspensión es agitada durante 1 minuto y después es acidificada, mezclándola con 300 ml. de - ácido ortófosfórico al 40 %, para obtener una concentración de ácido de 0.4 N. Se añaden igualmente 25 g. de ácido tártaico. La suspensión es mantenida a 90°C durante 1 hora y enfriada, después de lo cual las proteínas son precipitadas, ajustando el pH a 4.5 por la adición de una solución de hidróxido de sodio. Después de la separación de las proteínas por centrifugación, éstas son lavadas por suspensión en 5 litros de agua, centrifugadas nuevamente y secadas por criodesecación.

25

30

Se obtienen 210 g. de producto seco, conte---



niendo 12.1 % de nitrógeno proteínico, bajo forma de -
un polvo blanco con un sabor neutro. Este producto, -
que es fácilmente asimilable, puede ser incorporado -
a diversas composiciones alimenticias ricas en proteí-
nas.

5

EJEMPLO III

El procedimiento descrito en el Ejemplo II -
es repetido pero sin la adición de ácido tártrico. El
producto seco recogido es idéntico a aquél obtenido -
en el ejemplo precedente, salvo que es ligeramente co-
lorado.

10

EJEMPLO IV

15

El procedimiento descrito en el Ejemplo I -
es repetido, salvo que el ácido cítrico es substituído
por 15 g. de ácido ascórbico. El producto seco es idéntico
al producto obtenido en el Ejemplo I.

20

La presente solicitud que corresponde a la -
presentada en Gran Bretaña con fecha 28 de Agosto de
1.969, bajo el número 42.795/69, se acoge a los benefi-
cios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propie-
dad Industrial.

25

27 AGO



383074

- REIVINDICACIONES -

Los puntos de invención, propia y nueva, -
que se presentan para que sean objeto de esta solici-
tud de Patente de Invención en España por VEINTE años,
son los siguientes:

5 1.- Procedimiento para la separación de pro-
teínas a partir de una biomasa procedente de un caldo
de células bacterianas, caracterizado por el hecho de
que se somete la biomasa a un choque alcalino de corta
duración, a una concentración de álcali comprendida -
10 entre 0,1 y 2 n; para liberar el citoplasma de la pa-
red celular, que se añade entonces un ácido con el --
fin de obtener una concentración de ácido libre com--
prendida entre 0,1 N y 2 N, que se mantienen las con--
15 diciones ácidas durante un tiempo suficiente para obte-
ner la degradación y la solubilización de las materias
celulares indeseables y finalmente, que se separan las
proteínas liberadas.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado por el hecho de que la biomasa contiene

26.8.70



entre 7 y 15 % en peso de materia celular seca.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el álcali es el hidróxido de sodio o el hidróxido de potasio.

, 5 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la duración del tratamiento con álcali no pasa de 10 minutos.

10 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el ácido es el ácido sulfúrico, el ácido clorhídrico o el ácido fosfórico.

15 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el tratamiento con ácido es ejecutado a una temperatura comprendida entre 50 y 100°C.

7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se añade igualmente, después del tratamiento con álcali, un ácido con propiedades de reducción y/o de quelato.

20 8.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 7, caracterizado por el hecho de que el ácido con propiedades de reducción y/o de quelato es el ácido tártrico, el ácido acético, el ácido ascórbico o el ácido cítrico.

25 9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que las proteínas son separadas por precipitación isoeléctrica.

30 10.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que las proteínas recogidas son secadas bajo la forma de polvo.

ly.

383074 -9



11.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la biomasa procede de un cultivo de células bacterianas en un medio nutritivo teniendo, como fuente de carbono, un hidrocarburo oxigenado o un hidrato de carbono.

12.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 11, caracterizado por el hecho de que el hidrocarburo parafínico es una mezcla de parafinas lineares C_{12} a C_{18} .

13.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 11, caracterizado por el hecho de que el hidrocarburo oxigenado es el etanol.

14.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la biomasa está compuesta de células de bacterias Gram-pegativas.

15.- Procedimiento para la separación de proteínas a partir de una biomasa procedente de un caldo de células bacterianas.

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

3.1.73

A handwritten signature or mark at the bottom left of the page.

383074-9 ENE.



Esta Memoria consta de catorce hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, -9 ENE. 1973

P. A.

Alberto de Elzoburu
Per Poder

3.1.73
BPD/.

[Handwritten mark]