

441849

C12D

- 2 DIC. 1976

PATENTE DE INVENCION

ICI CASE B.27354-SPAIN

*Memoria Descriptiva*

*sobre:*

PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DE CELULAS DE  
MICROORGANISMOS.

-----

*Solicitante:* IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, entidad  
inglesa, residente en Imperial Chemical House,  
Millbank, Londres, S.W.1., Inglaterra.

-----

Esta invención se relaciona  
con un método para el tratamiento de células de  
microorganismos producidas en un procedimiento  
para la producción de proteínas de célula única.

la producción de proteína de célula única mediante crecimiento de microorganismos sobre un medio nutriente acuoso que comprende una fuente de carbono asimilable, el producto inicial es una suspensión acuosa que comprende células de microorganismo.

5

Se pueden utilizar varias técnicas para separar las células de microorganismos de la suspensión. Las células, posiblemente después de someterse a cierta etapa de pre-tratamiento, se puede dejar primero que se separen del líquido en tanques de sedimentación. Después de la sedimentación, las células pueden ser concentradas adicionalmente por centrifugación y secadas a continuación para proporcionar, como producto final, células secas de microorganismos.

10

15

Las células de microorganismos producidas de este modo se pueden incorporar en los sustitutos de la leche para la alimentación de animales jóvenes, por ejemplo terneros; es decir en composiciones alimenticias para animales jóvenes, proyectadas para proporcionar una sustitución completa o parcial de la leche de la vaca. Un problema encontrado en la producción de sustitutos de leche consiste en que se deben producir células fácilmente dispersables en agua para proporcionar una suspensión homogénea.

20

25

Según la presente invención se proporciona un método para el tratamiento de células de microorganismos, en donde una suspensión acuosa que comprende las células se trata con una enzima proteolítica o un preparado de enzimas proteolíticas para dar un producto con una dispersabilidad mejorada.

30

Normalmente para utilizarse en sustitución.

**POOR  
QUALITY**

tos de leche, las células serán secadas a continuación. Antes del tratamiento con una enzima proteolítica, la suspensión acuosa de células se puede someter adecuadamente a una etapa de pre-tratamiento. Esto es particularmente conveniente - cuando las células son de levadura.

El método de la invención se puede emplear para tratar células de microorganismo producidas mediante cualquier proceso para la obtención de proteína de célula única. Por ejemplo, las células pueden ser células de levadura o bacteriales que han sido cultivadas en un medio que contiene cualquier fuente de carbono asimilable, por ejemplo un carbohidrato, hidrocarburo o un hidrocarburo oxidado tal como un alcohol. Preferiblemente, las células son células bacteriales, especialmente células bacteriales cultivadas en un medio que contiene un alcohol, por ejemplo metanol, como fuente de carbono.

Ejemplos de células de levadura incluyen las cepas de los géneros Candida, Hansenula, Saccharomyces, Torula y Torulopsis.

Ejemplos de células bacteriales incluyen las cepas de los géneros Pseudomonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Micrococcus, Cellulomonas, Hydrigenomonas, Methylococcus, Methanomonas, Nocardia y Bacillus tales como Pseudomonas fluorescens NCIB 9046, Pseudomonas diminuta NCIB 9393, Alcaligenes faecalis NICE 8156 y Arthrobacter strain NRRL B3728. De una forma adecuada, las células bacteriales son cepas de las especies Pseudomonas methylotropha, Pseudomonas rosea, Hyphomicrobium variabili y Microcycclus polymorphum que se describen en la patente británica número 1 370 892 (correspondiente a la solicitud USA N° de serie

416.098 y Patente francesa nº 7.144.042). Cultivos de ciertas cepas de estas últimas especies han sido depositados en National Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torrey Research Station, Aberdeen, Escocia, Reino Unido, habiéndose efectuado los correspondientes depósitos en las colecciones del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (NRRL) en Peoria, Illinois y en el Fermentation Research Institute (FRI), Japón. Las designaciones numéricas dadas a estos cultivos son las siguientes:

NCIB Nos. 10508 a 17 y 10592 a 10612

NRRL Nos. B5352 a B5382

FRI nos. 1215 a 1245.

Según un procedimiento para la producción de proteína de célula única mediante cultivo de microorganismos en un fermentador, el producto inicial que sale del fermentador en una suspensión acuosa que comprende células de microorganismo. Para separar las células de esta suspensión, la suspensión puede pesarse al interior del tanque de sedimentación para permitir que las células se separen del líquido en cierto grado. Alternativamente, las células se pueden separar mediante técnicas de flotación. Con el fin de mejorar la velocidad de sedimentación, la suspensión se puede someter a una etapa de pre-tratamiento antes de pasar a los tanques de sedimentación. En esta etapa de pre-tratamiento, las células se pueden flocular bien por adición de un agente floculante o bien por el método de la patente británica nº 1.381.306. Según este último método, las células se someten a un choque térmico de duración limitada (que puede o no estar precedido por un tratamiento alcalino) seguido por un tratamiento con un ácido. Después de

la sedimentación, las células se pueden concentrar adicionalmente por centrifugación y secarse luego para dar células de microorganismos.

5 El material que contiene células, resultantes de la etapa de centrifugación, es una crema que comprende aproximadamente 25% en peso de sólidos y que tiene un pH de 3 a 5 (en el caso de que se haya empleado una etapa de pre-tratamiento según el método de la patente británica nº 1.381.306). Si se omite la etapa de centrifugación, la crema comprenderá menos sólidos, aproximadamente 5-20% en peso. En el método de la presente invención este material se trata adecuadamente con un enzima proteolítica, después de cuyo tratamiento se secan las células. Es preferible que antes de tratarse con la enzima proteolítica, se neutralice la crema centrifugada, a un pH de 7 aproximadamente, mediante tratamiento con un alcalí, por ejemplo hidróxido sódico. Esta etapa de neutralización no es esencial. Sin embargo, cuando se utilizan ciertas enzimas proteolíticas, por ejemplo las proteasas neutras o alcalinas producidas por organismos del género Bacillus, es conveniente la inclusión de la etapa de neutralización.

10

15

20

La adición de la enzima proteolítica tiene lugar apropiadamente a una temperatura del orden de 25 a 90°C (preferiblemente 50 a 80°C) y a un pH del orden de 3,5 a 10 (preferiblemente, 6 a 7). Con preferencia, la enzima se mezcla con la crema de la centrifuga durante un periodo de 5 a 12 minutos, especialmente 15 a 30 minutos, antes de secarse las células. El preparado enzimático comercial se añade preferiblemente a la crema de la centrifuga en una concentración de 0,05 a 1% en peso de la proteína de

25

30

célula única presente. Si se utiliza un preparado enzimático de superior potencia que los preparados comerciales normales, la concentración puede ser de 0,005 a 0,05% en peso.

Otro método para expresar la cantidad de enzima utilizada, emplea términos de unidades de actividad. Sin embargo, este último es bastante difícil puesto que las condiciones utilizadas para ensayar la actividad raramente son próximas a las condiciones de utilización de la enzima en la aplicación comercial. En el presente caso esto es verdaderamente cierto ya que ninguno de los métodos internacionalmente aceptados para el ensayo de enzimas proteolíticas se refiere a condiciones en absoluto similares a las utilizadas en este procedimiento. Sin embargo, y para dar una indicación cuantitativa aproximada, se debería considerar que, para las presentes finalidades, la gama de actividad proteolítica es probablemente de  $5 \times 10^{-5}$  a  $5 \times 10^{-2}$  unidades Anson de actividad de enzima proteolítica por gramo de proteína de célula única, o el equivalente expresado en estas unidades de actividad.

Convenientemente, la enzima proteolítica es una enzima derivada de una bacteria que es estable a temperaturas elevadas, es decir por encima de 50°C. Ejemplos de enzimas adecuadas son las enzimas derivadas de la especie de microorganismo Bacillus subtilis, proteasas fungales y proteasas derivadas de fuentes vegetales tales como papaína y ficina. Enzimas particularmente adecuadas incluyen "ALCALASE" (marca registrada), fabricada por Novo Industri A/S de Copenhague, Dinamarca, que es un preparado de enzima proteolítica producida por la fermentación sumergida de una especie del género Bacillus, y "PROTEINASE" T (marca regis-

trada), fabricada por ABM Chemicals Ltd. de Stockport, Inglaterra.

5 El producto seco que se produce por tratamiento de células de microorganismo con una enzima proteolítica, por el método de la invención, y ulterior secado de las mismas, proporciona dispersiones mas estables y homogéneas en agua y que poseen una solubilidad mejorada cuando se incluyen en sustitutos de leche para ganado vacuno, en comparación con los productos que no han sido tratados. Normalmente, la solubilidad del nitrógeno de productos sin tratar es de 20 a 25%, mientras que con los productos tratados con enzimas se pueden conseguir, en algunos casos, solubilidades superiores al 50%.

15 El mecanismo mediante el cual el método de la invención lleva a cabo la dispersabilidad mejorada de las células de microorganismos en agua, es probablemente muy complejo. Sin embargo, y para facilitar el entendimiento de la naturaleza general del método, sin por ello limitar en modo alguno el alcance de la invención, se sugiere la siguiente hipótesis como explicación parcial del efecto.

20 Las partículas de preparados secos y proteínas de célula única tienen con frecuencia una capa exterior continua que se cree consiste principalmente en proteína. La hidrolisis parcial de la proteína antes de secado tiene el efecto de producir más grupos cargados en la proteína, en virtud de la disociación de los enlaces péptidos. Se obtiene una estructura modificada del material seco final, con un mayor grado de solubilidad de la proteína. La solubilidad realzada de la capa exterior conduce a una tendencia incrementada para que se rompan las partículas, mejo-

25

30

rando por consiguiente la dispersabilidad del producto. Por otra parte, el hecho de que se disuelva mas proteína, incrementa la viscosidad del líquido, lo cual favorece también la obtención de dispersiones estables. De este modo, y tras el mezclado con agua, los productos tratados con enzima proporciona dispersiones estables más rápidamente que el producto sin tratar.

La invención se ilustra por los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

50 litros de una lechada que contiene 10% p/p de proteína de célula única derivada de un organismo de la especie Pseudomonas methylo tropha obtenida mediante concentración de cultivo de fermentación según el método descrito en la patente británica nº 1.381.306, se trata con la enzima "Bacterial Proteinase Novo" fabricada por Novo Industri A/S, según las siguientes condiciones:

Se disuelve "Bacterial Proteinase Novo" en un pequeño volumen de agua, y se añade a la lechada para dar una concentración final de 0,2%, basado en el peso de proteína de célula única. La lechada se mantiene a 60°C, pH 7, durante 20 minutos, con agitación continua, tras lo cual se seca por aspersión. Se prepara también una muestra de control sin adición de enzima.

La solubilidad del nitrógeno para la muestra de control secada por aspersión es del 24%, mientras que para la muestra tratada con enzima, secada por aspersión, la solubilidad del nitrógeno es del 54%.

La "dispersabilidad" de estas dos muestras se compara del siguiente modo:

Se prepara una dispersión al 5% del material de control mezclando 250g en 5 litros de agua a 70°C en un mezclador Hobart empleando un acoplamiento de tipo batidor. La suspensión se mezcla durante 2 minutos y se transfiere entonces rápidamente a dos cilindros de medición de dos litros. La muestra de proteína que había sido tratada con "Bacterial Proteinase Novo", se examina del mismo modo.

En el caso de la muestra de control se desarrolla rápidamente una capa de sedimento en el fondo de los cilindros, mostrando una interfase en aproximadamente 40 ml después de 10 minutos y en 80 ml después de 30 minutos. Igualmente, se desarrolla mas lentamente una interfase superior de material de sedimentación. Esta interfase superior no es visible después de 10 minutos, pero si es visible en 1850 ml después de 30 minutos y en 1700 ml después de una hora.

Con la muestra tratada con "Bacterial Proteinase Novo", se obyiene una suspensión homogénea, no siendo discernible interfase alguna incluso después de 60 minutos.

#### EJEMPLO 2

Se preparan muestras como en el ejemplo 1 excepto que en lugar de "Bacterial Proteinase Novo", se emplea la enzima "ALCALASE". En este caso, se alteran tambien las condiciones de tratamiento a 70°C, pH 7 durante 20 minutos. De nuevo, se prepara una muestra de control s enzima.

La solubilidad del nitrógeno para la muestra de control, secada por aspersión, es de 22%, mientras que la muestra tratada con enzima, secada por aspersión, la solubilidad del nitrógeno es del 51%.

La dispersabilidad de las dos muestras se examina del modo descrito en el ejemplo 1. En el caso de la muestra de control, aparece rápidamente una interfase inferior de sedimento en aproximadamente 90 ml después de 10 minutos y permanece constante en ese nivel. Una interfase superior de material en sedimentación se separa lentamente a 1.700 ml después de 30 minutos y a 1.000 ml después de una hora.

Con la muestra tratada con "ALCALASE" aparece un pequeño sedimento en 20 ml después de 10 minutos, dejando ya de incrementar adicionalmente. Incluso después de 1 hora, no pudo discernirse ninguna interfase superior.

NOTA .-

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental; también se hace constar, que el invento corresponde a una solicitud de patente, presentada en Inglaterra, bajo el número 44764/74, de 16 de octubre de 1.974, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS DE MICROORGANISMOS; caracterizándose por lo siguiente:

1º.- Procedimiento para el tratamiento de células de microorganismos, caracterizado porque una suspensión acuosa de las células se trata con una enzima proteolítica, o un preparado de enzima proteolítica, para propor

cionar un producto de dispersabilidad mejorada.

5 2<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, caracterizado porque después del tratamiento con la enzima proteolítica o con el preparado de enzima proteolítica, se secan las células.

3<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup> ó 2<sup>a</sup>, caracterizado porque las células de microorganismos son células bacteriales.

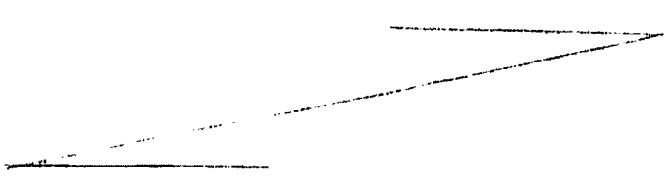
10 4<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 3<sup>a</sup>, caracterizado porque las células son cepas de las especies Pseudomonas methylotropha ó Pseudomonas rosea.

5<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 4<sup>a</sup>, caracterizado porque las células pertenecen a una de las cepas NCIB 10508-15 y 10592 a 10612.

15 6<sup>a</sup>.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el tratamiento con la enzima proteolítica o preparado de enzima proteolítica, tiene lugar a un pH de 3,5 a 10.

20 7<sup>a</sup>.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el tratamiento con la enzima proteolítica o preparado de enzima proteolítica, tiene lugar a una temperatura de 25 a 90°C.

25 8<sup>a</sup>.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la suspensión acuosa se trata con la enzima proteolítica o preparado de enzima proteolítica, durante un periodo de 5 a 120 minutos.



5 9<sup>a</sup>.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la enzima proteolítica o preparado de enzima proteolítica se añade a la suspensión acuosa en una concentración suficiente para dar una actividad enzimática comprendida entre  $5 \times 10^{-5}$  y  $5 \times 10^{-2}$  unidades Anson de actividad enzimática proteolítica por gramo de proteína de célula única en la suspensión.

10 10<sup>a</sup>.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la enzima proteolítica se deriva de una bacteria que es estable a temperaturas superiores a 50°C.

15 11<sup>a</sup>.- Procedimiento para el tratamiento de células de microorganismos; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 12 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 26 OCT. 1975

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED.

