



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	10	AI
		21			
		22	FECHA DE PRESENTACION		

449890

PATENTE DE INVENCION

20	PRIORIDADES	22	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	29841/75		16 de julio de 1975		INGLATERRA.
47	FECHA DE PUBLICIDAD	61	CLARIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			A23J		
43	TITULO DE LA INVENCION				
	PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DE PROTEINA DE CELULA SIMPLE.				
71	SOLICITANTE IS.				
	IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED.				
	DOMICILIO DEL SOLICITANTE				
	Imperial Chemical House, Millbank, Londres, S.W.1., Inglaterra.				
72	INVENTOR (ES)				
	DAVID CHARLES STEER., HUGH LEWIS WILLIAMS.				
73	TITULAR (ES)				
74	REPRESENTANTE				
	BOMEZ-ACEBO				

Esta invención se relaciona con un procedimiento para el tratamiento de proteína de célula simple al objeto de reducir su contenido en ácido nucleico.

5 La proteína de célula simple que puede obtenerse mediante cultivo de microorganismos en fermentación continua, contiene generalmente una proporción mayor de ácidos nucleicos que la que está contenida en la mayoría de otros alimentos. Para ciertas aplicaciones potenciales de la proteína de célula simple puede ser beneficioso reducir este elevado
10 nivel de ácido nucleico en cierto grado.

Por ejemplo, si la proteína de célula simple se proyecta para consumo humano se prefiere una reducción en su contenido en ácido nucleico. Los humanos que carecen de la enzima uricasa y, al contrario que los animales que poseen esta enzima, son incapaces de convertir ácido úrico, derivado de ácidos nucleicos, a alantoina. De este modo, en los
15 alimentos humanos es indeseable un elevado nivel de ácidos nucleicos.

Los métodos propuestos para la separación de ácidos nucleicos de proteína de célula simple, comprenden
20 frecuentemente la disrupción mecánica de las células. Esta operación permite que los ácidos nucleicos de las células se disuelvan, obteniéndose una ventaja de las diferentes propiedades de solubilidad de los ácidos nucleicos en comparación
25 con la proteína. Por ejemplo, en "The Nucleic Acids", Volumen 1, editado por E Chargaff y J N Davidson, Academic Press 1955, en la página 391, se describe un método para la preparación y recuperación de ácido ribonucleico (que comprende normalmente la mayor parte de los ácidos nucleicos de la proteína de
30 célula simple) que comprende la fragmentación de las células

5 utilizando un molino de trituración en húmedo, seguido por la extracción con soluciones calientes de sal. Las soluciones calientes de sal tienen la ventaja de reducir al mínimo la solubilidad de la proteína, al mismo tiempo que constituyen buenos disolventes para los ácidos nucleicos.

En la Patente británica No. 1.381.306, se describe y reivindica un método para la separación de células bacteriales de un medio acuoso, en donde las células son floculadas sometiendo el medio a por lo menos una de las etapas:

- 10 (A) elevar el pH del medio hasta un valor dentro de la gama de 8 a 11 mediante tratamiento con un álcali, y
- (B) calentar el medio a una temperatura del orden de 50 a 200°C; siendo seguida la etapa (A) y/o (B) por la etapa adicional de rebajar el pH hasta un valor de 2 a 5 mediante tratamiento con
- 15 un ácido, tras lo cual las células floculadas son separadas del medio.

Se ha encontrado ahora que el método de la patente británica No. 1.381.306 puede ser adaptado para proporcionar un proceso por el cual pueden producirse proteínas de células simples que tienen un contenido reducido en ácido nucleico.

Según la presente invención, se proporciona un proceso para el tratamiento de proteína de célula simple en donde un medio acuoso, que contiene células de microorganismos, se somete a las etapas de (A) tratamiento con un ácido para rebajar su pH a un valor no superior a 5 y (B) calentamiento a una temperatura de al menos 60°C, siendo efectuadas las etapas (A) y (B) en cualquier orden o al mismo tiempo, y a continuación (C) tratamiento con un álcali para elevar el pH del medio a un valor de como mínimo 6 mientras se mantiene la temperatura del medio a un valor de por lo menos 60°C, y a continuación las

células son separadas del medio.

Mediante el proceso de la invención, el contenido en ácidos nucleicos de las células de microorganismos que constituyen la proteína de célula simple, se reduce sin recurrir a la fragmentación mecánica de las células lo cual es indeseable. Se cree que este resultado deseable se consigue por la siguiente razón. El tratamiento con calor y ácido seguido por el tratamiento con álcali hace que las células sean permeables a los ácidos nucleicos posiblemente por separación de partes de las capas exteriores de las paredes de las células. Los ácidos nucleicos penetran a través de las paredes debilitadas de las células al medio circundante y el contenido en ácidos nucleicos de las células se reduce con ello. Cuando las células son separadas del medio, las mismas se separan de los ácidos nucleicos.

Las células de microorganismos que constituyen la proteína de célula simple, pueden ser células de levadura o bacteriales, preferiblemente estas últimas. El proceso es muy adecuado para el tratamiento de células bacteriales de los géneros Pseudomonas, Alcaligenes y Bacillus, por ejemplo cepas de las especies Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas diminuta, Alcaligenes faecalis, Bacillus cereus y particularmente Pseudomonas methylotropha. Esta última es una especie cuyas características se describen en la Patente británica No. 1.370.892. Cultivos de ciertas cepas de esta última especie ya han sido depositados y se encuentran disponibles en National Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torry Research Station, Aberdeen, Escocia, UK, habiéndose efectuado los correspondientes depósitos en las colecciones del US Department of Agriculture (NRRL) en Peoria, Illinois y Fermentation

Research Institute (FRI) en Japón. Las designaciones numéricas dadas a estos criterios son las siguientes:

NCIB Nos. 10508-15 y 10592-6

NRRL Nos. B 5352-64

5 FRI Nos. FERM 1215 - 27.

Otras especies bacteriales que pueden ser tratadas mediante el procedimiento son Pseudomonas rosea, Microcylus polymorphum y Hyphomicrobium variabile. Las características de estas especies se ofrecen también en la Patente británica No. 1.370.892 y han sido depositados cultivos de ciertas cepas en las anteriores colecciones encontrándose disponibles en NCIB. Las designaciones numéricas de estos últimos cultivos son las siguientes:

10 NCIB Nos. 10516-7 y 10597-612

15 NRRL Nos. B 5381-2 y B 5365-80

FRI Nos. FERM 1228-45

En la realización del proceso de esta invención, la etapa de tratamiento con álcali (en la cual el pH del medio se eleva a un valor del orden de 8 a 11 mediante tratamiento con un álcali) el método de la Patente británica No. 1.381.306, se puede llevar a cabo antes del calentamiento y tratamiento con ácido, sin que ello se produzca desventaja alguna.

Durante el calentamiento del medio (etapa B), la temperatura se eleva adecuadamente a 60-100°C, con preferencia 70-90°C. El tratamiento con ácido (etapa A), disminuye adecuadamente el pH hasta el orden de un valor de 2 a 5, con preferencia de 2,5 a 4,5. El ulterior tratamiento con álcali (etapa C) eleva convenientemente el pH hasta un valor del orden de 6 a 10, con preferencia de 6 a 8. Antes del tratamiento con álcali (etapa C), el medio se calienta y mantiene preferiblemente al

pH más bajo adecuadamente durante un periodo de al menos 1 minuto, con preferencia de 2 a 10 minutos.

Después de mantener el medio a una temperatura elevada y a un pH rebajado durante un periodo, la temperatura puede mantenerse en al menos 60°C durante el tratamiento con álcali. Es conveniente separar parte del medio antes del tratamiento con álcali, al objeto de reducir el costo del tratamiento.

El ácido usado para tratar el medio puede ser convenientemente un ácido inorgánico tal como ácido sulfúrico, clorhídrico o fosfórico, o un gas ácido tal como dióxido de carbono o dióxido de azufre. Cuando el proceso forma una etapa en un proceso global para la producción de proteína de célula simple, el ácido es con preferencia una mezcla de ácido fosfórico/sulfúrico en proporciones adecuadas para permitir que el medio, después de la separación de las células floculadas, sea recirculado a la etapa de fermentación del proceso. Después de la acidificación y calentamiento, es preferible que el tratamiento con álcali sea tan suave como sea posible para reducir al mínimo la disgregación de los grandes flóculos formados durante la acidificación y tratamiento de calentamiento. Alcalis adecuados incluyen hidróxido sódico, hidróxido cálcico, carbonato sódico y amoníaco.

Para el tratamiento mediante el proceso de la invención, el medio contiene preferiblemente de 0,05 a 2 % p/v de una sal, adecuadamente cloruro sódico o fosfato amónico.

Después del tratamiento con álcali, la separación de las células floculadas se puede efectuar por técnicas convencionales tales como centrifugado o filtración o mediante flotación.

La invención se ilustra por los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1

5 Una suspensión al 10 % de células floculadas de un organismo de la especie *Pseudomonas methylotropha*, formada como se describe en la Patente británica No. 1.381.306, se trata del siguiente modo:

10 Se añaden 50 g de cloruro sódico a 5 litros de medio y el pH se eleva de 4,3 a 7 utilizando solución diluida de sosa cáustica. La temperatura se eleva a 80°C y se mantiene durante 5 minutos. El medio tratado se mezcla con 35 litros de agua caliente y la SCP (proteína de de célula simple) se recupera por centrifugación. La SCP se seca en un horno de vacío a 50°C.

15 El análisis de la muestra tratada se muestra en la tabla 1 en la cual los resultados se comparan con los proporcionados por una muestra similar de células floculadas, que no habían sido tratadas para reducir su contenido en ácidos nucleicos. A partir de la tabla puede observarse que el contenido en ácidos nucleicos de la muestra tratada es mucho más bajo.

20

TABLA 1

Análisis	Muestra tratada	Muestra sin tratar
Pérdida a 105°C	2,9 %	4,4 %
Ceniza a 550°C	3,1 %	8,3 %
P Total	0,8 %	2,6 %
S Total	0,2 %	0,99 %
Cl Total	0,64 %	<0,02 %
Ca Total	0,18 %	0,12 %
Na Total	0,38 %	1,13 %
K Total	0,02 %	0,22 %
N ₂ Amoniaco	0,006 %	0,05 %
N ₂ Total	13,4 %	13,0 %
Acido nucléico	1,8 %	14,7 %
Acido total	6,8 %	5,9 %
Aminoácidos anhidros totales	69,9 %	57,3 %
Acido aspártico	8,3 %	7,2 %
Treonina	4,3 %	3,7 %
Serina	3,2 %	2,7 %
Acido glutámico	10,2 %	8,4 %
Prolina	3,3 %	2,7 %
Glicina	4,9 %	4,2 %
Alanina	6,6 %	5,6 %
Valina	5,7 %	4,5 %
Metonina	2,6 %	2,0 %
Isoleucina	4,7 %	3,8 %
Leucina	7,5 %	5,8 %
Tirosina	3,1 %	2,6 %
Fenilalanina	3,7 %	2,9 %
Histidina	1,9 %	1,6 %
Lisina	6,4 %	5,4 %
Arginina	5,1 %	4,0 %

Tabla - El análisis de muestras de Pseudomonas methylotropha con y sin tratamiento para reducir el ácido nucléico.

EJEMPLO 2

5 Se crecen en matraces sacudidos, para proporcionar
 1 litro de cultivo, siete cultivos, cada uno de los cuales
 de las cepas Pseudomonas methylotropha ASI (NCIB 10515), Pseu-
domonas diminuta, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluores-
cens, Pseudomonas alcaligenes, Alcaligenes faecalis, y Bacillus
 10 cereus. Cada cultivo se divide en dos partes y una de las par-
 tes se diluye con un volumen igual de agua, se centrifuga y se
 seca en un horno de vacío a 50°C. Esta parte constituye el
 control. La otra parte se calienta a 80°C con la adición de
 1 % p/v de cloruro sódico. El pH se rebaja entonces a 4 durante
 15 10 minutos y a continuación el cultivo se reneutraliza durante
 5 minutos; se diluye dos veces de volumen, se centrifuga y se
 seca en un horno de vacío a 50°C. Se llevan a cabo las determi-
 naciones de ácidos nucléicos. Los resultados se ofrecen en la
 Tabla 2.

TABLA 2

Cepa	Contenido en ácido nucléico del control (% p/p)	Contenido en ácido nucléico del cultivo de ensayo (% p/p)
P. methylotropha AS-1	10,1	3,5
P. diminuta	9,2	3,9
P. aeruginosa	7,1	7,0
P. fluorescens	11,7	4,7
P. alcaligenes	11,6	4,9
Alcaligenes faecalis	10,3	6,2
Bacillus cereus	4,5	2,2

EJEMPLO 3

Dos cultivos, cada uno de los cuales de las cepas Ps. fluorescens y Ps. alcaligenes, se tratan como en el ejemplo 2 a excepción de que se omite la adición de cloruro sódico. Los resultados son los siguientes:

5

	Contenido en ácido nucleico del con- trol (% p/p)	Contenido en ácido nucleico del cul- tivo de ensayo (% p/p)
Ps. fluorescens	10,9	7,0
Ps. Alcaligenes	9,3	4,8

10

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento para el tratamiento de proteína de célula simple, caracterizado porque un medio acuoso que contiene células de microorganismos se somete a las etapas de (A) tratamiento con un ácido para rebajar su pH a un valor superior a 5 y (B) calentamiento a una temperatura de al menos 60°C, efectuándose las etapas (A) y (B) en cualquier orden e al mismo tiempo, y a continuación (C) tratamiento con un álcali para elevar el pH del medio a un valor de al menos 6 mientras se mantiene la temperatura del medio en un valor de al menos 60°C, tras lo cual las células se separan del medio.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las células son bacteriales.

15 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque las células son de los géneros Pseudomonas, Alcaligenes o Bacillus.

20 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque las células son de cualquiera de las especies Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas diminuta, Alcaligenes faecalis o Bacillus cereus.

5.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque las células son de la especie Pseudomonas methylophila.

25 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque las células son de cualquiera de las cepas NCIB 10508-15 ó 10592-6.

30 7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las células son de cualquiera de las especies Pseudomonas rosea, Microcycclus polymorphum o Hyphomicrobium variabile.

8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque las células son de cualquiera de las cepas NCIB 10516-7 ó 10597-612.

5 9.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque antes de la etapa (A) y/o (B), el pH del medio se eleva a un valor del orden de 8 a 11 por tratamiento con un álcali.

10 10.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque durante la etapa (B), la temperatura del medio se eleva a un valor de 60 a 100°C.

11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque durante la etapa (B), la temperatura se eleva a un valor de 70 a 90°C.

15 12.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque durante la etapa (A), el pH del medio se baja a un valor de 2 a 5.

13.- Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque durante la etapa (A), el pH del medio se baja a un valor de 2,5 a 4,5.

20 14.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque durante la etapa (C) el pH del medio se eleva a un valor de 6 a 10.

25 15.- Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque durante la etapa (C), el pH del medio se eleva a un valor de 6 a 8.

16.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque antes del tratamiento con álcali en la etapa (C), el medio se calienta como en la etapa (B) y se mantiene a un pH inferior como en la

etapa (A) durante un periodo de 2 a 10 minutos.

5 17.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ácido usado en la etapa (A) es ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y/o ácido fosfórico.

18.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el álcali usado en la etapa (C) es hidróxido sódico, hidróxido cálcico, carbonato sódico y/o amoniacó.

10 19.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el medio contiene de 0,05 a 2 % p/v de una sal.

15 20.- Procedimiento para el tratamiento de proteína de célula simple, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

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

29 OCT. 1976

Madrid,

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED.

L. GOMEZ AQUEBO Y COMPA.
Firmados L. Gomez Aquebo y