

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 781**

51 Int. Cl.:
C12N 1/16 (2006.01)
A23L 1/28 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
A61K 36/06 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
C12P 19/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07742933 .0**
96 Fecha de presentación: **08.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2014764**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2009**

54 Título: **MÉTODO PARA PRODUCIR UNA LEVADURA SECA QUE CONTIENE S-ADENOSIL-L-METIONINA Y COMPOSICIÓN PARA INGESTIÓN ORAL.**

30 Prioridad:
10.05.2006 JP 2006131764

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.01.2012

73 Titular/es:
**mitsubishi gas chemical company, inc.
5-2, MARUNOUCHI 2-CHOME
CHIYODA-KU TOKYO 100-8324, JP y
mitsubishi tanabe pharma corporation**

72 Inventor/es:
**TAKANO, Kentarou;
GAYAMA, Shinyo y
TSUCHIDA, Toshito**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 371 781 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

Método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina y composición para ingestión oral.

5 **Campo técnico**

El presente invento se refiere a un método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina usando una levadura que tiene la capacidad para producir S-adenosil-L-metionina (que más adelante es descrita como SAME), y a una composición para ingestión oral. Más específicamente, se refiere a un método para producir una levadura seca que contiene SAME en elevada concentración, convenientemente con un buen rendimiento, y a una composición para ingestión oral formada al moldear una levadura seca que contiene SAME obtenida mediante el método.

15 **Técnica fundamental**

La SAME es una sustancia fisiológicamente activa y soluble en agua que desempeña un papel importante como dador de grupos metilo en la reacción de metilación con diversas transmetilasas en los organismos vivos, y se usa en gran medida como una medicación terapéutica para la depresión, el trastorno hepático, la artritis y similares, o como un alimento saludable. La célula de levadura contiene componentes útiles que incluyen 5'-nucleótido, un aminoácido libre, glutatión, que ejerce una acción antioxidante y se utiliza como una medicación terapéutica para el trastorno hepático, β -glucano, que ejerce una función de potenciación de la resistencia inmune y una función de mejora del estado intestinal, fibras dietéticas y similares, y se usa en gran medida como un alimento saludable.

En cuanto al método de producción convencional de SAME, dicho método ha sido corrientemente utilizado de modo que la SAME se acumule en las células por producción fermentativa usando un medio de cultivo que contiene L-metionina como precursor (véanse, por ejemplo, los Documentos 1 y 2 no de Patente), sea extraída y purificada por cromatografía, y sea transformada en una sal de SAME estable, tal como una sal con ácido sulfúrico o ácido p-toluenosulfónico o una sal con ácido butanodisulfónico (véanse, por ejemplo, los Documentos 3 y 4 no de Patente). Sin embargo, en el método de producción convencional, se requieren grandes cantidades de trabajo y coste para la extracción y purificación de la SAME acumulada en las células y es difícil producir SAME, que es importante como medicación terapéutica y alimento saludable, a bajo coste.

Se conoce un método de síntesis enzimática, que no requiere la extracción y purificación a partir de las células, como un método sustitutivo del método fermentativo. En consecuencia, se sintetiza enzimáticamente SAME con adenosina 5'-trifosfato (ATP) y L-metionina como sustratos usando una enzima sintetizadora de SAME (metionina adenosiltransferasa), que es aislada y purificada a partir de microorganismos, tal como una levadura (véanse, por ejemplo, el Documento 1 de Patente y los Documentos 5 y 10 no de Patente). En comparación con el método fermentativo, este método tiene las ventajas de que la SAME se acumula en una gran cantidad y no es necesario extraer la SAME de las células, pero presenta varios problemas ya que la preparación de la enzima es complicada, la enzima resultante presenta una actividad débil, es necesario eliminar la actividad enzimática inhibitoria, tal como la actividad de degradación de ATP, y el ATP es considerablemente caro como sustrato, y, por lo tanto, el método no ha experimentado un uso práctico. De acuerdo con el desarrollo de la ingeniería génica en los últimos años, la enzima puede ser convenientemente preparada usando un gen clonado de la enzima sintetizadora de SAME (véanse, por ejemplo, los Documentos 6 a 9 no de Patente) para resolver el problema de la preparación de la enzima, pero aún no se han resuelto otros problemas prácticos, tal como el uso del caro ATP como sustrato.

En el Documento 2 de Patente se enseña un microorganismo o extracto de microorganismos secado que comprende SAM estabilizada, y un método para producir el mismo. De acuerdo con la reivindicación 1, se usa un microorganismo o extracto microbiano que contiene SAM, en combinación con un ácido carboxílico orgánico y/o un agente quelante (EDTA). Además, se usan un ácido tal como el ácido sulfónico y sus derivados para mejorar la estabilidad de la SAM. Son ejemplos de dichos ácidos el ácido sulfónico y el ácido p-toluenosulfónico. Los ácidos fueron aplicados a la biomasa de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. La biomasa que contenía la SAM fue aislada y fue luego tratada con 0,1 de citrato por célula secada (ejemplo 1 de trabajo) o 0,1 de ácido succínico por célula secada (ejemplo 2 de trabajo). En el Documento 2 de Patente no se describe el intervalo de pHs usado del método en su totalidad, ni siquiera el del ácido utilizado. Pero es importante controlar el pH para la estabilidad de la SAM, que depende del pH. Además de eso, al contrario que en el presente invento, en el que se aplica un tratamiento térmico con objeto de inactivar las enzimas que degradan la SAM, en el Documento 2 de Patente no se describe información alguna acerca de dichas enzimas, ni siquiera acerca de cualquier tratamiento que pudiera inactivar dichas enzimas.

60 [Documento 1 de Patente] JP-A-51-125717

[Documento 2 de Patente] JP-A-2005-229812

65 [Documento 1 no de Patente] F. Schlenk y R. E. DePalma, J. Biol. Chem., 229, 1037-1050 (1957)

	[Documento 2 no de Patente]	S. Shiozaki et al., Agric. Biol. Chem., 53, 3269-3274 (1989)
	[Documento 3 no de Patente]	F. Schlenk y R. E. DePalma, J. Biol. Chem., 229, 1051-1057 (1957)
5	[Documento 4 no de Patente]	H. Kusakabe, A. Kuninaka y H. Yoshino, Agric. Biol. Chem., 38, 1669-1672 (1974)
	[Documento 5 no de Patente]	S. H. Mudd, G. L. Cantoni et al., J. Biol. Chem., 231, 481-492 (1958)
10	[Documento 6 no de Patente]	G. D. Markham et al., J. Biol. Chem., 255, 9082-9092 (1980)
	[Documento 7 no de Patente]	D. J. Markham y J. DeParis, J. Biol. Chem., 259, 14.505-14.507 (1984)
	[Documento 8 no de Patente]	S. Shiozaki et al., J. Biotechnology., 4, 345-354 (1986)
15	[Documento 9 no de Patente]	D. Thomas e Y. Surdin-Kerjan, J. Biol. Chem., 262, 16.704-16.709 (1987)
	[Documento 10 no de Patente]	D. Thomas, H. Cherest et al., Mol. Cell. Biol., 8, 5132-5139 (1988)

Descripción del invento

20 Como se ha descrito anteriormente, el método fermentativo convencional en que se utilizan microorganismos requiere grandes cantidades de trabajo y coste para la extracción y la purificación, y el método enzimático convencional requiere grandes cantidades de trabajo y coste para la síntesis. En consecuencia, es considerablemente difícil producir a bajo coste un producto que contiene SAME y pueda ser oralmente ingerido. Por lo tanto, un objeto del presente invento es establecer un método que permita producir una levadura seca que contiene SAME en elevada concentración, convenientemente con un buen rendimiento, como un método para producir a bajo coste el producto que contiene SAME, y proporcionar una composición para ingestión oral formada al moldear una levadura seca obtenida mediante el método de producción.

30 Como resultado de una seria investigación realizada por los inventores para alcanzar los objetivos, se ha hallado que la levadura seca diana que contiene SAME en elevada concentración puede ser convenientemente producida a bajo coste y con rendimiento elevado del modo siguiente. Se usa una levadura que tiene capacidad para la producción de SAME y que puede ser oralmente ingerida, y se sintetiza y acumula SAME en concentración elevada en las células. Las células de levadura son luego separadas del líquido de cultivo con un medio de separación, tal como una centrifugación, y son sometidas a al menos un tratamiento de entre un tratamiento de adición de un ácido mineral para ajustar el pH a un valor específico y un tratamiento de calentamiento de las células de levadura a una temperatura específica. Luego se secan las células de levadura. En consecuencia, se ha completado el presente invento.

40 En consecuencia, el presente invento proporciona un método para producir una levadura seca que contiene SAME en una concentración elevada, y una composición para ingestión oral formada al moldear la levadura seca, como se muestra en los puntos 1 a 5 siguientes.

45 1. Un método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina utilizando una levadura que tiene la capacidad para producir S-adenosil-L-metionina, que comprende las operaciones siguientes

- (i) separar un concentrado de células de levadura, de un líquido de cultivo celular de la levadura;
- 50 (ii) someter el concentrado de células de levadura a un tratamiento de adición de un ácido mineral para ajustar el pH dentro del intervalo de 1 a 4 (1); y
- (iii) aplicar después al concentrado un tratamiento de calentamiento a una temperatura de 40 a 70 °C (2); y
- (iv) finalmente, secar el concentrado.

55 2. El método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina, de acuerdo con el punto 1, en que se utiliza una levadura perteneciente a *Saccharomyces* como la levadura que tiene la capacidad para producir S-adenosil-L-metionina.

60 3. El método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina, de acuerdo con el punto 2, en que la levadura que pertenece a *Saccharomyces* es *Saccharomyces cerevisiae*.

65 4. El método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina, de acuerdo con el punto 1, en que el ácido mineral utilizado en el tratamiento de adición de un ácido mineral (1) es ácido sulfúrico.

5. El método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina, de acuerdo con el punto 1, en que el concentrado es secado mediante un método de liofilización o un método de secado por pulverización.

5 La clase de la levadura usada en el presente invento puede ser una que tenga la capacidad para producir SAME y pueda ser oralmente ingerida, y los ejemplos preferidos de la misma incluyen levaduras pertenecientes a *Saccharomyces*. Entre éstas, *Saccharomyces cerevisiae* es más preferida.

10 Para el cultivo de la levadura, se usan una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, diversas clases de sales inorgánicas, diversas clases de aditivos y similares. La fuente de carbono usada no está particularmente limitada con tal de que pueda ser utilizada por la levadura, y los ejemplos de la misma incluyen un hidrocarburo, tal como gluco-
15 sa, sacarosa, almidón y melaza residual, y un alcohol y un ácido orgánico, tal como etanol y ácido acético. La fuente de nitrógeno tampoco está particularmente limitada con tal de que pueda ser utilizada por la levadura, y los ejemplos de aquélla incluyen un compuesto nitrogenado inorgánico, tal como amoníaco, ácido nítrico o urea, y aquellos que contienen un compuesto nitrogenado orgánico, tal como extracto de levadura y extracto de malta. Los ejemplos de la sal inorgánica utilizada incluyen una sal de fosfato, una sal de potasio, una sal de sodio y una sal metálica, tal como magnesio, hierro, calcio, zinc, manganeso, cobalto, cobre y molibdeno. Además, se puede llevar el cultivo a cabo añadiendo metionina, adenina y adenosil-ribonucleósido, que constituyen el esqueleto de la SAME.

20 Aunque la temperatura de cultivo y el pH del líquido de cultivo varían dependiendo de la clase de la levadura que se va a utilizar, la temperatura de cultivo puede estar en el intervalo de 20 a 35 °C y el pH del líquido de cultivo puede estar en el intervalo de 4 a 7.

25 Se prefiere el cultivo aeróbico para aumentar el contenido de SAME en las células. En consecuencia, el recipiente para cultivo es preferiblemente aireado y puede ser agitado dependiendo de la necesidad, y, por ejemplo, se puede usar un recipiente para cultivo mecánicamente agitado, un recipiente para cultivo de tipo sustentación por aire, un recipiente para cultivo de tipo torre de burbujeo, y similares.

30 Los componentes del cultivo, tales como la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, las diversas sales inorgánicas y los diversos aditivos, se pueden añadir al recipiente para cultivo a la vez o individualmente y continua o intermitentemente. Por ejemplo, se puede alimentar el sustrato, tal como sacarosa y etanol, al recipiente para cultivo en forma de una mezcla con otros componentes del medio de cultivo, o se puede añadir independientemente al recipiente para cultivo, separadamente de los demás componentes del medio de cultivo. El pH del líquido de cultivo puede ser controlado con una disolución de ácido o álcali. El álcali para controlar el pH es preferiblemente amoníaco y urea, que se usan como fuente de nitrógeno, o una base no nitrogenada, tal como hidróxido sódico o hidróxido potásico.
35 Los ejemplos del ácido usado incluyen un ácido inorgánico, tal como ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido nítrico, y un ácido orgánico. Para controlar el pH se puede utilizar una sal de fosfato, una sal de potasio, una sal de sodio, una sal de nitrato y similares, que son bases inorgánicas.

40 La levadura se cultiva bajo las condiciones, y, en la fase en que se acumula la cantidad diana de SAME en las células de levadura, se extrae el líquido de cultivo del recipiente para cultivo y luego se somete a separación para obtener un concentrado de células de levadura. El método de separación no está particularmente limitado con tal de que las células puedan ser separadas y enjuagadas eficazmente, y los ejemplos preferidos del mismo incluyen un separador de levaduras por flujo a contracorriente y un aparato de ultrafiltración en que se usa una membrana de separación.
45

El concentrado de células de levadura separado es luego sometido a un primer tratamiento de adición de un ácido mineral, tal como ácido sulfúrico, y a un segundo tratamiento de calentamiento. Al llevarse a cabo el tratamiento de adición de un ácido mineral, se mejora la estabilidad de la SAME para aumentar el rendimiento. El ácido mineral añadido no está particularmente limitado con tal de que se pueda ingerir oralmente, y los ejemplos del mismo incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, siendo más preferido el ácido sulfúrico. La cantidad de adición del ácido mineral es aquella cantidad que proporciona un pH en el intervalo de 1 a 4.
50

Al llevarse a cabo el tratamiento de calentamiento, se pueden alcanzar la desactivación de la enzima de degradación de SAME y la esterilización. El tratamiento de calentamiento puede ser llevado a cabo bajo una condición tal que se aumente lo máximo posible el contenido de SAME obtenido, y la condición para el tratamiento de calentamiento es necesariamente, aunque depende del tiempo de calentamiento, de 40 a 70 °C.
55

El tiempo de calentamiento no puede ser determinado incondicionalmente ya que varía dependiendo de la temperatura de calentamiento, y es preferiblemente de 30 a 600 segundos, y más preferiblemente de 30 a 60 segundos. Al llevarse a cabo el tratamiento de calentamiento durante 30 segundos o más, se pueden alcanzar la desactivación de la enzima de degradación de SAME y la esterilización. Además, se acelera la permeación del ion del ácido mineral, por lo que se puede disminuir la cantidad del ácido mineral añadido. Al llevarse a cabo el tratamiento de calentamiento durante 600 segundos o menos, se puede evitar que se produzca una disminución del contenido de SAME a causa de su degradación.
60
65

El tratamiento de calentamiento se puede llevar a cabo bajo presión normal o presión aumentada. Al llevarse a cabo el tratamiento de calentamiento, o al llevarse a cabo el tratamiento de adición de un ácido mineral, se pueden obtener dichas células de levaduras secas que tienen un contenido de SAME relativamente elevado.

- 5 De acuerdo con el invento, se llevan a cabo tanto el tratamiento de adición de un ácido mineral como el tratamiento de calentamiento. La combinación de la cantidad de adición del ácido mineral y la temperatura de calentamiento es, aunque dependiendo del tiempo de calentamiento, una combinación de una cantidad de adición del ácido mineral que proporciona un pH de 1 a 4 y una condición de temperatura de 40 a 70 °C.
- 10 Una vez llevados a cabo tanto el tratamiento de adición de un ácido mineral como el tratamiento de calentamiento, se disminuye por evaporación el contenido de agua del concentrado de células de levadura resultante mediante, por ejemplo, un método de secado tal como un método de secado por pulverización con una secadora por pulverización o un método de liofilización con una temperatura de fase final de 25 °C, obteniéndose por ello una levadura seca.
- 15 Posteriormente, la levadura seca puede ser pulverizada hasta un polvo, y, si es necesario, se pueden añadir otro componente bioactivo y un aditivo, tal como un vehículo, a la levadura seca en forma de polvo, la cual puede ser luego transformada en tabletas por compresión para obtener una composición para ingestión oral en forma de tableta. La superficie de la tableta puede ser revestida. Se puede granular el polvo en una forma granular y se pueden encapsular los gránulos así granulados.

EJEMPLOS

El presente invento será descrito con mayor detalle por referencia a ejemplos y ejemplos comparativos, pero el presente invento no se limita a los ejemplos.

- 25 Ejemplo 1 (no parte del invento)

(a) Cultivo de células de levadura

- 30 De acuerdo con el conocido método de cultivo [S. Shiozaki et al., J. Biotechnology 4, 345-354 (1986) (Documento 8 no de Patente)] anteriormente descrito, se cultivaron células de levadura usando un recipiente para cultivo de 30 l de capacidad, producido por Marubishi Bioengineering Co., Ltd. En un medio de cultivo que contenía unos componentes que incluían 10% en masa de sacarosa y 1% en masa de extracto de levadura como fuente de carbono, 1,8% en masa de urea como fuente de nitrógeno, 1% en masa de L-metionina, 0,2% en masa de L-glicilglicina, 0,4% en masa de KH_2PO_4 , 0,01% en masa de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 µg/ml de biotina y 0,2% en masa de minerales mixtos (la formulación de los minerales mixtos incluía 2,0% en masa de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05% en masa de $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05% en masa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% en masa de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% en masa de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,001% en masa de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,001% en masa de H_3BO_3 , 0,001% en masa de Na_2MoO_4 y 0,001% en masa de KI), se inoculó *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2346, perteneciente a *Saccharomyces*, y se cultivó a una temperatura de cultivo de 27 a 29 °C y una velocidad de agitación de 150 rpm bajo aireación aerófila durante 6 días. Se añadieron sucesivamente etanol y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, que se quedaron escasos durante el cultivo, para aumentar el contenido de SAME. En consecuencia, se obtuvieron 18 l de un líquido de cultivo de células de levadura que tenía un contenido de células de 3,5% en masa y un contenido de SAME de 205 mg por gramo de levadura seca.

- 45 (b) Recogida de las células de levadura

Se trataron 18 l del líquido de cultivo de células de levadura con un separador centrífugo continuo de tipo giratorio (centrífuga Hitachi Himac CR10B2) para obtener 3,49 kg de un concentrado de células de levadura en forma de un líquido que tenía una concentración de células correspondiente a 18% en masa en términos de levadura seca.

- 50 (c) Adición de ácido mineral al concentrado de células de levadura

Se añadieron 224 g de ácido sulfúrico al 95% en masa a 3,49 kg del concentrado de células de levadura para obtener 3,71 kg de un concentrado de células de levadura que tenía un pH de 1.

- 55 (d) Producción de levadura seca

- Los 3,71 kg del concentrado de células de levadura que tenía un pH de 1 fueron secados por pulverización con una secadora por pulverización (producida por Nipro Corporation) que tenía un atomizador giratorio (disco giratorio) como atomizador, bajo unas condiciones de una temperatura de entrada en la cámara de secado de 195 a 205 °C, una temperatura de salida de la misma de 80 a 90 °C y una velocidad de alimentación de líquido de 38 g/min, para obtener 570 g de un polvo de levadura seca. El polvo de levadura seca resultante tenía un contenido de SAME de 174 mg por gramo de levadura seca.

- 65 El contenido de SAME en el polvo de levadura seca fue medido de tal modo que la SAME fue extraída de la levadura

seca que contenía SAME mediante un método conocido usando ácido perclórico [véase, por ejemplo, S. Shiozaki et al., Agric. Biol. Chem. 48, 2293-2300 (1984)] y fue cuantitativamente determinada por cromatografía líquida. La cromatografía líquida fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones analíticas.

5 Columna: Nacalai Tesque Inc., Cosmosil, 4,6 mm de diámetro x 100 mm.

Eluyente: disolución acuosa 0,2 M de KH_2PO_4 /metanol = 95/5 (relación volúmica).

Caudal: 0,7 ml/min.

10 Detector: UV (260 nm).

Tiempo de retención de la SAME: aproximadamente 150 segundos.

15 Ejemplos 2 a 4 (no parte del invento)

Se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en el Ejemplo 1 salvo por que se añadió ácido sulfúrico al concentrado de células de levadura para proporcionar un pH de 2, 3 ó 4, y se investigó la relación entre el pH después de la adición del ácido sulfúrico y el contenido de SAME después del secado por pulverización. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

20

Ejemplo Comparativo 1

25

Se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en el Ejemplo 1 salvo por que no se añadió ácido sulfúrico al concentrado de células de levadura, para obtener 581 g de un polvo de levadura seca que había sido secado por pulverización. El polvo de levadura seca resultante tenía un contenido de SAME de 136 mg por gramo de levadura seca. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

30

Tabla 1: relación entre el pH después de la adición de ácido mineral al concentrado de células de levadura y el contenido de SAME del polvo de levadura seca obtenido mediante secado por pulverización, habiéndose llevado solamente a cabo el tratamiento de adición de ácido mineral (sin tratamiento de calentamiento).

Tabla 1 (no parte del invento).

Ejemplo	Cantidad de adición de ácido sulfúrico al 95% (g)	pH después de la adición de ácido sulfúrico	Contenido de SAME en el polvo de levadura seca (mg por gramo de levadura seca)
Ejemplo 1	224	1	174
Ejemplo 2	118	2	171
Ejemplo 3	57,5	3	153
Ejemplo 4	23,6	4	144
Ejemplo Comparativo 1	0	5,2	136

35

Ejemplo 5 (no parte del invento)

Se llevaron a cabo los procedimientos (a) a (c) del mismo modo que en el Ejemplo 1, y 3,71 kg de un concentrado de células de levadura que tenía un pH de 1 por adición de ácido sulfúrico. Las células de levadura que no habían sido calentadas fueron vertidas en una cubeta de acero inoxidable para liofilización en un liofilizador (producido por ULVAC, Inc.) y fueron congeladas a $-50\text{ }^\circ\text{C}$, y las células de levadura fueron luego sometidas a liofilización durante 36 horas bajo unas condiciones de una temperatura de fase final de $25\text{ }^\circ\text{C}$. La levadura liofilizada resultante fue adicionalmente pulverizada para obtener 612 g de un polvo de levadura seca. El polvo de levadura seca resultante tenía un contenido de SAME de 170 mg por gramo de levadura seca. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

40

45 Ejemplos 6 a 8 (no parte del invento)

Se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en el Ejemplo 5 salvo por que se añadió ácido sulfúrico al concentrado de células de levadura para proporcionar un pH de 2, 3 ó 4, y se investigó la relación entre el pH después de la adición del ácido sulfúrico y el contenido de SAME después de la liofilización. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

50

Ejemplo Comparativo 2

55 Se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en el Ejemplo 5 salvo por que no se añadió ácido sulfúrico al

concentrado de células de levadura, para obtener 609 g de un polvo de levadura seca que había sido liofilizado. El polvo de levadura seca resultante tenía un contenido de SAME de 136 mg por gramo de levadura seca. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

- 5 Tabla 2: relación entre el pH después de la adición de ácido mineral al concentrado de células de levadura y el contenido de SAME del polvo de levadura seca obtenido mediante liofilización, habiéndose llevado solamente a cabo el tratamiento de adición de ácido mineral (sin tratamiento de calentamiento).

Tabla 2 (no parte del invento).

Ejemplo	Cantidad de adición de ácido sulfúrico al 95% (g)	pH después de la adición de ácido sulfúrico	Contenido de SAME en el polvo de levadura seca (mg por gramo de levadura seca)
Ejemplo 5	224	1	170
Ejemplo 6	118	2	168
Ejemplo 7	57,5	3	154
Ejemplo 8	23,6	4	143
Ejemplo Comparativo 2	0	5,2	136

10

Ejemplos 9 a 11 (no parte del invento)

- 15 Se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en el Ejemplo 5 salvo por que el ácido sulfúrico añadido al concentrado de células de levadura fue cambiado por ácido clorhídrico, ácido nítrico o ácido fosfórico (pH del concentrado de células de levadura después de la adición: 1), y se investigó la relación entre la cantidad de adición del ácido mineral y el contenido de SAME después de la liofilización. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

- 20 Tabla 3: relación entre el pH después de la adición de ácido mineral al concentrado de células de levadura y el contenido de SAME del polvo de levadura seca obtenido mediante liofilización, habiéndose llevado solamente a cabo el tratamiento de adición de ácido mineral (sin tratamiento de calentamiento).

Tabla 3 (no parte del invento).

Ejemplo	Ácido mineral añadido	Cantidad de adición de ácido mineral (g)	pH después de la adición del ácido mineral	Contenido de SAME en el polvo de levadura seca (mg por gramo de levadura seca)
Ejemplo 9	Ácido clorhídrico al 35%	295	1	160
Ejemplo 10	Ácido nítrico al 61%	307	1	155
Ejemplo 11	Ácido fosfórico al 85%	927	1	156
Ejemplo Comparativo 2	Ninguno	0	5,2	136

25

Ejemplos 12 a 23 (no parte del invento) y Ejemplos Comparativos 3 a 5

- 30 Se llevaron a cabo los procedimientos (a) a (b) de la misma manera que en el Ejemplo 1, y el concentrado de células de levadura fue sometido a un tratamiento de calentamiento utilizando un vaso de precipitados de vidrio, un agitador magnético y un baño de agua de calefacción a una temperatura de calentamiento de 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C o 90 °C durante un tiempo de 60 segundos, 300 segundos o 600 segundos para el tratamiento de calentamiento, y fue luego enfriado a 25 °C con un baño de agua. El concentrado fue vertido en una cubeta de acero inoxidable para liofilización en un liofilizador (producido por ULVAC, Inc.) y fue congelado a -50 °C, y las células de levadura fueron luego sometidas a liofilización durante 36 horas bajo unas condiciones de una temperatura de fase final de 25 °C. En la Tabla 4 se muestran los contenidos de SAME de los polvos de levadura seca resultantes.

35

40 Tabla 4: relación entre la temperatura de calentamiento y el contenido de SAME del polvo de levadura seca obtenido por liofilización de un concentrado de células de levadura solamente sometido a un tratamiento de calentamiento (sin adición de ácido sulfúrico).

40

Tabla 4 (no parte del invento)

Ejemplo	Ácido sulfúrico no añadido (pH del concentrado de células de levadura antes del calentamiento: 5,2)		
	Temperatura de calentamiento (°C)	Tiempo de calentamiento (segundos)	Contenido de SAME en el polvo de levadura seca (mg por gramo de levadura seca)
Ejemplo Comparativo 2	no calentado	–	136
Ejemplo 12	40	60	155
Ejemplo 13	40	300	156
Ejemplo 14	40	600	155
Ejemplo 15	50	60	156
Ejemplo 16	50	300	159
Ejemplo 17	50	600	158
Ejemplo 18	60	60	163
Ejemplo 19	60	300	168
Ejemplo 20	60	600	164
Ejemplo 21	70	60	158
Ejemplo 22	70	300	161
Ejemplo 23	70	600	155
Ejemplo Comparativo 3	90	60	127
Ejemplo Comparativo 4	90	300	109
Ejemplo Comparativo 5	90	600	73

Ejemplos 24 a 32

5 Se llevaron a cabo los procedimientos (a) a (c) de la misma manera que en el Ejemplo 1 y se añadió ácido sulfúrico a un concentrado de células de levadura para proporcionar un pH de 1, 2 ó 3. El concentrado de células de levadura fue sometido a un tratamiento de calentamiento utilizando un vaso de precipitados de vidrio, un agitador magnético y un baño de agua de calefacción a una temperatura de calentamiento de 60 °C durante un tiempo de 60 segundos, 10 300 segundos o 600 segundos para el tratamiento de calentamiento, y fue luego enfriado a 25 °C con un baño de agua. Las células de levadura fueron vertidas en una cubeta de acero inoxidable para liofilización en un liofilizador (producido por ULVAC, Inc.) y fueron congeladas a -50 °C, y las células de levadura fueron luego sometidas a liofilización durante 36 horas bajo unas condiciones de una temperatura de fase final de 25 °C. En la Tabla 5 se muestran los contenidos de SAME de los polvos de levadura seca resultantes.

15 Tabla 5: relación entre la temperatura de calentamiento y el contenido de SAME del polvo de levadura seca obtenido por liofilización de un concentrado de células de levadura sometido tanto a un tratamiento de adición de ácido mineral como a un tratamiento de calentamiento (pH del concentrado de células de levadura antes del calentamiento: 1, 2 ó 3).

Tabla 5

Ejemplo	pH del concentrado de células de levadura antes del calentamiento	Temperatura de calentamiento (°C)	Tiempo de calentamiento (segundos)	Contenidos de SAME en el polvo de levadura seca (mg por gramo de levadura seca)
Ejemplo 5*	1	no calentado	–	170
Ejemplo 24	1	60	60	172
Ejemplo 25	1	60	300	171
Ejemplo 26	1	60	600	166
Ejemplo 6*	2	no calentado	–	168
Ejemplo 27	2	60	60	175
Ejemplo 28	2	60	300	177
Ejemplo 29	2	60	600	170
Ejemplo 7*	3	no calentado	–	154

Ejemplo 30	3	60	60	176
Ejemplo 31	3	60	300	179
Ejemplo 32	3	60	600	173

* (no parte del invento)

Ejemplos 33 a 41 y Ejemplos Comparativos 6 a 8

- 5 Se llevaron a cabo los procedimientos (a) a (c) del mismo modo que en el Ejemplo 1, y 3,71 kg de un concentrado de células de levadura que tenía un pH de 3 por adición de ácido sulfúrico. El concentrado de células de levadura fue sometido a un tratamiento de calentamiento utilizando un vaso de precipitados de vidrio, un agitador magnético y un baño de agua de calefacción a una temperatura de calentamiento de 40 °C, 50 °C, 70 °C o 90 °C durante un tiempo de 60 segundos, 300 segundos o 600 segundos para el tratamiento de calentamiento, y fue luego enfriado a 25 °C con un baño de agua. El concentrado fue vertido en una cubeta de acero inoxidable para liofilización en un liofilizador (producido por ULVAC, Inc.) y fue congelado a -50 °C, y las células de levadura fueron luego sometidas a liofilización durante 36 horas bajo unas condiciones de una temperatura de fase final de 25 °C. En la Tabla 6 se muestran los contenidos de SAME de los polvos de levadura seca resultantes.
- 10
- 15 Tabla 6: relación entre la temperatura de calentamiento y el contenido de SAME del polvo de levadura seca obtenido por liofilización de un concentrado de células de levadura sometido tanto a un tratamiento de adición de ácido mineral como a un tratamiento de calentamiento (pH del concentrado de células de levadura antes del calentamiento: 3).

Tabla 6

Ejemplo	Ácido sulfúrico añadido (pH del concentrado de células de levadura antes del calentamiento: 3)		
	Temperatura de calentamiento (°C)	Tiempo de calentamiento (segundos)	Contenido de SAME en el polvo de levadura seca (mg por gramo de levadura seca)
Ejemplo 7*	no calentado	–	154
Ejemplo 33	40	60	154
Ejemplo 34	40	300	157
Ejemplo 35	40	600	155
Ejemplo 36	50	60	154
Ejemplo 37	50	300	164
Ejemplo 38	50	600	162
Ejemplo 30	60	60	176
Ejemplo 31	60	300	179
Ejemplo 32	60	600	173
Ejemplo 39	70	60	172
Ejemplo 40	70	300	163
Ejemplo 41	70	600	155
Ejemplo Comparativo 6	90	60	140
Ejemplo Comparativo 7	90	300	118
Ejemplo Comparativo 8	90	600	81

20 * (no parte del invento)

Aplicabilidad industrial

- 25 De acuerdo con el presente invento, se puede producir convenientemente, con un buen rendimiento y a bajo coste, una levadura seca que contiene SAME en elevada concentración. Se puede usar en gran medida una composición para ingestión oral formada al moldear la levadura seca que contiene SAME, como una medicación terapéutica para la depresión, el trastorno hepático, la artritis y similares, o como un alimento saludable.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina utilizando una levadura que tiene la capacidad para producir S-adenosil-L-metionina, que comprende las operaciones siguientes
- 10 (i) separar un concentrado de células de levadura, de un líquido de cultivo celular de la levadura;
- (ii) someter el concentrado de células de levadura a un tratamiento de adición de un ácido mineral para ajustar el pH dentro del intervalo de 1 a 4;
- (iii) aplicar después al concentrado un tratamiento de calentamiento a una temperatura de 40 a 70 °C; y
- 15 (iv) finalmente, secar el concentrado.
2. El método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina, de acuerdo con la reivindicación 1, en que se usa una levadura perteneciente a *Saccharomyces* como la levadura que tiene la capacidad para producir S-adenosil-L-metionina.
- 20 3. El método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina, de acuerdo con la reivindicación 2, en que la levadura que pertenece a *Saccharomyces* es *Saccharomyces cerevisiae*.
4. El método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina, de acuerdo con la reivindicación 1, en que el ácido mineral utilizado en el tratamiento de adición de un ácido mineral es ácido sulfúrico.
- 25 5. El método para producir una levadura seca que contiene S-adenosil-L-metionina, de acuerdo con la reivindicación 1, en que el concentrado es secado mediante un método de liofilización o un método de secado por pulverización.