

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 224**

51 Int. Cl.:

C07K 14/37 (2006.01)

C07K 14/375 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009** **E 09760916 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **24.08.2011** **EP 2358743**

54 Título: **Procedimiento para extraer hidrofobina de una disolución**

30 Prioridad:

16.12.2008 EP 08171868

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

11.02.2013

73 Titular/es:

UNILEVER NV (100.0%)

Weena 455

3013 AL Rotterdam , NL

72 Inventor/es:

HEDGES, NICHOLAS, DAVID

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 395 224 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 extraer hidrofobina de una disolución

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para extraer hidrofobina de una disolución. En particular se refiere a un procedimiento para extraer hidrofobina en un procedimiento de fermentación.

Antecedentes de la invención

10 La formación de espuma es un problema común en fermentaciones sumergidas, aeróbicas. La formación de espuma se produce por el burbujeo de gas en el medio de fermentación con el fin de proporcionar oxígeno para el crecimiento del organismo aeróbico que se cultiva (por ejemplo, cultivos de bacterias, levaduras, hongos, algas, células). Si el medio de fermentación contiene componentes tensioactivos tales como proteínas, polisacáridos o ácidos grasos, entonces se puede formar espuma sobre la superficie del medio a medida que se liberan del líquido burbujas del gas burbujeado. La formación de espuma crea una serie de problemas incluyendo el arrastre no deseable de producto, nutrientes y células en la espuma y puede hacer difícil la contención del procedimiento. Un procedimiento nuevo para controlar la formación de espuma es usar antiespumantes, de los cuales se usan comúnmente diversos tipos: a base de silicona (por ejemplo, polidimetilsiloxanos), polialquilenglicoles (por ejemplo, polipropilenglicol), ácidos grasos, poliésteres y aceites naturales (por ejemplo, aceite de linaza, aceite de soja). Los antiespumantes reemplazan a los componentes formadores de espuma en las superficies de las burbujas, dando como resultado la destrucción de la espuma por coalescencia de las burbujas. Se añaden antiespumantes al comienzo de y/o durante la fermentación.

20 Cuando el producto de la fermentación se destina a uso en alimentos, productos personales o medicina, es muy deseable que el producto se excrete por el organismo productor al medio de fermentación (es decir producción extra-celular, más bien que intracelular). Esto evita la necesidad de romper las células por medios físicos o químicos para liberar el producto para recuperación. Manteniendo las células intactas, el material celular se puede separar fácilmente del producto a fin de que esté exento de material intracelular y genético que normalmente se considera como un contaminante no deseable. Esto puede ser especialmente importante cuando el organismo productor ha sido modificado de manera genética. Sin embargo, la producción extra-celular puede intensificar el grado de formación de espuma en el fermentador, especialmente si el producto facilita la formación de espuma o aumenta la estabilidad de la espuma, por ejemplo un biotensioactivo o una hidrofobina. El uso de antiespumantes presenta un problema particular en la producción extra-celular de tales agentes formadores de espuma por dos razones: en primer lugar la cantidad de antiespumante requerida aumenta debido a que el propio agente espumante contribuye a formar espuma en el fermentador. En segundo lugar, no es necesario retirar el antiespumante de la mayoría de los productos de la fermentación puesto que está presente en bajas concentraciones que no afectan a la funcionalidad del producto. Sin embargo, cuando el producto de fermentación es un agente espumante, el antiespumante se debe retirar sustancialmente puesto que la presencia de antiespumante en el producto afectará a su funcionalidad.

35 Bailey et al, Appl. Microbiol. Biotechnol. 58 (2.002) págs. 721-727 desvelan la producción de las hidrofobinas HFB I y HFB II por la fermentación de transformantes de *Trichoderma reesei*. Se usó un antiespumante (Struktol J633) para prevenir la formación de espuma y se purificó la hidrofobina usando extracción acuosa en dos fases. Sin embargo los procedimientos de separación tales como los procedimientos de extracción acuosa en dos fases o cromatográficos son caros y pueden requerir productos químicos incompatibles con los alimentos.

40 Ahora se ha encontrado que, en lugar de retirar el antiespumante de la disolución es posible retirar la hidrofobina.

Ensayos y Definiciones

Hidrofobinas

45 Se pueden obtener hidrofobinas por cultivo de hongos filamentosos tales como hifomicetos (por ejemplo *Trichoderma*), basidiomicetos y ascomicetos. Son huéspedes preferidos en particular los organismos de calidad alimentaria, tales como *Cryphonectria parasitica* que segrega una hidrofobina denominada criparina (MacCabe y Van Alfen, 1.999, App. Environ. Microbiol 65: 5.431-5.435). De manera similar, la surfactina se puede obtener de *Bacillus subtilis* y glucolípidos a partir de, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium species* y *Torulopsis bombicola* (Desai y Banat, Microbiology and Molecular Biology Reviews, Mar. 1.997, págs. 47-64).

50 En el documento EP 1 623 631 se ha encontrado previamente que las hidrofobinas permiten la producción de espumas acuosas con excelente estabilidad para desproporcionamiento y coalescencia. Debido a que las hidrofobinas son agentes formadores de espuma muy eficaces, su presencia en el medio de fermentación presenta un reto particular para el control de la espuma.

55 Las hidrofobinas son una clase bien definida de proteínas (Wessels, 1.997, Adv. Microb. Physio. 38: 1-45; Wosten, 2.001, Annu Rev. Microbiol. 55: 625-646) capaz de autoensamblaje en una interfase hidrófoba/hidrófila y teniendo

una secuencia conservada:

X_n-C-X₅₋₉-C-C-X₁₁₋₃₉-C-X₈₋₂₃-C-X₅₋₉-C-C-X₆₋₁₈-C-X_m (SEC ID N° 1)

5 donde X representa cualquier aminoácido y n y m representan independientemente un número entero. Típicamente, una hidrofobina presenta una longitud de hasta 125 aminoácidos. Los restos cisteína (C) en la secuencia conservada son parte de puentes disulfuro. En el contexto de la presente invención, el término hidrofobina presenta un significado más amplio para incluir proteínas funcionalmente equivalentes indicando aún la característica de autoensamblaje en una interfase hidrófoba-hidrófila dando como resultado una película de proteínas, tales como las proteínas que comprenden la secuencia:

10 X_n-C-X₁₋₅₀-C-X₀₋₅-C-X₁₋₁₀₀-C-X₁₋₁₀₀-C-X₁₋₅₀-C-X₀₋₅-C-X₁₋₅₀-C-X_m (SEC ID N° 2)

o partes de la misma indicando aún la característica de autoensamblaje en una interfase hidrófoba-hidrófila dando como resultado una película de proteínas. Según la definición de la presente invención, se puede detectar autoensamblaje por adsorción de la proteína a Teflón y usando Dicroísmo Circular para establecer la presencia de una estructura secundaria (en general, α-hélice) (De Vocht et al., 1.998, Biophys. J. 74: 2.059-68).

La formación de una película se puede establecer mediante incubación de una lámina de Teflón en la disolución de proteínas seguido por al menos tres lavados con agua o tampón (Wosten et al., 1.994, Embo. J. 13: 5.848-54). La película de proteínas se puede visualizar por cualquier procedimiento adecuado, tal como marcando con un marcador fluorescente o mediante el uso de anticuerpos fluorescentes, como está establecido en la técnica. m y n tienen valores típicamente que oscilan de 0 a 2.000, pero más normalmente m y n en total son menores que 100 ó 200. La definición de hidrofobina en el contexto de la presente invención incluye proteínas de fusión de una hidrofobina y otro polipéptido así como conjugados de hidrofobina y otras moléculas tales como polisacáridos.

Las hidrofobinas identificadas hasta la fecha se clasifican en general o clase I o clase II. Los dos tipos se han identificado en los hongos como proteínas segregadas que se autoensamblan en interfases hidrófobas a películas anfipáticas. Los ensamblajes de las hidrofobinas de clase I son relativamente insolubles en general mientras que las hidrofobinas de clase II se disuelven fácilmente en una variedad de disolventes. Preferiblemente, la hidrofobina es soluble en agua, por lo cual se quiere decir que es al menos 0,1% soluble en agua, preferiblemente al menos 0,5%. Por al menos 0,1% soluble se quiere decir que no precipita hidrofobina cuando se someten 0,1g de hidrofobina en 99,9 ml de agua a centrifugación a 30.000 g durante 30 minutos a 20°C.

30 También se han identificado proteínas de tipo hidrofobina (por ejemplo "chaplinas") en bacterias filamentosas, tales como Actinomiceto y Streptomyces sp. (WO 01/74864; Talbot, 2.003, Curr. Biol, 13: R696-R698). Estas proteínas bacterianas por contraste con las hidrofobinas fúngicas, pueden formar sólo hasta un puente disulfuro puesto que sólo pueden tener dos restos cisteína. Tales proteínas son un ejemplo de equivalentes funcionales a las hidrofobinas con las secuencias de consenso mostradas en las SEC ID Nos. 1 y 2 y están dentro del alcance de la presente invención.

Se han clonado más de 34 genes que codifican las hidrofobinas, de más de 16 especies fúngicas (véase por ejemplo el documento WO 96/41882 que proporciona la secuencia de hidrofobinas identificada en Agaricus bisporus; y Wosten, 2.001, Annu Rev. Microbiol. 55: 625-646). Para el fin de la invención las hidrofobinas que poseen al menos identidad del 80% al nivel de aminoácidos para una hidrofobina que se encuentra en la naturaleza también están incluidas dentro del término "hidrofobinas".

Antiespumantes

El término "antiespumante" incluye tanto antiespumantes que se añaden normalmente antes de que tenga lugar la formación de espuma como también los que se añaden normalmente una vez que se ha formado la espuma (a veces conocidos como desespumantes). Una definición de antiespumantes usada en la presente invención se encuentra en "Foam and its mitigation in fermentation systems" - Beth Junker - Biotechnology Progress, 2.007, 23, 768-784.

Procedimiento de fermentación

La fermentación para producir hidrofobina se realiza mediante cultivo de la célula huésped en un medio de fermentación líquido dentro de un biorreactor (por ejemplo, un fermentador industrial). La composición del medio (por ejemplo, nutrientes, fuente de carbono, etc.), temperatura y pH se eligen para proporcionar las condiciones apropiadas para el crecimiento del cultivo y/o la producción del agente espumante. Se burbujea normalmente aire o aire enriquecido en oxígeno en el medio para proporcionar oxígeno para la respiración del cultivo.

El antiespumante puede estar incluido en la composición del medio inicial y/o añadido cuando se requiera por el periodo de la fermentación. La práctica común es emplear un procedimiento de detección de espuma, tal como una sonda de conductividad, que automáticamente provoca la adición del antiespumante. En la presente invención, el antiespumante está presente preferiblemente en una concentración final de desde 0,1 a 20 g/l, más preferiblemente

desde 1 a 10 g/l.

5 La temperatura del fermentador durante la etapa i), es decir durante la fermentación, puede estar por encima o por debajo del punto de turbidez del antiespumante. Preferiblemente, la temperatura del fermentador está por encima del punto de turbidez del antiespumante, puesto que el antiespumante es lo más eficaz causando coalescencia de las burbujas y la desaparición de la espuma por encima de su punto de turbidez. La temperatura del fermentador se elige en general para conseguir las condiciones óptimas para el crecimiento de las células huésped y/o la producción.

Breve descripción de la invención

10 Es el objeto de la invención proporcionar un procedimiento para extraer hidrofobina de una disolución en la que se añade carragenina a la disolución y el pH de la disolución se lleva por debajo de 3,5, preferiblemente por debajo de 3.

15 En una primera realización preferida de la invención, se filtra después la disolución para producir un producto retenido y un filtrado, recuperándose hidrofobina del producto retenido. En una segunda realización preferida de la invención, se somete la disolución a una etapa de centrifugación para producir un sobrenadante que se retira, dejando una fase restante. Se retira después hidrofobina de la fase restante.

Preferiblemente, el procedimiento comprende la etapa de cultivar una célula huésped en un medio de fermentación en el que la célula huésped segrega de manera extracelular hidrofobina y el medio de fermentación contiene un antiespumante. Más preferiblemente, el medio de fermentación es aireado por burbujeo de aire o aire enriquecido en oxígeno en él.

20 Preferiblemente, la hidrofobina es HFBI o HFBII de *Trichoderma reesei*.

Preferiblemente, la célula huésped es un hongo modificado de manera genética, más preferiblemente una levadura, lo más preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

Preferiblemente, la fuerza iónica de la disolución está por debajo de 0,5, preferiblemente por debajo de 0,4, más preferiblemente por debajo de 0,3, incluso más preferiblemente por debajo de 0,2

25 Preferiblemente, la carragenina es carragenina kappa o iota, más preferiblemente carragenina iota.

Preferiblemente también la relación de carragenina/hidrofobina (p/p) está entre 1:10 y 10:1, preferiblemente por encima de 1:5, más preferiblemente por encima de 1:1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá además en los siguientes ejemplos en los que la hidrofobina es siempre HFB II.

30 Ejemplo 1 (comparativo)

Concentración de partida 145,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de hidrofobina en 4,5 cm^3 de disolución de ácido cítrico 25 mM. Se filtró la disolución conduciendo a una concentración en el filtrado de 67,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ en 9 cm^3 .

Allí para el 93% de la hidrofobina original filtrada a su través.

Ejemplo 2 (comparativo)

35 Concentración de partida 146,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de hidrofobina en 4,5 cm^3 de citrato de sodio 25 mM. Se filtró la disolución conduciendo a una concentración en el filtrado de 68,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ en 9 cm^3 .

Por lo tanto de nuevo 93% de la hidrofobina original filtrada a su través.

Ejemplo 3 (invención)

40 Concentración de partida 145,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de hidrofobina en 4,5 cm^3 de una disolución de ácido cítrico 25 mM +gel cortado con carragenina kappa al 1%.

Se filtró la disolución conduciendo a una concentración en el filtrado de 3,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de hidrofobina en 9 cm^3 .

Por lo tanto sólo el 5% de la hidrofobina filtrada a su través.

Después se hicieron pasar 9 cm^3 de citrato de sodio 25 mM a pH 8 por filtro. La concentración en el filtrado fue 40,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, por lo tanto 56% de la hidrofobina original se recuperó de esa manera.

Ejemplo 4 (comparativo)

Concentración de partida $145,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de hidrofobina en $4,5 \text{ cm}^3$ de una disolución de ácido cítrico 25 mM + gel cortado con carragenina kappa al 1%.

Después se añadieron $0,325 \text{ cm}^3$ de NaOH (para ir a pH 7,0) y se filtró.

Concentración en el filtrado = $75,6 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ en 9 cm^3 .

- 5 Aquí, 100% de la hidrofobina terminó en el filtrado a pesar del uso de carragenina, mostrando la importancia del pH.

Ejemplo 5 (invención)

Concentración de partida $145,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de hidrofobina en $4,5 \text{ cm}^3$ de una disolución de ácido cítrico 25 mM + gel cortado con carragenina kappa al 1%.

- 10 Después se añadió NaCl sólido para proporcionar una concentración de NaCl 0,5 M y se filtró. La concentración en el filtrado es $50,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ en 9 cm^3 . Así, aproximadamente el 70% de la cantidad original de hidrofobina se filtró a pesar del pH correcto y el uso de gel cortado con carragenina kappa al 1%.

- 15 Después se hicieron pasar 9 cm^3 de citrato de sodio 25 mM a pH 8 por filtro conduciendo a una concentración en el filtrado de $13,8 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Por lo tanto, sólo el 19% de la hidrofobina se recuperó de esa manera, mostrando la influencia de la fuerza iónica sobre el procedimiento total. Cuanto mayor la fuerza iónica, menor la recuperación, siendo igual todo lo demás.

Ejemplo 6.a (Invención)

Concentración de partida $145,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de hidrofobina en $4,5 \text{ cm}^3$ en una disolución de ácido cítrico 25 mM + carragenina iota al 0,025%.

- 20 La concentración en el filtrado fue $1,6 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ en 9 cm^3 , habiendo pasado sólo el 2% de la hidrofobina original a su través.

Después se hicieron pasar por filtro 9 cm^3 de citrato de sodio 25 mM a pH 8, conduciendo a una concentración en el filtrado = $29,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Más del 40% de la hidrofobina original se recuperó.

- 25 **Ejemplo 6.b (Invención)**

Concentración de partida $145,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de hidrofobina en $4,5 \text{ cm}^3$ en una disolución de ácido cítrico 25 mM + carragenina kappa al 0,025%.

La concentración en el filtrado fue $28,4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ en 9 cm^3 , habiendo pasado a su través el 39% de la hidrofobina original.

- 30 Este ejemplo muestra que la carragenina iota realiza mejor que la carragenina kappa cuando se retiene hidrofobina.

Ejemplo 7 (comparativo)

Concentración de partida $145,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de hidrofobina en $4,5 \text{ cm}^3$ en una disolución de ácido cítrico 25 mM + pectina cortada al 1%.

- 35 La concentración en el filtrado fue $57,3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ en 9 cm^3 , que representa el 79% de la hidrofobina original, que muestra que la pectina no actúa.

Ejemplo 8 (comparativo)

Concentración de partida $145,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de hidrofobina en $4,5 \text{ cm}^3$ en ácido cítrico 25 mM y N creamer 46 al 1%.

La concentración en el filtrado fue $64,2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ en 9 cm^3 , que representa el 88% de la hidrofobina original, mostrando que el almidón hidrófobo no actúa.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para extraer hidrofobina de una disolución en la que se añade carragenina a la disolución y el pH de la disolución se lleva por debajo de 3,5, preferiblemente por debajo de 3.
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la disolución se filtra después para producir un producto retenido y un filtrado, recuperándose hidrofobina del producto retenido.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la disolución se somete a una etapa de centrifugación para producir un sobrenadante que se retira, dejando una fase restante, se retira entonces hidrofobina de la fase restante.
- 10 4. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped en un medio de fermentación en el que la célula huésped segrega hidrofobina de manera extracelular y el medio de fermentación contiene un antiespumante.
5. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que la hidrofobina es HFBI o HFBII de *Trichoderma reesei*.
6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la célula huésped es un hongo modificado de manera genética, más preferiblemente una levadura, lo más preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.
- 15 7. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que la fuerza iónica de la disolución está por debajo de 0,5, preferiblemente por debajo de 0,4, más preferiblemente por debajo de 0,3, incluso más preferiblemente por debajo de 0,2.
8. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que la carragenina es carragenina kappa o iota, más preferiblemente carragenina iota.
- 20 9. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que la relación de carragenina/hidrofobina (p/p) está entre 1:10 y 10:1, preferiblemente por encima de 1:5, más preferiblemente por encima de 1:1.