

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 498**

51 Int. Cl.:

C12N 1/34 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2008 E 08840309 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2201098**

54 Título: **Método para producir un agente espumante**

30 Prioridad:

18.10.2007 EP 07118762

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

02.01.2014

73 Titular/es:

**UNILEVER N.V. (100.0%)
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**COX, ANDREW, RICHARD;
RUSSELL, ANDREW, BAXTER y
TIER, CHRISTOPHER, MARK**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 436 498 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 un agente espumante

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de fermentación industriales. En particular, se refiere a la producción extracelular de un agente espumante mediante fermentación.

10 **Antecedentes de la invención**

La formación de espuma es un problema común en fermentaciones aerobias, sumergidas. La formación de espuma está provocada por el burbujeo de gas en el medio de fermentación para el fin de proporcionar oxígeno para el crecimiento del organismo aerobio que está cultivándose (por ejemplo bacterias, levaduras, hongos, algas, cultivos celulares). Si el medio de fermentación contiene componentes tensioactivos tales como proteínas, polisacáridos o ácidos grasos, entonces puede formarse espuma en la superficie del medio a medida que las burbujas de gas burbujeado se desprenden del líquido. La formación de espuma crea varios problemas incluyendo la extracción no deseada de producto, nutrientes y células en la espuma, y puede hacer difícil la contención del procedimiento. Un método conocido para controlar la formación de espuma es usar antiespumantes, de los que se usan comúnmente varios 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 sustituyen a los componentes formadores de espuma en las superficies de las burbujas, dando como resultando la destrucción de la espuma por la coalescencia de las burbujas. Los antiespumantes se añaden al comienzo de y/o durante la fermentación.

Cuando el producto de fermentación está destinado para su uso en alimentos, productos personales o medicamentos, es altamente deseable que el producto se excrete por el organismo productor al medio de fermentación (es decir, producción extracelular, en vez de intracelular). Esto evita la necesidad de romper las células por medios físicos o químicos con el fin de liberar el producto para su recuperación. Manteniendo las células intactas, el material celular puede separarse fácilmente del producto de modo que esté libre de material intracelular y genético que se considera habitualmente como un contaminante no deseado. Esto puede ser especialmente importante cuando el organismo productor se ha modificado genéticamente. Sin embargo, la producción extracelular puede intensificar el grado de formación de espuma en el fermentador, especialmente si el producto facilita la formación de espuma o potencia la estabilidad de la espuma, por ejemplo un biotensioactivo o una hidrofobina. El uso de antiespumantes presenta un problema particular en la producción extracelular de tales agentes espumantes por dos motivos: en primer lugar, la cantidad de antiespumante requerida aumenta porque el propio agente espumante contribuye a la formación de espuma en el fermentador. En segundo lugar, no es necesario eliminar el antiespumante de la mayoría de los productos de 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 debe eliminarse sustancialmente puesto que la presencia de antiespumante en el producto alterará su funcionalidad.

Bailey *et al*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 58 (2002) págs. 721-727 dan a conocer la producción de hidrofobinas HFB I y HFB II mediante la fermentación de transformantes de *Trichoderma reesei*. Se usó un espumante (Struktol J633) para impedir la formación de espuma y se purificó la hidrofobina usando una extracción de dos fases acuosa. Sin embargo, métodos de separación tales como extracción de dos fases acuosa o procedimientos cromatográficos son caros y pueden requerir productos químicos incompatibles con alimentos.

Davis *et al*, Enzyme and Microbial Technology 28 (2001) págs. 346-354 dan a conocer un método alternativo que evita la necesidad de antiespumantes. En este método se recoge la espuma producida durante la fermentación, y se recupera el producto de la misma. Este método se aplicó satisfactoriamente para la recuperación y concentración de surfactina, un biotensioactivo lipopeptídico. Sin embargo, este método tiene varios inconvenientes: en primer lugar, la eliminación continua de la espuma podría comprometer la naturaleza aséptica de la fermentación; en segundo lugar, la eliminación de la espuma podría afectar al recuento de células viables (porque algunas células podrían transferirse con la espuma), el volumen de líquido y el nivel de nutrientes en el fermentador, haciendo más difícil el control de la fermentación; y en tercer lugar, la extracción del producto de la espuma podría ser difícil, especialmente cuando el producto forma espumas muy estables. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de un método de fermentación mejorado para la producción extracelular de agentes espumantes.

60 **Breve descripción de la invención**

Se ha encontrado ahora que usando un grupo específico de antiespumantes para suprimir la formación de espuma en la producción extracelular de agentes espumantes mediante fermentación, el antiespumante puede eliminarse fácilmente del producto. Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un agente espumante que comprende:

i) cultivar una célula huésped en un medio de fermentación en el que:

la célula huésped secreta extracelularmente un agente espumante; y

5 el medio de fermentación contiene un antiespumante que tiene un punto de enturbiamiento;

ii) eliminar el antiespumante mientras la temperatura del medio de fermentación está por encima del punto de enturbiamiento.

10 El uso de un espumante minimiza la formación de espuma durante la fermentación. Seleccionando un espumante que tiene un punto de enturbiamiento y garantizando que la temperatura del medio de fermentación esté por encima de este punto de enturbiamiento se provoca que el antiespumante "se enturbie" (precipite) en forma particulada. Esto proporciona una vía sencilla mediante la cual puede eliminarse el antiespumante tras haberse completado la fermentación, por ejemplo mediante filtración, centrifugación o adsorción. Por el contrario, antiespumantes que no
15 tienen un punto de enturbiamiento requieren procedimientos de separación más complejos y/o caros tales como extracción de dos fases acuosa o cromatografía.

Preferiblemente en la etapa i) el medio de fermentación se airea burbujando aire o aire enriquecido con oxígeno en el mismo.

20 Preferiblemente en la etapa i) la temperatura del medio de fermentación está por encima del punto de enturbiamiento del antiespumante.

Preferiblemente en la etapa ii) el antiespumante se elimina mediante filtración, centrifugación o adsorción. Más preferiblemente; el antiespumante se elimina mediante filtración por membrana (flujo cruzado).

25 Preferiblemente en la etapa ii) se elimina al menos el 75% del antiespumante, más preferiblemente al menos el 85%, lo más preferiblemente al menos el 90%.

30 Preferiblemente en la etapa ii) la temperatura del medio de fermentación está al menos 10°C por encima del punto de enturbiamiento, más preferiblemente al menos 20°C por encima del punto de enturbiamiento, lo más preferiblemente al menos 30°C por encima del punto de enturbiamiento.

Preferiblemente las células huésped también se eliminan del medio de fermentación en la etapa ii).

35 Preferiblemente el agente espumante se purifica y/o concentra del medio de fermentación tras la etapa ii), por ejemplo mediante ultrafiltración.

Preferiblemente el antiespumante es de calidad alimenticia.

40 Preferiblemente, el antiespumante comprende al menos un polímero/tensioactivo no iónico, tal como un poliéter, un poli(alquilenglicol), un copolímero de bloque de óxido de propileno/etileno, un polialcohol a base de un copolímero de bloque de óxido de propileno/etileno, una dispersión de poliéter a base de polipropilenglicol o un éster de ácido graso alcoxlado.

45 Preferiblemente el agente espumante es de calidad alimenticia.

Preferiblemente el agente espumante es una hidrofobina, más preferiblemente una hidrofobina de clase II, lo más preferiblemente HFBI o HFBI de *Trichoderma reesei*.

50 Preferiblemente la célula huésped es un hongo modificado genéticamente, más preferiblemente una levadura, lo más preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

55 Preferiblemente, tras la etapa ii), la razón en peso de antiespumante con respecto a agente espumante es inferior a 0,2, más preferiblemente inferior a 0,15, lo más preferiblemente inferior a 0,1.

Descripción detallada de la invención

60 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica (por ejemplo en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridización y bioquímica). Pueden encontrarse técnicas convencionales usadas para métodos moleculares y bioquímicos en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed. (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc. - y la versión completa titulada Current
65 Protocols in Molecular Biology.

Agentes espumantes

En el contexto de la presente invención, el término "agente espumante" significa un tensioactivo de origen biológico que facilita la formación de espuma y/o potencia su estabilidad inhibiendo la coalescencia de las burbujas.

Preferiblemente el agente espumante es tal que, en disolución acuosa, el agente espumante produce una espuma que tiene un volumen de fase de gas de al menos el 20% del cual al menos el 50% permanece tras el almacenamiento durante 1 a 5°C, más preferiblemente tras 2 horas, lo más preferiblemente tras 4 horas, según la siguiente prueba.

Se preparan 80 ml de una disolución acuosa de agente espumante (0,5% en peso). Se airea la disolución sometiendo a cizallamiento la disolución en un recipiente cilíndrico enfriado (2°C), montado verticalmente, de acero inoxidable con camisa con proporciones internas de 105 mm de altura y diámetro de 72 mm. La tapa del recipiente llena el 54% del volumen interno dejando el 46% (180 ml) para la muestra. El rotor usado para someter a cizallamiento la muestra consiste en un propulsor rectangular de las proporciones correctas para raspar la superficie interior del envase a medida que rota (72 mm x 41,5 mm). También están unidas al rotor dos cuchillas semicirculares (60 mm de diámetro) de alto cizallamiento situadas en un ángulo de 45° con respecto a la unión rectangular. Se vierten 80 ml de disolución en el recipiente y se sujeta la tapa. Entonces se somete a cizallamiento la disolución a 1250 rpm durante 10 minutos. Se vierte inmediatamente la disolución aireada en un cilindro de medición. Se lee inmediatamente el volumen de espuma del cilindro de medición, y de nuevo tras el almacenamiento a 5°C. Se determina el volumen de fase de gas a partir del volumen de espuma medido y el volumen conocido de la fase acuosa (es decir, 80 ml) tal como sigue:

$$\text{volumen de fase de gas} = [(\text{volumen de espuma} - 80 \text{ ml}) / (\text{volumen de espuma})] \times 100$$

El líquido en la espuma se drena a lo largo del tiempo, conduciendo a dos fases separadas y distintas: una espuma en la parte superior y disolución acuosa por debajo. Sin embargo, es la estabilidad de la fase de espuma la que es el punto de interés en este caso. Para el cálculo del volumen de fase de gas, se toma el volumen de espuma como el volumen completo del sistema, es decir, tanto la fase de gas como la fase de líquido independientemente de si se han separado en dos fases distintas. El valor de volumen de fase de gas proporciona por tanto una indicación cuantitativa de la estabilidad de la espuma frente a la pérdida de gas. Por tanto, si el volumen inicial de fase de gas de la espuma es del 50%, entonces tras el almacenamiento el volumen de fase de gas deberá ser de al menos el 25%; si el volumen inicial de fase de gas es del 20%, entonces tras el almacenamiento debe ser de al menos el 10%.

Los agentes espumantes incluyen hidrofobinas y biotensioactivos tales como glicolípidos (por ejemplo ramnolípidos, trehalolípidos celobiolípidos, soforolípidos); lipopéptidos y lipoproteínas (por ejemplo péptido-lípido, serrawetina, α -ntipático, surfactina, subtilisina, gramicidinas, polimixinas); ácidos grasos, lípidos neutros y fosfolípidos; biotensioactivos poliméricos (por ejemplo emulsano, biodispersano, manano-lípido-proteína, liposano, hidrato de carbono-proteína-lípido, proteína PA), biotensioactivos particulados (vesículas y fimbrias, células completas), glucósidos (por ejemplo saponinas) y proteínas fibrosas (por ejemplo fibroína). También son agentes espumantes proteínas lácteas y de soja / hidrolizados de proteínas, aunque éstos no se producen habitualmente mediante métodos de fermentación. Preferiblemente el agente espumante no es una proteína láctea o de soja ni hidrolizado de proteína. En una realización particularmente preferida, el agente espumante es una hidrofobina.

Pueden obtenerse agentes espumantes cultivando organismos huésped que secretan de manera natural el agente espumante al medio de fermentación. Por ejemplo, pueden obtenerse hidrofobinas cultivando hongos filamentosos tales como hifomicetos (por ejemplo *Trichoderma*), basidiomicetos y ascomicetos. Huéspedes particularmente preferidos son organismos de calidad alimenticia, tales como *Cryphonectria parasitica* que secreta una hidrofobina denominada criparina (MacCabe y Van Alfen, 1999, App. Environ. Microbiol 65: 5431-5435). De manera similar, puede obtenerse surfactina de *Bacillus subtilis* y glicolípidos de por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, especies de *Mycobacterium* y *Torulopsis bombicola* (Desai y Banat, Microbiology and Molecular Biology Reviews, mar. De 1997, págs. 47-64).

Alternativamente, pueden producirse agentes espumantes mediante el uso de tecnología recombinante. Por ejemplo pueden modificarse células huésped, normalmente microorganismos, para que expresen agentes espumantes. Se conocen bien en la técnica técnicas para introducir constructos de ácido nucleico que codifican para agentes espumantes (cuando el agente espumante es un polipéptido) o enzimas necesarias para producir agentes espumantes (cuando el agente espumante es no peptídico, por ejemplo un biotensioactivo) en células huésped. También puede usarse tecnología recombinante para modificar secuencias de agente espumante o sintetizar agentes espumantes novedosos que tienen propiedades deseadas/mejoradas.

Normalmente, una célula huésped o un organismo apropiado se transforma mediante un α -ntipáticas de ácido nucleico que codifica para un agente espumante polipeptídico deseado. La secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido puede insertarse en un vector de expresión adecuado que codifica para los elementos necesarios para la transcripción y traducción y de manera tal que se expresarán en condiciones apropiadas (por ejemplo en

orientación apropiada y marco de lectura correcto y con direccionamiento y secuencias de expresión apropiados). Los métodos requeridos para construir estos vectores de expresión los conocen muy bien los expertos en la técnica.

- 5 Pueden usarse varios sistemas de expresión para expresar la secuencia que codifica para el polipéptido. Estos incluyen, pero no se limitan a, bacterias, hongos (incluyendo levadura), sistemas de células de insectos y sistemas de cultivo de células vegetales que se han transformado con los vectores de expresión apropiados. Huéspedes preferidos son los que se consideran de calidad alimenticia ("considerados generalmente como seguros (*generally regarded as safe*)" (GRAS)).
- 10 Las especies fúngicas adecuadas incluyen levaduras tales como (pero sin limitarse a) las de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* y similares, y especies filamentosas tales como (pero sin limitarse a) las de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Neurospora*, *Fusarium* y similares.
- 15 Las secuencias que codifican para agentes espumantes polipeptídicos son preferiblemente al menos el 80% idénticas al nivel de aminoácidos a un agente espumante identificado en la naturaleza, más preferiblemente al menos el 95% o el 100% idénticas. Sin embargo, expertos en la técnica pueden hacer sustituciones conservativas u otros cambios de aminoácidos que no reducen la actividad biológica del agente espumante.
- 20 Las hidrofobinas son una clase particularmente preferida de agente espumante. En el documento EP 1 623 631 se ha encontrado previamente que las hidrofobinas permiten la producción de espumas acuosas con excelente estabilidad frente a la desproporción y coalescencia. Debido a que las hidrofobinas son agentes espumantes sumamente eficaces, su presencia en el medio de fermentación supone un desafío particular para el control de la espuma.
- 25 Las hidrofobinas son una clase bien definida de proteínas (Wessels, 1997, Adv. Microb. Physio. 38: 1-45; Wosten, 2001, Annu Rev. Microbiol. 55: 625-646) que pueden autoensamblarse en una superficie de contacto hidrófoba/hidrófila, y que tienen una secuencia conservada:
- 30 $X_n\text{-C-X}_{5-9}\text{-C-C-X}_{11-39}\text{-C-X}_{8-23}\text{-C-X}_{5-9}\text{-C-C-X}_{6-18}\text{-C-X}_m$ (SEQ ID No. 1)
- en la que X representa cualquier aminoácido, y n y m representan independientemente un número entero. Normalmente, una hidrofobina tiene una longitud de hasta 125 aminoácidos. Los residuos de cisteína © en la secuencia conservada son parte de puentes disulfuro. En el contexto de la presente invención, el término hidrofobina
- 35 tiene un significado más amplio incluyendo proteínas funcionalmente equivalentes que todavía presentan la característica de autoensamblaje en una superficie de contacto hidrófoba-hidrófila dando como resultando una película de proteína, tales como proteínas que comprende la secuencia:
- 40 $X_n\text{-C-X}_{1-50}\text{-C-X}_{0-5}\text{-C-X}_{1-100}\text{-C-X}_{1-100}\text{-C-X}_{1-50}\text{-C-X}_{0-5}\text{-C-X}_{1-50}\text{-C-X}_m$ (SEQ ID No. 2)
- o partes de la misma que todavía presentan la característica de autoensamblaje en una superficie de contacto hidrófoba-hidrófila dando como resultando una película de proteína. Según la definición de la presente invención, el autoensamblaje puede detectarse adsorbiendo la proteína a teflón y usando difracción circular para establecer la presencia de una estructura secundaria (en general, α -hélice) (De Vocht *et al.*, 1998, Biophys. J. 74: 2059-68).
- 45 La formación de una película puede establecerse incubando un lámina de teflón en la disolución de proteína seguido por al menos tres lavados con agua o tampón (Wosten *et al.*, 1994, Embo. J. 13: 5848-54). La película de proteína puede visualizarse mediante cualquier método adecuado, tal como marcaje con un marcador fluorescente o mediante el uso de anticuerpos fluorescentes, tal como está bien establecido en la técnica. Normalmente, m y n tienen valores que oscilan entre 0 y 2000, pero más habitualmente m y n en total son inferiores a 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.
- 50 Las hidrofobinas identificadas hasta la fecha se clasifican generalmente como o bien de clase I o bien de clase II. Ambos tipos se han identificado en hongos como proteínas secretadas que se autoensamblan en superficies de contacto hidrófilas para dar películas \square ntipáticas. Los ensamblajes de hidrofobinas de clase I generalmente son relativamente insolubles mientras que los de hidrofobinas de clase II se disuelven fácilmente en una variedad de disolventes. Preferiblemente la hidrofobina es soluble en agua, mediante lo cual quiere decirse que es al menos el 0,1% soluble en agua, preferiblemente al menos el 0,5%. Por al menos el 0,1% soluble quiere decirse que no precipita nada de hidrofobina cuando se someten 0,1 g de hidrofobina en 99,9 ml de agua a centrifugación a 30.000 g durante 30 minutos a 20°C.
- 55 También se han identificado proteínas similares a hidrofobina (por ejemplo "chaplinas") en bacterias filamentosas, tales como *Actinomycete* y *Streptomyces sp.* (documento WO01/74864; Talbot, 2003, Curr. Biol, 13: R696-R698).
- 65 Estas proteínas bacterianas, al contrario que las hidrofobinas fúngicas, pueden formar sólo hasta un puente disulfuro puesto que sólo pueden tener dos residuos de cisteína. Tales proteínas son un ejemplo de equivalentes funcionales

a hidrofobinas que tienen las secuencias consenso mostradas en SEQ ID No 1 y 2, y están dentro del alcance de la presente invención.

Se han clonado más de 34 genes que codifican para hidrofobinas, de aproximadamente 16 especies fúngicas (véanse por ejemplo el documento WO96/41882 que facilita la secuencia de hidrofobinas identificadas en *Agaricus bisporus*; y Wosten, 2001, Annu Rev. Microbiol. 55: 625-646). Para el fin de la invención, hidrofobinas que presentan al menos el 80% de identidad al nivel de aminoácidos con una hidrofobina que se produce de manera natural también están abarcadas dentro del término "hidrofobinas".

10 Antiespumantes

El término "antiespumante" incluye tanto antiespumantes que se añaden habitualmente antes de producirse la formación de espuma como también los que se añaden habitualmente una vez que se ha formado la espuma (a veces conocidos como desespumantes). El grupo específico de antiespumantes adecuados para su uso en la presente invención son los que presentan un punto de enturbiamiento. El punto de enturbiamiento es la temperatura a la que una disolución acuosa del antiespumante se vuelve visiblemente turbia a medida que se separa en fases (es decir, las moléculas de antiespumante forman agregados que dispersan la luz) tal como se describe en la página 63 de Surfactant Aggregation and Adsorption at Interfaces, J. Eastoe, en Colloid Science: Principles, Methods and Applications, ed. T. Cosgrove, Blackwell Publishing, 2005.

Los ejemplos de antiespumantes que presentan puntos de enturbiamiento incluyen compuestos a base de poli(alquilenglicol) (PAG) tales como copolímeros de bloque de óxido de etileno/óxido de propileno, polialcoholes a base de copolímeros de bloque de óxido de etileno/óxido de propileno y poliéteres de óxidos de etileno y propileno; y compuestos a base de éster de ácido graso.

El punto de enturbiamiento depende de la estructura química y composición del tensioactivo. Por ejemplo, para tensioactivos no iónicos de polioxietileno (PEO), el punto de enturbiamiento aumenta a medida que aumenta el contenido en EO para un grupo hidrófobo dado. Preferiblemente el punto de enturbiamiento del antiespumante es de entre 0°C y 90°C, más preferiblemente entre 5°C y 60°C.

Preferiblemente, el antiespumante comprende al menos un polímero/tensioactivo no iónico, tal como un poliéter, un poli(alquilenglicol), un copolímero de bloque de óxido de propileno/etileno, un polialcohol a base de un copolímero de bloque de óxido de propileno/etileno, una dispersión de poliéter a base de polipropilenglicol o un éster de ácido graso alcoxilado. Antiespumantes a base de PAG (tales como Struktol J647 que puede obtenerse de Schill and Seilacher), polialcoholes a base de copolímeros de bloque de PO/EO (tales como Struktol J647 que puede obtenerse de Schill and Seilacher) y otros antiespumantes de tensioactivo no iónico son particularmente eficaces en la destrucción de espuma, incluso en presencia de agentes espumantes potentes tales como hidrofobina.

Pueden usarse mezclas de antiespumantes, en cuyo caso, el punto de enturbiamiento de una mezcla de este tipo se define como el punto de enturbiamiento más alto de los componentes individuales.

Algunos antiespumantes disponibles comercialmente comunes que presentan un punto de enturbiamiento se muestran en la tabla 1.

45 Tabla 1

Antiespumante	Punto de enturbiamiento / °C
Poli(alquilenglicol)	
Struktol J647, Schill & Seilacher	24
Struktol SB2121	Aprox. 30
UCON LB 65, Dow Chemical Company	25
UCON LB 285	15
UCON LB 625	10
UCON LB 1715	8
KFO673, Lubrizol	25
ST934, Pennwhite Ltd	Aproximadamente 20
Copolímeros de bloque de óxido de propileno/etileno	
Pluronic PE3100, BASF	41
Pluronic PE6100	23

Pluronic PE6200	33
Pluronic PE8100	36
Pluronic PE10100	35
Mazu DF204, BASF	18-21
Polialcohol a base de copolímero de bloque de PO/EO	
Struktol J650, Schill & Seilacher	13
Dispersiones de poliéter a base de polipropilenglicol	
Antiespumante 204, Sigma	15
Éster de ácido graso alcoxlado	
Struktol J673, Schill & Seilacher	30

Proceso de fermentación y eliminación del antiespumante

- 5 La fermentación para producir el agente espumante se lleva a cabo cultivando la célula huésped en un medio de fermentación líquido dentro de un bioreactor (por ejemplo un fermentador industrial). La composición del medio (por ejemplos nutrientes, fuente de carbono, etc.), la temperatura y el pH se eligen para proporcionar condiciones apropiadas para el crecimiento del cultivo y/o la producción del agente espumante. Normalmente se burbujea aire o aire enriquecido con oxígeno en el medio para proporcionar oxígeno para la respiración del cultivo.
- 10 El antiespumante puede incluirse en la composición inicial del medio y/o añadirse según se requiera a lo largo del periodo de la fermentación. La práctica común es emplear un método de detección de espuma, tal como una sonda de conductividad, que desencadena automáticamente la adición del antiespumante. En la presente invención, el antiespumante está presente preferiblemente a una concentración de desde 0,1 hasta 20 g/l, más preferiblemente desde 1 hasta 10 g/l. La temperatura del fermentador durante la etapa i), es decir, durante la fermentación, puede
- 15 estar por encima o por debajo del punto de enturbiamiento del antiespumante. Preferiblemente la temperatura del fermentador está por encima del punto de enturbiamiento del antiespumante, puesto que el antiespumante es lo más eficaz provocando la coalescencia de las burbujas y el colapso de la espuma por encima de su punto de enturbiamiento. La temperatura del fermentador se elige generalmente para lograr condiciones óptimas para la producción y/o el crecimiento de las células huésped.
- 20 Al final de la fermentación, el antiespumante debe eliminarse sustancialmente para garantizar que la funcionalidad del agente espumante no se vea alterada. Preferiblemente se elimina al menos el 75% del antiespumante, más preferiblemente al menos el 85%, lo más preferiblemente al menos el 90%. Por ejemplo, tras la etapa ii) la razón en peso de antiespumante con respecto a agente espumante es preferiblemente inferior a 0,2, más preferiblemente inferior a 0,15, lo más preferiblemente inferior a 0,1.
- 25 La eliminación del antiespumante se logra garantizando que la temperatura del medio de fermentación esté por encima del punto de enturbiamiento del antiespumante, de modo que el antiespumante se separa en fases. El antiespumante separado en fases puede eliminarse del medio de fermentación mediante cualquier método adecuado tal como:
- 30 - filtración, por ejemplo filtración de extremo cerrado o un filtro prensa
- 35 - filtración por membrana (flujo cruzado), por ejemplo microfiltración o ultrafiltración
- centrifugación
- adsorción, usando por ejemplo carbono activado, sílice o tierra de diatomeas como absorbente.
- 40 La eliminación del antiespumante puede tener lugar mediante por ejemplo uno de estos procedimientos en una única etapa. Alternativamente, los procedimientos pueden repetirse o combinarse. Por ejemplo, tras una primera etapa de filtración, el filtrado puede recalentarse (si es necesario) y filtrarse de nuevo.
- 45 Se ha encontrado que se elimina más antiespumante si la temperatura del medio de fermentación está al menos 10°C por encima del punto de enturbiamiento, preferiblemente al menos 20°C por encima del punto de enturbiamiento, lo más preferiblemente al menos 30°C por encima del punto de enturbiamiento. La temperatura del medio de fermentación no debe ser tan alta que se desnaturalice el agente espumante. Por este motivo, es preferible que el agente espumante sea estable frente al calor, por ejemplo hidrofobinas. Preferiblemente la temperatura del medio de fermentación es inferior a 90°C, más preferiblemente inferior a 75°C. En una realización preferida, el antiespumante tiene un punto de enturbiamiento en el intervalo de 20-30°C y la temperatura del medio
- 50

de fermentación en la etapa ii) está en el intervalo de 40-60°C. Por el contrario, en procedimientos convencionales se evita deliberadamente contener el medio de fermentación a una temperatura tan elevada, con el fin de minimizar la posibilidad de reacciones de degradación (que pueden provocar cambios de color y aroma), inactivación de enzimas, desnaturalización de proteínas y pérdida de funcionalidad (véase por ejemplo, la página 7 de "Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries", Eds. Grandison, A.S.; Lewis, M.J.).

Un método preferido para separar el antiespumante es la filtración por membrana. Generalmente, se ha creído que llevar a cabo la filtración por membrana de caldos de fermentación que contienen un espumante a temperaturas por encima de su punto de enturbiamiento da como resultado la obstrucción de la membrana por el antiespumante precipitado, provocando un bajo flujo de permeado y dificultades de procesamiento consiguientes: véase por ejemplo Yamagiwa *et al.*, J. Chem. Eng. Japan, 26 (1993) págs. 13-18 y el documento WO 01 / 014521. Por tanto, se había enseñado anteriormente que la filtración por membrana debe tener lugar a temperaturas por debajo del punto de enturbiamiento. Sin embargo, se ha encontrado ahora que se obtienen flujos aceptables cuando se llevan a cabo operaciones de ultrafiltración y microfiltración a una temperatura de aproximadamente 25°C por encima del punto de enturbiamiento del antiespumante.

Con el fin de garantizar que el agente espumante producto esté libre de material intracelular y genético (que se considera habitualmente como un contaminante no deseado) deben eliminarse las células del medio de fermentación. En una realización preferida, las células se separan del medio al mismo tiempo que se elimina el antiespumante precipitado, por ejemplo en una etapa de microfiltración que tiene lugar a una temperatura por encima del punto de enturbiamiento.

En una realización alternativa las células pueden eliminarse del medio en una etapa separada antes de la eliminación del antiespumante, por ejemplo mediante filtración (por ejemplo filtración de extremo cerrado o un filtro prensa), filtración por membrana / de flujo cruzado, (por ejemplo microfiltración o ultrafiltración) o centrifugación, a una temperatura por debajo del punto de enturbiamiento. En esta realización, puede llevarse a cabo una etapa de purificación y/o concentración (por ejemplo mediante ultrafiltración) (de nuevo a una temperatura por debajo del punto de enturbiamiento) tras la eliminación de las células pero antes de la separación del antiespumante. Entonces se calienta el medio hasta una temperatura por encima del punto de enturbiamiento de modo que el antiespumante puede eliminarse tal como ya se describió.

Una vez que se han eliminado el antiespumante y las células del medio de fermentación, el agente espumante producto puede purificarse adicionalmente y concentrarse según se requiera, por ejemplo mediante ultrafiltración. Si el agente espumante es una hidrofobina, puede purificarse del medio de fermentación mediante, por ejemplo, el procedimiento descrito en el documento WO01/57076 que implica adsorber la hidrofobina a una superficie y luego poner en contacto la superficie con un tensioactivo, tal como Tween 20, para eluir la hidrofobina de la superficie. Véanse también Collen *et al.*, 2002, Biochim Biophys Acta. 1569: 139-50; Calonje *et al.*, 2002, Can. J. Microbiol. 48: 1030-4; Askolin *et al.*, 2001, Appl Microbiol Biotechnol. 57: 124-30; y De Vries *et al.*, 1999, Eur J Biochem. 262: 377-85.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos que son ilustrativos sólo y no limitativos, y las figuras en las que:

La figura 1 muestra el % de transmisión como función de la temperatura para disoluciones acuosas al 0,2% en peso de Struktol J647 y J633.

La figura 2 muestra el gráfico de calibración determinado en el ejemplo 2.

Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación del punto de enturbiamiento para antiespumantes

El punto de enturbiamiento de un antiespumante se mide mediante el siguiente método, demostrado en el presente documento para dos antiespumantes disponibles comercialmente, uno de los que tiene un punto de enturbiamiento (Struktol J647) y el otro que no tiene (Struktol J633).

Se preparó una disolución del 0,2% en peso de cada antiespumante en disolución acuosa a temperatura ambiente. Se vertieron muestras de 20 ml en viales de vidrio cilíndricos (Turbiscan). Se equilibraron las muestras a la temperatura de medición en un baño de agua durante 1 hora. Se determinó la turbidez de la muestra usando un instrumento Turbiscan Lab Expert (Formulation, Francia). Este instrumento tiene una fuente de luz con una longitud de onda λ de 880 nm y un sensor óptico a 180° de la luz incidente que mide el porcentaje de la luz incidente que se transmite a través de la muestra en un punto a 25 mm de la base del vial que contiene la disolución de muestra. A medida que la disolución se vuelve más turbia, se reduce la luz transmitida. Se transfirieron los viales de muestra al instrumento Turbiscan Lab Expert que también se fijó a la temperatura de medición deseada. Se midió el % de transmisión como una función de la temperatura a intervalos de 5°C, comenzando desde 5°C, y se muestran los resultados en la figura 1. Para J647, la transmisión se reduce drásticamente desde el 75% hasta el 0% entre 20

25°C, mostrando que se había alcanzado el punto de enturbiamiento dentro de este intervalo de temperatura. Esto concuerda con el valor indicado por el fabricante de 24°C. (Si se requiere un valor más preciso del punto de enturbiamiento, pueden hacerse mediciones con intervalos de temperatura más pequeños, por ejemplo de 1 ó 2°C.) Por el contrario, J633 muestra muy poco cambio en turbidez puesto que no tiene un punto de enturbiamiento. Por tanto, J647 es un antiespumante adecuado para su uso en la presente invención, mientras que J633 no.

Ejemplo 2: Eliminación del antiespumante de una disolución modelo

Se realizó un experimento para demostrar que pueden eliminarse antiespumantes de disoluciones modelo elevando la temperatura de la disolución por encima del punto de enturbiamiento, y eliminando el precipitado mediante filtración. Se preparó una disolución al 0,3% (p/v) de Struktol J647 tomando una alícuota de 3,00 g de Struktol J647 y diluyendo hasta 1 l con agua MilliQ. Se calentaron muestras de esta disolución hasta por encima del punto de enturbiamiento colocándolas en un baño de agua fijado a la temperatura requerida durante 1 hora. Entonces se mezclaron las muestras suavemente mediante agitación con remolino y se filtraron inmediatamente.

Se realizaron dos experimentos diferentes. En primer lugar, se investigó el efecto del tamaño de poro del filtro usando filtros con tamaños de poro de 0,45 µm (Pall Life Sciences Acrodisc), 0,2 µm, 1,20 µm y 5,00 µm (todos Sartorius Minisart) con una jeringuilla de 2 ml a una temperatura de disolución fijada (50°C). En segundo lugar, se varió la temperatura de la disolución desde 30 hasta 70°C (es decir, desde 6 hasta 46°C por encima del punto de enturbiamiento) mientras se usaba un tamaño de poro fijado (0,2 µm).

Se determinaron las concentraciones del antiespumante en los filtrados usando el kit de prueba de agua Lange LCK 433 para tensioactivos no iónicos. Éste usa el principio de que los tensioactivos no iónicos (tales como J647) forman complejos con el indicador TBPE (éster etílico de tetrabromofenoltaleína), que puede extraerse en diclorometano y medirse fotométricamente para determinar la concentración. En primer lugar, se construyó una curva de calibración. Se preparó una disolución al 0,3% (p/v) de Struktol J647 tomando una alícuota de 3,00 g de Struktol J647 y diluyendo hasta 1 l con agua MilliQ a 15°C. Se tomaron alícuotas de ésta y se diluyeron con agua MilliQ dando concentraciones de: 6, 15, 30, 60, 150 y 300 mg/l. Se usó agua MilliQ como muestra de blanco. Se añadieron muestras de 0,2 ml de cada concentración a los tubos de ensayos del kit que contenían TBPE y diclorometano. Se mezclaron suavemente los tubos durante 2 minutos y se dejaron reposar durante 30 minutos. Entonces se midieron en un espectrofotómetro Lange DR2800 a 605 nm según las instrucciones del kit de prueba. La figura 2 muestra el gráfico de calibración resultante.

Entonces se diluyeron los filtrados 1/10 con agua MilliQ. Se midieron muestras de 0,2 ml en el espectrómetro tal como anteriormente y se leyó la concentración del antiespumante en cada filtrado a partir del gráfico de calibración. Se calculó la cantidad (%) de antiespumante restante en el filtrado como

$$(\text{concentración medida en el filtrado}) / (\text{concentración de partida conocida}) \times 100\%.$$

Pueden medirse concentraciones de antiespumante hasta 0,2 mg/l ($2 \times 10^{-5}\%$ p/v) mediante una técnica similar, usando el kit de prueba de agua Lange LCK 333, y construyendo una curva de calibración en el intervalo de concentración apropiado. En este caso se añade una alícuota de 2 ml de la muestra que va a medirse al kit de prueba, en vez de 0,2 ml.

Los resultados se facilitan en la tabla 2. La diferencia en la cantidad de antiespumante restante entre las dos mediciones usando el filtro de 0,2 µm a 50°C (es decir, el 6%) indica la barra de error asociada con este método.

Tabla 2

Tamaño de poro del filtro (µm)	Temperatura de la disolución (°C)	Temperatura por encima del punto de enturbiamiento (°C)	Antiespumante restante (%)
0,2	50	26	6
0,45	50	26	17
1,2	50	26	28
5,0	50	26	79
0,2	30	6	26
0,2	50	26	12
0,2	70	46	9

Los datos muestran que cuanto más pequeño es el tamaño de poro del filtro, mayor es la cantidad de antiespumante

5 eliminado, es decir, se disminuye la cantidad restante en la disolución, tal como se esperaba. Para J647, un tamaño de poro de 5,0 μm no es lo suficientemente pequeño como para eliminar la mayor parte del antiespumante, mientras que un tamaño de poro de 0,2 μm da como resultado la eliminación de aproximadamente el 90% del antiespumante. Los datos también muestran que para un tamaño de poro dado, el aumento de la temperatura de la disolución da como resultado una eliminación de antiespumante más eficaz.

Ejemplo 3. Eliminación del antiespumante de un medio de fermentación modelo

10 Para demostrar la eliminación de un espumante de un medio de fermentación típico, se preparó un medio de fermentación modelo. En primer lugar, se prepararon dos disoluciones que tenían las composiciones mostradas en la tabla 3. En una fermentación de alimentación discontinua típica, el lote 1 sería el medio de partida y el lote 2 se alimentaría gradualmente a lo largo del periodo de alimentación.

Tabla 3

Componente	Lote 1 (g/l)	Lote 2 (g/l)
Glucosa	22	440
Galactosa	0	10
Extracto de levadura	10	25
Dihidrogenoortofosfato de potasio	2,1	12
Sulfato de magnesio	0,6	2,5
Antiespumante - Struktol J647	0,4	0,8
Agua MilliQ	hasta 1 l	hasta 1 l

15 Se sometió a autoclave cada lote (volumen de 1 l) durante 20 minutos a 121°C. Entonces se mezclaron los lotes (50:50) dando un medio de fermentación modelo con una concentración de antiespumante de 0,6 g/l. No se inoculó el medio ni se sometió a fermentación, sino que se sometió a prueba en su forma sin procesar. Se calentaron las muestras y se filtraron para eliminar el antiespumante, y se midió la cantidad de antiespumante restante, todo tal como se describió en el ejemplo 2. Se facilita la proporción de antiespumante restante en cada caso en la tabla 4.

Tabla 4

Tamaño de poro del filtro (μm)	Temperatura de la disolución (°C)	Temperatura por encima del punto de enturbiamiento (°C)	Antiespumante restante (%)
0,2	30	6	16
0,2	50	26	10
0,2	70	46	6
0,45	50	26	8
1,2	50	26	10

20 Se repitió el experimento, pero se añadió antiespumante adicional al medio de fermentación modelo de modo que la concentración de partida era de 3 g/l. Se muestran los resultados en la tabla 5.

Tabla 5

Tamaño de poro del filtro (μm)	Temperatura de la disolución (°C)	Temperatura por encima del punto de enturbiamiento (°C)	Antiespumante restante (%)
0,2	50	26	8
0,45	50	26	8
1,2	50	26	15

30 Esto demuestra que seleccionando un espumante que tiene un punto de enturbiamiento, el antiespumante puede eliminarse sustancialmente del medio de fermentación modelo de una manera sencilla y conveniente.

Ejemplo 4: Eliminación del antiespumante de una disolución madre de fermentación que contiene un agente espumante

35 Se realizó una fermentación de alimentación discontinua de una cepa modificada genéticamente de *Saccharomyces*

5 *cerevisiae*. Se había modificado la cepa incorporando el gen que codifica para la hidrofobina HFBII del hongo *Trichoderma reesei* (un agente espumante) de modo que se logró la expresión extracelular de la hidrofobina durante la fermentación. Se llevó a cabo la fermentación esencialmente tal como se describe por van de Laar T *et al.*, en Biotechnol Bioeng. 96(3):483-94 (1997), usando glucosa como fuente de carbono y aumentando a escala el proceso hasta un volumen total de 150 l en un recipiente de fermentación de 300 l. Se usó el antiespumante Struktol J647 para controlar la formación de espuma durante la fermentación (en lugar de Struktol J673 usado por van de Laar T *et al.*).

10 Al final de la fermentación, se sometió a microfiltración la disolución madre de fermentación a 15°C (es decir, por debajo del punto de enturbiamiento del antiespumante J647) para eliminar las células de levadura. Se realizó la microfiltración en una planta a escala piloto con membranas cerámicas Kerasep que tenían un tamaño de poro de 0,1 µm, usando dos volúmenes de diafiltración con agua desionizada. Entonces se sometió a ultrafiltración la disolución madre, de nuevo a 15°C, para purificar parcialmente la HFBII. La ultrafiltración fue mediante membranas poliméricas enrolladas en espiral Synder de 1 kD a una presión transmembrana de 0,9 bar y cuatro volúmenes de diafiltración.

15 Se midió que la concentración del antiespumante en la disolución madre de fermentación tras la etapa de ultrafiltración (tal como se describe en el ejemplo 2) era de 0,196 g/l. Se midió que la concentración de HFBII era de 0,320 g/l mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), tal como sigue. Se diluyó la muestra con etanol acuoso al 60% dando una concentración aproximada de 200 µg/ml antes del análisis. Se realizó la separación por HPLC en una columna Vydac Protein C4 (250 x 4,6 mm) a 30°C. Se midió la hidrofobina mediante detección UV a 214 nm y se calculó la concentración mediante comparación con muestras de concentración de HFBII conocida obtenidas de VTT Biotechnology (Espoo, Finlandia).

25 Entonces se calentó la disolución madre libre de células hasta 50°C, se mantuvo a esa temperatura durante 30 minutos y entonces se filtró (tamaño de poro de 0,2 µm) para eliminar el antiespumante, tal como se describió en el ejemplo 2. Se midieron las cantidades de antiespumante y HFBII restantes en el filtrado tal como anteriormente y se facilitan en la tabla 6 (columna con el encabezado "Fase 1"). Entonces se recalentó el filtrado de esta primera fase hasta 50°C, se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos adicionales y se filtró tal como anteriormente. Se midieron las concentraciones de antiespumante y HFBII en el filtrado resultante y también se facilitan en la tabla 6 ("Fase 2").

Tabla 6

	Fase 1	Fase 2
Cantidad de HFBII en el filtrado (g/l)	0,32	0,30
% de HFBII restante	100	93,75
Cantidad de antiespumante en el filtrado (g/l)	0,05	0,028
% de antiespumante restante	25,5	14,3
Razón en masa de antiespumante:HFBII	0,156	0,093

35 Esto demuestra que seleccionado un espumante que tiene un punto de enturbiamiento, el antiespumante puede eliminarse sustancialmente de una disolución madre de fermentación que contiene células huésped y un agente espumante de una manera sencilla y conveniente.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un agente espumante, que comprende:
- 5 i) cultivar una célula huésped en un medio de fermentación en el que:
- la célula huésped secreta extracelularmente un agente espumante; y el medio de fermentación contiene un antiespumante que tiene un punto de enturbiamiento;
- 10 ii) eliminar el antiespumante mientras la temperatura del medio de fermentación está por encima del punto de enturbiamiento.
2. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa i) el medio de fermentación se airea burbujeando aire o aire enriquecido con oxígeno en el mismo.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que en la etapa i) la temperatura del medio de fermentación está por encima del punto de enturbiamiento del antiespumante.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la etapa ii) el antiespumante se elimina mediante filtración, centrifugación o adsorción.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que el antiespumante se elimina mediante filtración por membrana.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos el 75% del antiespumante se elimina en la etapa ii).
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la temperatura del medio de fermentación está al menos 10°C por encima del punto de enturbiamiento en la etapa ii).
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células huésped se eliminan del medio de fermentación en la etapa ii).
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el agente espumante se purifica y/o concentra del medio de fermentación tras la etapa ii).
- 35 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el antiespumante es de calidad alimenticia.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el antiespumante comprende al menos un polímero/tensioactivo no iónico.
- 40 12. Método según la reivindicación 11, en el que el antiespumante es un poliéter, un poli(alquilenglicol), un copolímero de bloque de óxido de propileno/etileno, un polialcohol a base de copolímero de bloque de PO/EO, una dispersión de poliéter a base de polipropilenglicol o un éster de ácido graso alcoxilado.
- 45 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el agente espumante es de calidad alimenticia.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el agente espumante es una hidrofobina.
- 50 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la célula huésped es un hongo modificado genéticamente.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la razón en peso de antiespumante con respecto a agente espumante tras la etapa ii) es inferior a 0,2.

Fig. 1

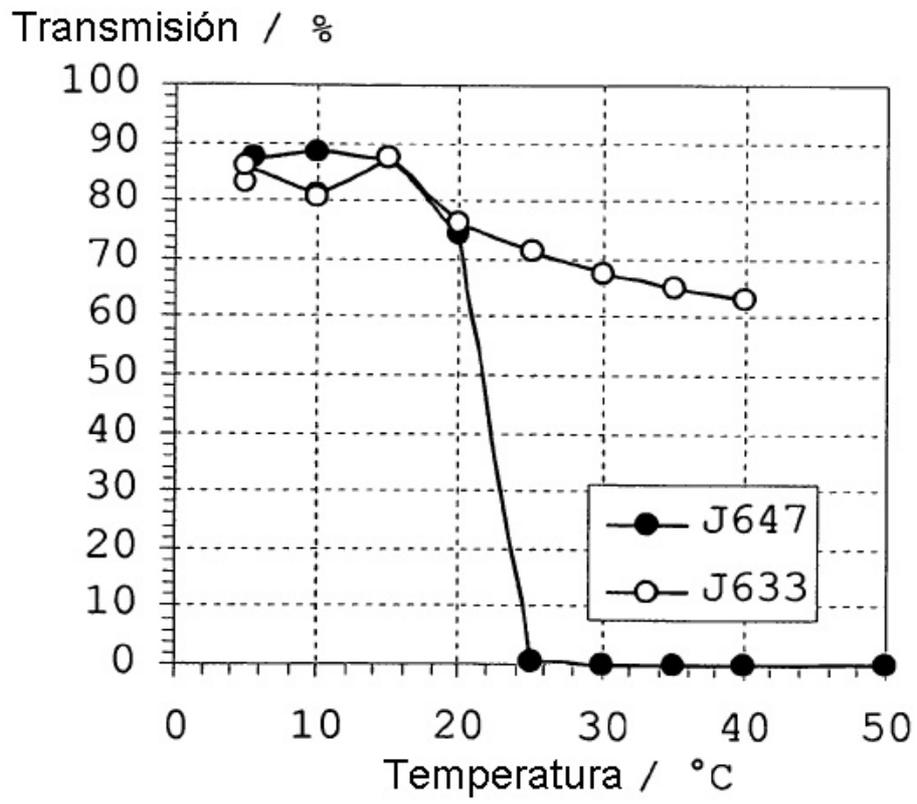


Fig. 2

