

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 648**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2010 PCT/CN2010/077991**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11054255**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2010 E 10827869 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2497833**

54 Título: **Método para preparar producto de proteína de manosa de levadura**

30 Prioridad:

06.11.2009 CN 200910212346

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

23.07.2018

73 Titular/es:

**ANGEL YEAST CO., LTD. (100.0%)
No. 168, Chengdong Avenue
Yichang, Hubei 443003, CN**

72 Inventor/es:

**YU, XUEFENG;
LI, ZHIHONG;
YU, MINGHUA;
YAO, JUAN;
ZHANG, YAN y
ZHANG, HAIBO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 676 648 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 preparar producto de proteína de manosa de levadura

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para preparar un producto de manoproteína de levadura.

10 **Técnica anterior**

15 La manoproteína está compuesta por la unión covalente de un polímero de manosa a una estructura de la cadena principal proteica, y está situada en la capa más externa de la pared de levadura. La manoproteína es uno de los principales componentes de la pared celular de la levadura. La manoproteína de levadura tiene un peso molecular de 20-200 kD, y está compuesta por un 5%-20% de péptido y un 80%-95% de manosa. La

20 La investigación científica ha demostrado que la manoproteína favorece la estabilización de las proteínas y el ácido tartárico en el vino, puede debilitar la astringencia y el sabor acidulado del tanino en el vino y puede aumentar el sabor de la plenitud y la riqueza del vino. El Chardonnay (vino blanco seco) producido en los distritos de Borgoña de Francia se suele fermentar en barricas de roble, y luego se añeja en lías de vino durante varios meses, en las que se agita 1-2 veces una vez a la semana durante el proceso de envejecimiento. Las investigaciones han demostrado que el ácido tartárico en el vino sería inestable si las lías de vino se separan a finales de marzo, mientras que la estabilidad del ácido tartárico en el vino sería muy buena si el vino y las lías de

25 vino se separan a finales de julio. Este fenómeno no se investigado y demostró en teoría hasta fechas recientes. El vino elaborado mediante el método anterior es rico en polisacáridos de pared celular, en los que el polisacárido principal es la manoproteína. Los principales efectos de la aplicación de manoproteína en el vino incluyen los siguientes aspectos:

30 1) prevenir la precipitación del tartrato de potasio;

2) efecto sinérgico con fragancia;

35 3) promover la fermentación del ácido málico-ácido láctico;

4) efecto sinérgico con sustancias polifenólicas para aumentar el sabor delicado, pleno y suave del vino y debilitar el sabor astringente del tanino;

40 5) prevenir el sedimento de la proteína.

En la actualidad, existen principalmente dos métodos para preparar la manoproteína de levadura: extracción térmica y extracción enzimática.

45 Pirólisis: el método es frecuente y comprende una solución tampón de levadura tratada con calor con un pH de 7 a alta temperatura para obtener el producto. En 1977, Herliin, preparó manoproteína a partir de levadura seca activa de acuerdo con el siguiente método: lavar levadura seca activa con agua destilada, preparar una suspensión con solución tampón con un pH de 7, cocer la suspensión en una olla durante 90 minutos a temperatura de 125°C (este proceso se realiza dos veces), centrifugar, precipitar el líquido centrifugado con 3 veces de alcohol en función del volumen del líquido centrifugado, y secar para obtener la manoproteína.

50 Enzimólisis: la levadura consigue que la pared celular se suela degradar con β -1,3-glucanasa para obtener el producto de manoproteína de levadura. Johanna Van Rinsum, et al., (Van RINSUM J, KLIS Fs M, Van Den ENDE H. Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomy cerevisiae* [J]. *Yeast*, 1991(7):717-726) separan manano de la pared celular de levadura con laminarinasa, llevan a cabo la purificación con cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio aniónico y obtienen manano en el que la proporción molar de *N*-acetil glucosamina, manosa y glucosa es 1:53 4. Yuxiang Zhang (Yuxiang Zhang, Zhuorong Yin, Process for Purifying mannoprotein and Assaying the molecular weight thereof [J]. *Yeast, Wine-brewing Science and Technology* 2005(4):72-74) extrae manoproteína de la levadura de cerveza residual con el método de enzimólisis, y el proceso comprende: levadura de cerveza residual \rightarrow pretratamiento \rightarrow rotura homogénea de la pared \rightarrow autólisis \rightarrow separación

55 centrífuga \rightarrow precipitación (pared celular) \rightarrow enzimólisis \rightarrow centrifugación \rightarrow concentración de sobrenadante \rightarrow secado por pulverización \rightarrow producto en forma de polvo. El contenido de polisacáridos es un 60,57% y el contenido de proteína es un 28,1% en el producto. El documento patente US 6139891 divulga un método para preparar manoproteína de levadura, que comprende tratar la pared celular con glucanasa y luego la separación de membrana para obtener la manoproteína de levadura. Además, se ha demostrado que el producto tiene el efecto de estabilizar el ácido tartárico cuando se usa en el vino. El documento WO 2006/121803 A1 divulga un

60 método para preparar manoproteína de levadura, que incluye llevar a cabo la autólisis de la levadura, tratar la

65

pared celular con proteasa y separación de membrana para obtener manoproteína de levadura y dextrano de levadura simultáneamente.

5 El documento EP 1094117 A1 divulga un método para preparar producto de manoproteína, que comprende: pirolizar la pared celular de levadura en condiciones de pH 6-7 y temperatura de 98°C-100°C durante 15-30 h, centrifugar para recoger el sobrenadante, precipitar el sobrenadante al menos 24 h a una temperatura de 4°C para eliminar el subproducto coloidal, centrifugar para recoger el sobrenadante, concentración a vacío y secar por pulverización para obtener el producto anterior. La solicitud de patente CN 1940084 A divulga un método para preparar manoproteína de levadura, que comprende: recolección de levadura de lías de vino, enzimólisis, tratamiento térmico, precipitación con alcohol y obtención del producto de manoproteína de levadura.

15 Se extrae abundante proteína simultáneamente durante el proceso de tratamiento térmico de extracción de manoproteína de levadura, lo que dificulta el tratamiento posterior y reduce la eficacia de la extracción (Zhaohui Hu etc, The Progress of Study in mannoprotein obtained from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. 34. (4): 64-66). La manoproteína de levadura obtenida por tratamiento con una enzima también contiene cierta cantidad de proteína, y el rendimiento es menor porque la estructura de la pared celular no está lo suficientemente suelta cuando solo se usa un tratamiento enzimático. Además, el peso molecular apropiado de la manoproteína de levadura es significativo en lo que respecta a si la manoproteína de levadura puede producir suficiente efecto en el vino, por lo que la manoproteína de levadura obtenida sin usar la separación de membrana no solo influye en su efecto, sino que también produce un efecto negativo en el vino debido a la proteína masiva.

Sumario de la invención

25 La materia prima utilizada en la presente invención es la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* o las paredes celulares de levadura pertenecientes a otras *Saccharomyces*. La materia prima puede comprarse en el mercado u obtenerse de *Saccharomyces cerevisiae* o levadura perteneciente a otras especies de *Saccharomyces* mediante autólisis y separación. El método de la presente invención se define en la reivindicación 1 y comprende:

30 1) tratar la pared celular de levadura a alta temperatura y valor de pH alto, el valor de pH de la pared celular de levadura se ajusta a 7,0-10,0 con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico diluido, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, etc., y la pared celular de levadura se trata con calor calentando a una temperatura de 80°C-135°C

35 2) tratar con proteasa: la temperatura de la pared celular de levadura tratada en la etapa 1) se ajusta a 30°C-70°C, se añade proteasa alcalina para tratar la pared celular de levadura, y la suspensión se centrifuga para recoger un sobrenadante;

40 3) precipitar a baja temperatura: el sobrenadante obtenido en la etapa 2) se enfría con agua helada a una temperatura baja de 0°C-20°C en un tanque de almacenamiento, se mantiene a dicha temperatura durante 1-20 h, y se centrifuga para eliminar la precipitación;

45 4) separar por membrana: el sobrenadante obtenido en la etapa 3) se separa por membrana con una membrana que tiene un valor de corte del peso molecular (MWCo) de 200-400 kD, preferiblemente 400 kD, en la que el aparato utilizado para la separación de membrana puede ser un aparato separador de membrana tubular o en espiral que usa una membrana de filtrado orgánica o una membrana inorgánica, y luego el filtrado se recoge y se seca por pulverización para obtener el producto de manoproteína de levadura, en el que la siguiente etapa se incluye además en dicha etapa 3) ajustando el valor de pH de dicho sobrenadante a 3,0-6,0 antes de llevar a cabo una concentración a vacío.

50 Preferiblemente, en dicha etapa 1), la concentración de la pared celular de levadura se ajusta a un 5-15 % en peso añadiendo agua desionizada.

Preferiblemente, la pared celular de levadura se trata térmicamente durante 0,5- 5 h en dicha etapa 1).

55 Preferiblemente, la concentración de la proteasa alcalina puede ser de un 0,01-0,5 % en peso en dicha etapa 2).

Preferiblemente, la siguiente etapa está comprendida además en dicha etapa 2): calentar la pared celular de levadura tratada con proteasa alcalina a una temperatura de 90°C para destruir la enzima. Preferiblemente, la pared celular de levadura se trata con proteasa durante 2-15 h en dicha etapa 2).

60 Preferiblemente, la fuerza centrífuga de la separación centrífuga es más de 5000 g en dicha etapa 2). La etapa de concentración a vacío del sobrenadante de la etapa 3) se realiza con un concentrador multiefecto hasta que la concentración de la sustancia seca del mismo es un 10-40 % en peso antes de llevar a cabo la precipitación a baja temperatura. En la etapa 3): el ajuste del valor de pH de dicho sobrenadante a 3,0-6,0 se realiza con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico diluido, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, etc. antes de llevar a cabo la concentración a vacío.

La solución técnica de extraer manoproteína en la presente invención es precisamente opuesta a las enseñanzas de la técnica anterior, es decir, el sobrenadante se precipita a baja temperatura en condiciones ácidas. Además, el propósito de la separación de membrana en la presente invención consiste en hacer pasar la manoproteína, que es opuesta al proceso para interceptar la manoproteína usando la separación de membrana en la técnica anterior. La limpidez del filtrado es obviamente mayor que la del líquido de retención en la separación de membrana. Una gran masa de alto peso molecular de proteína y otros polisacáridos también están contenidos en el líquido de retención, lo que tendrá un efecto adverso sobre la estabilización cuando el producto se aplique al vino. Estas proteínas y polisacáridos de alto peso molecular se eliminan mediante interceptación, lo que facilita que la manoproteína de levadura produzca el efecto de estabilizar el ácido tartárico del vino y la proteína en el vino. Mientras tanto, el tiempo requerido en la pirólisis en el presente método es más corto que en la técnica anterior, de modo que las etapas del experimento se simplifican y el coste del experimento se reduce. Además, las pruebas se llevan a cabo varias veces para seleccionar parámetros y mejorar la solución técnica.

15 Realización

Ejemplo 1

El valor de pH de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (pared celular de levadura Fubang, Angel Yeast Co., Ltd) comprado en el mercado se ajusta a 7,0 con ácido clorhídrico diluido, y luego la pared celular ajustada se calienta a una temperatura de 100°C y se mantiene durante 5 h. La temperatura de la pared celular de levadura se ajusta a 50°C, se añade proteasa alcalina con una concentración porcentual de un 0,01% en peso para tratar la pared celular de levadura durante 15 h, y luego la suspensión obtenida se centrifuga para recoger un sobrenadante.

El sobrenadante se enfría con agua helada hasta que su temperatura es de 0°C en el tanque de almacenamiento, se mantiene a la temperatura durante 10 h y se centrifuga para eliminar el precipitado.

El sobrenadante centrifugado se separa por membrana con membranas de fibra hueca que tienen un MWCo de 200 kD y luego el filtrado se recoge y se seca por pulverización para obtener un producto de manoproteína de levadura.

El producto es la muestra 1.

35 Ejemplo 2

Se añade agua desionizada a la pared celular de levadura hasta que la concentración porcentual de la pared celular de levadura se ajusta a un 5% en peso, en la que la pared celular de levadura se obtiene de *Saccharomyces cerevisiae* por medio de autólisis y separación. Se añade ácido sulfúrico diluido hasta que el valor de pH de la pared celular de levadura se ajusta a 10,0, y luego la pared celular de levadura ajustada se calienta hasta una temperatura de 80°C y se mantiene durante 5 h. La temperatura de la pared celular de levadura se ajusta a 30°C, se añade proteasa alcalina con una concentración porcentual de un 0,5% en peso para tratar la pared celular de levadura durante 8 h, se lleva a cabo el tratamiento de calentamiento hasta 90°C para destruir la enzima, y luego la suspensión obtenida se centrifuga para recoger el sobrenadante. El valor de pH del sobrenadante se ajusta a 3,0 con ácido sulfúrico diluido. Se concentra a vacío el sobrenadante ajustado con un concentrador multiefecto hasta que la concentración porcentual de sustancia seca del mismo es un 30% en peso, se enfría con agua helada hasta que su temperatura es de 20°C en el tanque de almacenamiento, se mantiene a la temperatura durante 1 hora y se centrifuga para eliminar la precipitación.

El sobrenadante centrifugado se separa por membrana con membranas cerámicas que tienen un MWCo de 200 kD y luego el filtrado se recoge y se seca por pulverización para obtener un producto de manoproteína de levadura.

El producto es la muestra 2.

55 Ejemplo 3

Se añade agua desionizada a la pared celular de levadura hasta que la concentración porcentual de la pared celular de levadura se ajusta a un 15% en peso, en la que la pared celular de levadura se obtiene de *Saccharomyces cerevisiae* por medio de autólisis y separación. Se añade ácido sulfúrico diluido hasta que el valor de pH de la pared celular de levadura se ajusta a 8,0, y luego la pared celular de levadura ajustada se calienta hasta una temperatura de 135°C y se mantiene durante 0,5 h. La temperatura de la pared celular de levadura se ajusta a 50°C, se añade proteasa alcalina con una concentración porcentual de un 0,2% en peso para tratar la pared celular de levadura durante 2 h, se lleva a cabo el tratamiento de calentamiento hasta 90°C para destruir la enzima, y luego la suspensión obtenida se centrifuga mientras que la fuerza centrífuga es de 5000 g para recoger el sobrenadante. El valor de pH del sobrenadante se ajusta a 6,0 con ácido fosfórico diluido.

ES 2 676 648 T3

Se concentra a vacío el sobrenadante ajustado con un concentrador multiefecto hasta que la concentración porcentual de sustancia seca del mismo es un 10% en peso, se enfría con agua helada hasta que su temperatura es de 10°C en el tanque de almacenamiento, se mantiene a la temperatura durante 20 horas y se centrifuga para eliminar la precipitación

5 El sobrenadante centrifugado se separa por membrana con membranas cerámicas que tienen un MWCo de 300 kD y luego se recoge el filtrado y se seca por pulverización para obtener un producto de manoproteína de levadura.

10 El producto es la muestra 3.

Ejemplo 4

15 Se añade agua desionizada a la pared celular de levadura hasta que la concentración porcentual de la pared celular de levadura se ajusta a un 10% en peso, en la que la pared celular de levadura se obtiene de *Saccharomyces cerevisiae* por medio de autólisis y separación. Se añade ácido clorhídrico diluido hasta que el valor de pH de la pared celular de levadura se ajusta a 8,0, y luego la pared celular de levadura ajustada se calienta hasta una temperatura de 110°C y se mantiene durante 3 h.

20 La temperatura de la pared celular de levadura se ajusta a 50°C, se añade proteasa alcalina con una concentración porcentual de un 0,2% en peso para tratar la pared celular de levadura durante 10 h, se lleva a cabo el tratamiento de calentamiento hasta 90°C para destruir la enzima y luego la suspensión obtenida se centrifuga mientras que la fuerza centrífuga es de 7000 g para recoger el sobrenadante.

25 El valor de pH del sobrenadante se ajusta a 5,0 con ácido clorhídrico diluido. Se concentra a vacío el sobrenadante ajustado con un concentrador multiefecto hasta que la concentración porcentual de sustancia seca del mismo es un 40% en peso, se enfría con agua helada hasta que su temperatura es de 10°C en el tanque de almacenamiento, se mantiene a la temperatura durante 10 horas y se centrifuga para eliminar la precipitación

30 El sobrenadante centrifugado se separa por membrana con membranas de fibra hueca que tienen un MWCo de 400 kD, y luego se recoge el filtrado y se seca por pulverización para obtener producto de manoproteína de levadura.

El producto es la muestra 4.

35 La tabla sobre los datos de cada componente en las muestras obtenidas, tales como el contenido de masa porcentual y el peso molecular se muestra de la siguiente manera:

| | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 4 |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Contenido en manano | 42% | 53% | 41% | 48% |
| Contenido en proteínas | 19% | 14% | 21% | 16% |
| Peso molecular | 167893 | 174873 | 226775 | 298441 |

40

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un producto de manoproteína de levadura que comprende las siguientes etapas:

- 5 1) ajustar el valor de pH de la pared celular de levadura a 7,0-10,0, y tratar térmicamente la pared celular de levadura en un intervalo de temperatura de 80°C-135°C;
- 10 2) ajustar la temperatura de la pared celular de levadura tratada en la etapa 1) a 30°C-70°C, añadir una proteasa alcalina para tratar la pared celular de levadura, y centrifugar la suspensión obtenida para recoger el sobrenadante;
- 15 3) mantener el sobrenadante obtenido en la etapa 2) a una temperatura baja de 0°C-20°C durante 1-20 h y centrifugarlo para eliminar el precipitado;
- 20 4) separar por membrana el sobrenadante obtenido en la etapa 3) con una membrana que tiene un valor límite de peso molecular de 200-400 kD, y recoger y secar por pulverización el filtrado para obtener el producto de manoproteína de levadura;
- en el que la etapa siguiente está comprendida además en dicha etapa 3): ajustar el valor de pH de dicho sobrenadante a 3.0-6.0 antes de llevar a cabo una concentración a vacío.
- 25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de la pared celular de levadura se ajusta a un 5-15 % en peso en dicha etapa 1).
- 30 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la pared celular de levadura se trata térmicamente durante 0,5-5 h en dicha etapa 1).
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de la proteasa alcalina es de un 0,01-0,5 % en peso en dicha etapa 2).
- 35 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la pared celular de levadura se trata con la proteasa durante 2-15 h en dicha etapa 2).
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la siguiente etapa está comprendida además en dicha etapa 2): calentar la pared celular de levadura tratada con proteasa alcalina hasta una temperatura de 90°C para destruir la enzima.
- 40 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la fuerza centrífuga de la separación centrífuga es más de 5000 g en dicha etapa 2).
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la siguiente etapa está comprendida además en dicha etapa 3): concentrar a vacío dicho sobrenadante hasta que la concentración de sustancia seca del mismo es un 10-40 % en peso antes de llevar a cabo la precipitación a baja temperatura.
- 45 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el sobrenadante se separa con una membrana que tiene un valor límite de peso molecular de 400 kD en dicha etapa 4).