



Wirtschaftspatent

Erteilt gemaeß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

ISSN 0433-6461

(11)

0152 690

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 1/08

A 23 J 1/18

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

21) WP C 12 D / 207 951

(22) 20.09.78

(45) 09.12.81

- 71) INSTITUT FUER TECHNISCHE MIKROBIOLOGIE (ITM), 1017 BERLIN, ;DD;
 72) KRAATZ, KARL-HEINZ;BUETTNER, WERNER,DR.;SCHUSTER, EUGEN,DR.;DD;
 73) KRAATZ,KARL-HEINZ;BUETTNER, WERNER,DR.;SCHUSTER, EUGEN,DR.;DD;
 74) DIPL.-CHEM. BRIGITTE THOMAS, INSTITUT FUER TECHNISCHE MIKROBIOLOGIE (ITM), 1017
 BERLIN, ALT STRALAU 62

54) VERFAHREN ZUR REDUZIERUNG DES NUCLEINSAEUREGEHALTES MIKROBIELLER BIOMASSE

57)Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reduzierung des Nucleinsaeuregehaltes von Bakterien- oder Hefezellen zwecks Einsatz in der menschlichen Ernaehrung. Ziel der Erfindung ist es, aus Mikroorganismen solche Proteinprodukte zu gewinnen, die auf Grund ihres geringen Nucleinsaeuregehaltes in der menschlichen Ernaehrung Anwendung finden koennen,wobei der durch die Herabsetzung des Nucleinsaeuregehaltes bewirkte Proteinverlust so gering sein soll,dass ein oekonomisch interessantes Verfahren resultiert. Erfindungsgemaess wird das dadurch erreicht, dass mechanisch aufgeschlossene Biomasse mit hoher Trockensubstanz-Konzentration zwecks Herabsetzung der Proteaseaktivitaet thermisch denaturiert und auf den fuer die Nucleasewirkung geeigneten pH-Wert eingestellt wird.Der Abbau der Nucleinsauren erfolgt durch Inkubation der Mikroorganismensuspension in Gegenwart einer geeigneten Kombination niedriger Konzentrationen von Salzen und oberflaechenaktiven Substanzen. Das Verfahren ist auf Hefen und Bakterien anwendbar.Als oberflaechenaktive Substanzen werden anionische Tenside eingesetzt.Salze anorganischer und organischer Sauren sind in niedrigen Konzentrationen wirksam.

a) Titel der Erfindung

Verfahren zur Reduzierung des Nucleinsäuregehaltes mikrobieller Biomasse

b) Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reduzierung des Nucleinsäuregehaltes von Bakterien- oder Hefezellen zwecks Einsatz in der menschlichen Ernährung.

c) Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß der hohe Nucleinsäuregehalt von mikrobiellen Biomassen dem direkten Einsatz als Proteinquelle in der menschlichen Ernährung entgegensteht. Die mit der täglichen Nahrung aufgenommene Nucleinsäuremenge soll 2 Gramm nicht übersteigen (J.C. EDOZIEN et al., Nature 228 (1970) 180). Beim Einsatz von unbehandelten Hefen ist dieser Wert mit der Aufnahme von ca. 10 g Protein bereits erreicht. Um eine Einschränkung der Proteinaufnahme zu vermeiden, müssen durch geeignete Maßnahmen Proteinprodukte aus Hefen mit einem Protein-Nucleinsäure-Verhältnis von 40 - 80 gewonnen werden.

Für die Herabsetzung des Nucleinsäuregehaltes mikrobieller Biomassen sind chemische und enzymatische Methoden bekannt. Der Nachteil, der auf alle Mikroorganismen anwendbaren chemischen Methoden besteht in der Gefahr einer tiefgreifenden Proteinschädigung. Bei hohen und tiefen pH-Werten und erhöhter Temperatur, die für einen mit vertretbarer Ge-

schwindigkeit ablaufenden Nucleinsäureabbau erforderlich sind, treten hohe Proteinverluste durch Hydrolyse ein. Außerdem wird der ernährungsphysiologische Wert des Proteins durch teilweise Zerstörung von Aminosäuren und das Auftreten toxikologisch bedenklicher Substanzen herabgesetzt.

Die wesentlich schonenderen enzymatischen Methoden zum Nucleinsäureabbau sind bei Einsatz von Enzympräparaten ökonomisch zu aufwendig. Daher verdienen Verfahren unter Ausnutzung der zelleigenen Nucleasen der Mikroorganismen größte Aufmerksamkeit.

Die in den Ribosomen der Mikroorganismen lokalisierten Ribonucleasen sind in nativen Zellen gehemmt, können jedoch durch verschiedenartige chemische und physikalische Einwirkungen aktiviert werden, die mit einer Zerstörung der ribosomalen Struktur verbunden sind.

Bekannt ist die Aktivierung durch kurzzeitige Wärmeeinwirkung (Hitzeschock), die bei *Candida lipolytica* und *Candida utilis* erfolgreich zur Abtrennung der Nucleinsäuren eingesetzt wurde (S. OHTA et al., Appl. Microbiol. 22 (1971) 415). Diese Methode ist bei *Saccharomyces cerevisiae* schwer realisierbar (W.E. TREVELYAN, J. Sc. Fd. Agric. 29 (1978) 141). Allgemeiner anwendbar scheint die Aktivierung der latenten Nucleasen durch mechanische Zerstörung der Zellen zu sein. Sowohl in aufgeschlossenen Suspensionen von *Candida utilis* als auch von *Saccharomyces cerevisiae* läßt sich eine starke Nucleaseaktivität nachweisen.

Allerdings sinkt die Aktivität der Ribonuclease durch thermische Denaturierung und spezifische Inhibitoren während der Inkubation zum Zwecke der Nucleinsäureabtrennung relativ schnell ab, und ein weitgehender Nucleinsäureabbau wird nicht oder nur nach langen Reaktionszeiten erreicht.

Gleichzeitig anwesende zelleigene Proteasen bewirken hohe Proteinverluste.

Durch Zusatz von Salzen (NaCl , KCl , Na_2HPO_4 etc.) in Konzentrationen von 3 bis 5 % konnte M. LINDBLOM (Biotechnol. Bioeng. 16 (1974) 1123) die Inaktivierung der Nuclease vermeiden, wodurch ein sehr weitgehender Nucleinsäureabbau bereits in der kurzen Reaktionszeit von 20 - 30 Minuten erreicht werden kann.

Kurze Reaktionszeiten bewirken geringe Proteinverluste.

Nachteilig ist der hohe Salzeinsatz, der trotz Verwendung hoher Hefetrockensubstanzkonzentrationen von 10 % der Menge an gewinnbarem Proteinisolat gleichkommt oder sie sogar übersteigt.

In der DE-OS 2 504 512 wird ein Verfahren zur Gewinnung eines Proteinkonzentrates mit niedrigem Nucleinsäuregehalt aus einer Mikrobenzellmasse beschrieben, bei dem die aufgeschlossene Zellmasse in Gegenwart von 0,1 bis 20 Gewichts-%, besonders 1 bis 3 Gewichts-%, Salz im Bereich von 30 bis 70 °C und bei einem pH-Wert im Bereich von 5 bis 9 inkubiert und das Proteinkonzentrat sodann abgetrennt wird. Nach diesem Verfahren führt ein 5 %iger Salzzusatz zu einem guten NS-Gehalt bei gutem Protein/NS-Verhältnis. Bezüglich dieser beiden Kriterien ist bei ca. 3 % Salzzusatz die Grenze des ernährungsphysiologisch brauchbaren Proteinkonzentrates erreicht. Der Einsatz von 1 % Salz (Beispiel 3) liefert jedenfalls unbefriedigende Ergebnisse, die auch nicht der auf Seite 6, letzter Absatz der o. g. DE-OS angegebenen RNS-Verminderung von 75 % entsprechen. Unter diesem Gesichtspunkt ist die an gleicher Stelle erwähnte wesentliche Verminderung der Nucleinsäure bei Zusatz von 0,1 % Salz in keiner Weise belegt und auch nicht zu erwarten.

Es ist weiterhin bekannt (K. KITANO et al., J. Ferment. Technol. 48 (1970) 14), daß die Behandlung nicht aufgeschlossener Zellen von *Candida utilis* mit oberflächenaktiven Substanzen (OAS) zur Ausschüttung (Exkretion) von Nucleinsäu-

reabbauprodukten führt. Im Widerspruch dazu beschreibt C.G. KURLAND (J. Mol. Biol. 2 (1960) 83) eine vollständige Hemmung der ribosomalen Nuclease bei OAS-Konzentrationen oberhalb 0,1 %. Möglicherweise verhalten sich die Nucleasesysteme der Mikroorganismen verschieden.

Durch eine alkalische Proteinextraktion aus aufgeschlossener Mikroorganismensuspension und Abtrennen der Zellwandreste zwecks Erhöhung der Proteinausbeute und -reinheit tritt eine starke Schädigung des Nucleasesystems auf, so daß nur noch bei stark verdünnten Suspensionen mit langen Reaktionszeiten ein weitgehender Nucleinsäureabbau erzielt werden kann (LINDBLOM).

Die Nachteile der bekannten Verfahren zur Abtrennung von Nucleinsäuren aus Mikroorganismen unter Ausnutzung zelleigener Nucleasen bestehen entweder im Arbeiten mit stark verdünnten Hefesuspensionen bei langen Reaktionszeiten oder sehr hohen Salzeinsätzen.

Mit der nachstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Methode sind diese Nachteile behoben.

d) Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, aus Mikroorganismen Proteinprodukte in hoher Ausbeute mit so geringem Nucleinsäuregehalt zu gewinnen, daß ihr Einsatz für die menschliche Ernährung möglich wird.

e) Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den Nucleinsäureabbau in mikrobieller Biomasse mit zelleigenen Nucleasen so durchzuführen, daß trotz hohen Abbaugrades technisch vertretbare Proteinverluste auftreten.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß mechanisch aufgeschlossene Mikroorganismensuspension mit einem Trockensubstanzgehalt von 3 bis 15 % nach einer kurzzeitigen Hitzebehandlung

(30 bis 35 Sekunden bei 60 bis 80 °C) zum Zwecke der Proteaseinaktivierung durch Zugabe von Alkalien auf einen pH-Wert zwischen 5,5 und 8,0 eingestellt wird. Anschließend wird durch 20- bis 180 minütige Inkubation der Suspension bei Temperaturen von 45 bis 65 °C ein weitgehender Abbau der zelleigenen Nucleinsäuren erzielt. Erfindungsgemäß wird die Inkubation in Gegenwart von 0,01 bis 5 % einer anionischen oberflächenaktiven Substanz (OAS) und 0,1 bis 2,0 % Salz durchgeführt. Durch Zentrifugieren und Waschen können die Nucleinsäureabbauprodukte in bekannter Weise von der Biomasse abgetrennt werden, die den Hauptanteil des Proteins der eingesetzten Mikroorganismen enthält.

Um die günstige Wirkung der erfindungsgemäßen Kombination von Salz und OAS zu veranschaulichen, sei auf das Verhältnis Protein/Nucleinsäure von Produkten, die nur mit Hilfe einer Komponente erhalten wurden, hingewiesen.

3 % NaCl (DE-/S 2 504 512): Protein/NS 28

0,2 % SDS (eigene Ergebnisse): Protein/NS 26

Demgegenüber stehen bei der gemeinsamen Verwendung der Komponenten Werte von 40.

Bei Mikroorganismen mit geringer Protease- und gleichzeitig hoher Nucleaseaktivität kann der Thermoschock zur Proteaseinhibierung entfallen.

Wird der Abbau der Nucleinsäuren durch Inkubation aufgeschlossener Hefesuspensionen in Gegenwart von 0,01 bis 0,2 % OAS und 0,1 bis 1 % Salz (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ u. a.) vorgenommen, läßt sich aufgrund der dann zu beobachtenden Stabilität der Nuclease durch Verlängerung der Reaktionszeit eine sehr weitgehende Reduzierung des Nucleinsäuregehaltes erzielen (siehe Tabelle 1 und 2 und Beispiel 1).

f) Ausführungsbeispiele

Die beschriebene Erfindung soll durch folgende Beispiele erläutert werden:

Beispiel 1

100 g einer 10 g Hefetrockensubstanz enthaltenden Suspension aufgeschlossener Stellhefe I werden durch Zugabe von 0,1 N Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt und unter Zusatz von 0,5 g NaCl und 0,1 g Natriumdodecylsulfat 30 Minuten bei 55 °C inkubiert.

Das durch Zentrifugieren und Waschen mit Wasser erhaltene Sediment hat ein Trockengewicht von 5,95 g.

Proteingehalt: 60,8 %; Nucleinsäuregehalt: 1,4 %; Reinproteinausbeute: 86 %; Protein/Nucleinsäure-Verhältnis: 40 : 1

Beispiel 2

100 g einer 10 g Hefetrockensubstanz enthaltenden Suspension mechanisch aufgeschlossener und denaturierter Stellhefe I werden unter Zusatz von 0,5 g NaCl und 0,25 g Naddodecylsulfonat-1 30 Minuten bei 56 °C inkubiert.

Nach dem Zentrifugieren und Waschen mit Wasser wird ein Sediment mit einem Trockengewicht von 5,60 g erhalten.

TS-Ausbeute: 56 %

Protein-Gehalt: 60,5 %

NS-Gehalt: 1,3 %

Reinprotein-Ausbeute: 84 %

Protein/NS-Verhältnis: 46 : 1

Beispiel 3

100 g einer 10 %igen HTS-Suspension mechanisch aufgeschlossener und denaturierter Backhefe werden wie im Beispiel 2 mit 0,5 g NaCl und 0,30 g Na-3-äthoxy-n-dodecylsulfonat-1 30 Minuten bei 58 °C inkubiert, zentrifugiert und gewaschen.

TS-Ausbeute: 55,1 %

Protein-Gehalt: 59,8 %

NS-Gehalt: 1,5 %

Reinprotein-Ausbeute: 78,2 %

Protein/NS-Verhältnis: 40 : 1

Tabelle 1

Vergleich der Nucleaseaktivität von Suspensionen aufgeschlossener Backhefe (ca. 5 % Hefetrockensubstanz) mit verschiedenen Zusätzen

Zusatz	Nucleaseaktivität in %	
	vor der Inkubation	nach der Inkubation
3 % NaCl	100	100
0,5 % NaCl	60	60
0,1 % SDS	83	50
0,1 % SDS + 0,5 % NaCl	100	100
-----	65	35

Bestimmung der Nucleaseaktivität

Zu 1 ml Ribonucleinsäure enthaltenden Acetatpuffer (1,5 mg RNS pro 1 ml 0,2 N Acetatpuffer, pH 5,6) werden 50 μ l der aufgeschlossenen Hefesuspension gegeben. Die Inkubation erfolgt 15 Minuten bei 50 °C. Die Reaktion wird durch Abkühlen der Proben und Zugabe von 1 ml Fällungsreagenz (0,4 % $\text{UO}_2(\text{OCOCH}_3)_2$ in 12 %iger Perchlorsäure) beendet. Die Proben werden zentrifugiert und 1 ml des Überstandes mit 9 ml Wasser verdünnt.

Die Messung der Extinktion der verdünnten Proben erfolgt bei 260 nm gegen eine Blindprobe, die in gleicher Weise wie die Meßprobe behandelt wird, nur daß anstelle der RNS-Lösung 1 ml Wasser eingesetzt wird.

Tabelle 2

Abtrennung der Nucleinsäuren durch Inkubation von Suspensionen mechanisch aufgeschlossener Hefen in Gegenwart von anionischen Tensiden (Na-n-dodecylsulfat-1, Na-n-dodecylsulfonat-1 und Na-3-äthoxy-n-dodecylsulfonat-1) und Natriumchlorid

anion. Tensid.	NaCl (%)	eingesetz- te Hefe	Vorbehandlg. mech. aufge- schl. Hefe	pH	Temp. (°C)	Zeit (min)	extrahierte Hefeinhaltsstoffe	
							(% d. einges. Menge)	Protein
							NS	
SDS	0,25	0,5	Stellhefe I	7,5	55	30	92	14
1 x)	0,25	0,5	"	35 sek, 70°C	56	30	93	16
2 xx)	0,30	0,5	Backhefe	"	58	30	93,5	21,8

1 x) Na-n-dodecylsulfonat-1

2 xx) Na-3-äthoxy-n-dodecylsulfonat-1

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Reduzierung des Nucleinsäuregehaltes mikrobieller Biomasse durch mechanischen Aufschluß der Biomasse, thermische Denaturierung, Einstellung des pH-Wertes auf 5,5 bis 8 durch Zugabe von Alkalien, Zusatz von Salzen in Mengen von 0,1 bis 2,0 %, Inkubation bei Temperaturen von 45 bis 65 °C und Gewinnung des Proteinproduktes sowie der Nucleinsäureabbauprodukte, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubation in Gegenwart von Salzen und 0,01 bis 5,0 % einer anionischen oberflächenaktiven Substanz durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als oberflächenaktive Substanzen n-Alkylsulfate und n-Alkylsulfonate verwendet werden.