

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144826 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(21) Ansøgning nr. 3209/76

(51) Int.Cl.³ C 12 N 1/20

(22) Indleveringsdag 15. jul. 1976

(24) Løbedag 15. jul. 1976

(41) Alm. tilgængelig 17. jan. 1977

(44) Fremlagt 14. jun. 1982

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 16. jul. 1975, 29841/75, GB

(71) Ansøger IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, London SW1P 4QG, GB.

(72) Opfinder David Charles Steer, GB: Hugh Lewis Williams, GB.

(74) Fuldmægtig Firmaet Chas. Hude.

(54) Fremgangsmåde til behandling af
bakterieceller for at reducere
nukleinsyreindholdet deraf.

DK 144826 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til behandling af bakterieceller for at reducere nukleinsyreindholdet deraf.

5 Enkeltcelleprotein, der kan fås ved dyrkning af bakterier ved kontinuerlig forgæring, indeholder i reglen en større mængde nukleinsyrer, end der er indeholdt i størstedelen af andre næringsmidler og foderstoffer. Til nogle potentielle anvendelser af enkeltcelleprotein kan der være en fordel ved at reducere dette høje nukleinsyreniveau i
10 nogen grad.

Foreslåede fremgangsmåder til fjernelse af nukleinsyrer fra enkeltcelleprotein indebærer hyppigt mekanisk sprængning af cellerne. Denne operation gør det muligt, at nukleinsyrerne kan opløses ud af cellen, idet man udnytter
15 forskellige opløselighedsegenskaber af nukleinsyrer sammenlignet med protein. F.eks. er der i "The Nucleic Acids", bind 1, redigeret af E.Chargaff & J.N.Davidson, Academic Press 1955, side 391, beskrevet en fremgangsmåde til adskillelse og udvinding af ribonukleinsyre (som normalt udgør
20 størstedelen af nukleinsyrerne i enkeltcelleprotein), som indebærer fragmentering af cellerne under anvendelse af en våd knusemølle, efterfulgt af ekstraktion med varme saltopløsninger. Varme saltopløsninger har den fordel at formindske proteinopløselighed, medens de er gode opløsningsmidler for nukleinsyrer.
25

I dansk patentskrift nr. 140.559 er beskrevet en fremgangsmåde til adskillelse af bakterieceller fra et vandigt medium, hvori cellerne flokkuleres ved at opvarme mediet til en temperatur i intervallet 50 - 200°C og derefter nedsætte
30 pH-værdien af mediet til en værdi i intervallet 2-5, hvorefter de flokkulerede celler skilles fra mediet.

Det har nu vist sig, at fremgangsmåden ifølge dansk patent-skrift nr. 140.559 kan tilpasses til at give en fremgangs-måde, ved hvilken enkeltcelleprotein med nedsat nuklein-syreindhold kan fremstilles.

- 5 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at et vandigt medium indeholdende bakteriecellerne underka-
stes trinene (A) behandling med en syre for at nedsætte
pH-værdien til en værdi i intervallet 2 - 5 og (B) opvarm-
ning til en temperatur i intervallet 60-100°C, idet trin
10 (A) og (B) udføres i vilkårlig rækkefølge eller samtidig,
og derefter (C) behandling med et alkali for at hæve me-
diets pH-værdi til en værdi i intervallet 6 - 10, medens
temperaturen af mediet holdes på en værdi på mindst 60°C,
hvorefter cellerne skilles fra mediet.
- 15 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen reduceres nukleinsyre-
indholdet af bakteriecellerne, uden at der benyttes mekanisk
fragmentering af cellerne, hvilket er uønsket. Det antages, at
det gode resultat opnås af følgende grund. Varmen og syrebe-
handlingen, efterfulgt af alkalibehandling, gør cellerne per-
20 meable for nukleinsyrer, muligvis ved at fjerne dele af de
ydre lag af cellevæggene. Nukleinsyrerne trænger gennem
de svækkede cellevægge ind i det omgivende medium, og nuk-
leinsyreindholdet af cellerne reduceres derved. Når celler-
ne skilles fra mediet, er de adskilt fra nukleinsyrerne deri.
- 25 Fremgangsmåden er meget egnet til behandling af bakterie-
celler af slægterne *Pseudomonas*, *Alcaligenes* og *Bacillus*,
f.eks. stammer af arterne *Pseudomonas fluorescens*, *Pseu-*
domonas aeruginosa, *Pseudomonas diminuta*, *Alcaligenes fae-*
calis, *Bacillus cereus* og især *Pseudomonas methylotropha*.
- 30 Sidstnævnte er en art, hvis egenskaber er beskrevet i dansk
patentskrift nr. 131.382. Kulturer af nogle stammer af denne
sidstnævnte art er blevet deponeret og er til rådighed fra

The National Collection of Industrial Bacteria (NCIB),
Torry Research Station, Aberdeen, Skotland, og tilsvaren-
de deponeringer er foretaget i samlingerne i US Department
of Agriculture (NRRL) i Peoria, Illinois, og The Fermen-
tation Research Institute (FRI) i Japan. De numeriske be-
5 tegnelser for disse kulturer er følgende:

NCIB numrene 10508-15 og 10592-6

NRRL " B 5352-64

FRI " FERM 1215 - 27.

10 Andre bakteriearter, der kan behandles ved fremgangsmåden,
er *Pseudomas rosea*, *Microcylus polymorphum* og *Hyphomicro-*
bium variabile. Egenskaberne af disse arter er også anført
i dansk patentskrift nr. 131.382, og kulturer af nogle stam-
mer er blevet deponeret på de ovennævnte steder og er til-
15 gængelige fra NCIB. De numeriske betegnelser for disse
sidstnævnte kulturer er følgende:

NCIB numrene 10516-7 og 10597-612

NRRL " B 5381-2 og B 5365-80

FRI " FERM 1228-45.

20 Ved udførelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan al-
kalibehandlingstrinet (ved hvilket mediets pH-værdi hæves
til en værdi i intervallet 8 til 11 ved behandling med et
alkali) i fremgangsmåden ifølge dansk patentskrift nr. 140.559
udføres før opvarmning og behandling med syre uden nogen ulem-
25 per.

Under opvarmning af mediet (trin B) hæves temperaturen for-
trinsvis til 70 - 90°C. Syrebehandlingen (trin A) nedsæt-
ter fortrinsvis pH-værdien til en værdi i intervallet 2,5
- 4,5. Den påfølgende behandling med et alkali (trin C)
30 hæver fortrinsvis pH-værdien til en værdi i intervallet
6 - 8. Før behandling med alkali (trin C) bliver mediet
både opvarmet og holdt ved den lavere pH-værdi, hensigts-

mæssigt i en periode på mindst 1 minut, fortrinsvis 2 - 10 minutter.

5 Efter at have holdt mediet ved en forhøjet temperatur og nedsat pH-værdi i en periode skal temperaturen holdes på mindst 60°C under alkalibehandlingen. Det er fordelagtigt at fjerne noget af mediet før behandling med alkali for at nedsætte udgifterne til behandlingen.

10 Syren, der anvendes til at behandle mediet, kan hensigtsmæssigt være en uorganisk syre såsom svovlsyre, saltsyre eller phosphorsyre eller en sur gas såsom carbondioxid eller svovldioxid. Når fremgangsmåden udgør et trin i en samlet fremgangsmåde til fremstilling af enkeltcelleprote-
15 in, er syren fortrinsvis en blanding af phosphorsyre og svovlsyre i passende mængdeforhold til, at mediet efter fraskillelse af flokkulerede celler kan recirkuleres til processens forgæringstrin. Efter syrning og opvarmning foretrækkes det, at behandling med alkali skal være så mild som mulig for at formindske opbrydningen af de store flokke,
20 der dannes under syrningen og varmebehandlingen. Egnede alkalier indbefatter natriumhydroxid, calciumhydroxid, natriumcarbonat og ammoniak.

Til behandling ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen indeholder mediet fortrinsvis 0,05 - 2% w/v af et salt, hen-
25 sigtsmæssigt natriumchlorid eller ammoniumphosphat.

Efter behandling med alkali kan fraskillelse af flokkulerede celler bevirkes på sædvanlig måde såsom ved centrifugering eller filtrering eller ved flotation.

Opfindelsen illustreres af følgende eksempler.

30 EKSEMPEL 1.

En 10% suspension af flokkulerede celler af en organisme

af arten *Pseudomonas methylotropha*, dannet som beskrevet i dansk patent nr. 140.559, blev derefter behandlet som følger:

- 5 50 g natriumchlorid blev sat til 5 liter medium, og pH-værdien blev hævet fra 4,3 til 7,0 under anvendelse af fortyndet natriumhydroxidopløsning. Temperaturen blev hævet til 80°C og holdt i 5 minutter. Det behandlede medium blev blandet med 35 liter varmt vand; SCP blev udvundet ved centrifugering. SCP blev tørret i en vakuumovn ved 50°C.
- 10 Analysen af den behandlede prøve er vist i tabel 1, hvori resultaterne er sammenlignet med resultaterne for en lignende prøve af flokkulerede celler, som ikke var blevet behandlet for at reducere nukleinsyren. Af tabellen kan det ses, at nukleinsyreindholdet af den behandlede prøve er me-
- 15 get lavere.

Tabel 1

Analyse	Behandlet prøve % w/w	Ubehandlet prøve % w/w
Tab ved 105°C	2,9%	4,4%
Aske ved 550°C	3,1%	8,3%
Total P	0,8%	2,6%
Total S	0,2%	0,99%
Total Cl	0,64%	< 0,02%
Total Ca	0,18%	0,12%
Total Na	0,38%	1,13%
Total K	0,02%	0,22%
Ammoniak N ₂	0,006%	0,05%
Total N ₂	13,4%	13,0%
Nukleinsyre	1,8%	14,7%
Total syre	6,8%	5,9%
Total anhydroaminosyrer	69,9%	57,3%
Aspartinsyre	8,3%	7,2%
Threonin	4,3%	3,7%
Serin	3,2%	2,7%
Glutaminsyre	10,2%	8,4%
Prolin	3,3%	2,7%
Glycin	4,9%	4,2%
Alanin	6,6%	5,6%
Valin	5,7%	4,5%
Methonin	2,6%	2,0%
Isoleucin	4,7%	3,8%
Leucin	7,5%	5,8%
Tyrosin	3,1%	2,6%
Phenylalanin	3,7%	2,9%
Histidin	1,9%	1,6%
Lysin	6,4%	5,4%
Arginin	5,1%	4,0%

Analyse af prøver af *Pseudomonas methylotropha* med og uden behandling for at reducere nukleinsyren.

EKSEMPEL 2.

Syv kulturer, hver af en af stammerne *Pseudomonas methylo-*
trophia ASI (NCIB 10515), *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomo-*
nas aeruginosa, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas al-*
caligenes, *Alcaligenes faecalis* og *Bacillus cereus*, blev
5 dyrket i rysteflasker til dannelse af 1 liter kultur. Hver
kultur blev delt i to dele, og den ene del blev fortyndet
med et lige så stort rumfang vand, centrifugeret og tørret
i en vakuumovn ved 50°C. Denne del dannede kontrollen. Den
anden del blev opvarmet til 80°C med 1% w/v Na Cl tilsat.
10 pH-værdien blev så nedsat til 4 i 10 minutter, og derefter
blev kulturen genneutraliseret i 5 minutter, fortyndet til
sit dobbelte rumfang, centrifugeret og tørret i en vakuum-
ovn ved 50°C. Der blev foretaget nukleinsyrebestemmelser.
Resultaterne er anført i tabel 2.

15

Tabel 2

Stamme	Nukleinsyreindhold i kontrol (% w/w)	Nukleinsyreindhold i forsøgskultur (% w/w)
P.methylo-trophia AS-1	10,1	3,5
20 P.diminuta	9,2	3,9
P.aeruginosa	7,1	7,0
P.fluorescens	11,7	4,7
P.alcaligenes	11,6	4,9
Alcaligenes faecalis	10,3	6,2
25 Bacillus cereus	4,5	2,2

EKSEMPEL 3.

To kulturer, en af en *Ps.fluorescens* og en af en *Ps.alcali-*
genes stamme, blev behandlet som i eksempel 2 med undtagel-

se af, at tilsætningen af Na Cl blev udeladt. Resultaterne var som følger:

	Nukleinsyreindhold i kontrol (% w/w)	Nukleinsyreindhold i forsøgskultur (% w/w)
Ps.fluorescens	10,9	7,0
5 Ps.alcaligenes	9,3	4,8

Patentet angår ikke fremgangsmådens anvendelse ved tilvirkning af næringsmidler.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til behandling af bakterieceller for at re-
10 ducere nukleinsyreindholdet deraf, k e n d e t e g n e t ved, at et vandigt medium indeholdende baktericellerne underkastes trinene (A) behandling med en syre for at nedsætte pH-værdien til en værdi i intervallet 2 - 5 og (B) opvarmning til en temperatur i intervallet 60-100°C, idet
15 trin (A) og (B) udføres i vilkårlig rækkefølge eller samtidig, og derefter (C) behandling med et alkali for at hæve mediets pH-værdi til en værdi i intervallet 6 - 10, medens temperaturen af mediet holdes på en værdi på mindst 60°C, hvorefter cellerne skilles fra mediet.
- 20 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at bakteriecellerne er af arten *Pseudomonas methylo tropha*.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 og 2, k e n d e t e g n e t ved, at mediets pH-værdi hæves til en værdi i intervallet 8 - 11 ved behandling med et alkali før trin (A) og/eller
25 trin (B).

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at temperaturen under trin (B) hæves til en værdi i intervallet 70 - 90°C.
- 5 5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pH-værdien af mediet under trin (A) sænkes til en værdi i intervallet 2,5 - 4,5.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pH-værdien af mediet under trin (C) hæves til en værdi i intervallet 6 - 8.
- 10 7. Fremgangsmåde ifølge et af de foregående krav, k e n - d e t e g n e t ved, at mediet før behandlingen med alkali i trin (C) opvarmes som i trin (B) og holdes ved en lavere pH-værdi som i trin (A) i en periode fra 2 til 10 minutter.
- 15 8. Fremgangsmåde ifølge et af de foregående krav, k e n - d e t e g n e t ved, at mediet indeholder 0,05% - 2% w/v af et salt.

Fremdragne publikationer:

DE offentliggørelsesskrift nr. 2445254.