(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 029 077**

(51) Int. CI.:

C12N 1/06 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2022 PCT/EP2022/069504**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2023 WO23285480**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2022 E 22748352 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2025 EP 4370650**

(54) Título: **Método para el aislamiento de proteínas y sacáridos de levadura**

(30) Prioridad:

12.07.2021 EP 21185098

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2025

(73) Titular/es:

YEASTUP AG (100.00%)
Badenerstrasse 13
5200 Brugg, CH

(72) Inventor/es:

RIEDL, WOLFGANG y
VERPOORTEN, RUDI

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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 el aislamiento de proteínas y sacáridos de levadura

Campo técnico

La invención se refiere a un método de descomposición de levaduras, en particular levaduras de cerveza, para aislar proteínas y sacáridos.

Estado de la técnica

Las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen por gemación o división y siempre han tenido una gran importancia técnica. Por ejemplo, las levaduras se utilizan en la producción de cerveza, vino, licores, alimentos y sustancias terapéuticas. Básicamente existen varios tipos de levadura, siendo la denominada levadura de panadería o de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) una de las más utilizadas. De esta manera se producen grandes cantidades de subproductos que contienen levadura y, sobre todo, levadura de cerveza.

Dado que las paredes celulares de las levaduras en particular contienen una serie de biomoléculas técnicamente utilizables, como proteínas, glucanos, mananos, quitinas y lípidos, los desechos que contienen levadura se procesan para obtener estas sustancias. Las paredes celulares de la levadura se abren parcial o completamente para liberar las sustancias de interés.

El documento EP 1 990 419 A1 (Tex-a-tec AG) por ejemplo, describe un proceso para aislar glucano, proteínas, mananos y lípidos de la levadura, mediante el cual la levadura se trata con ultrasonidos en pasos sucesivos a temperaturas crecientes.

El documento EP 2 272 876 A1 (Angel Yeast Co., Ltd.) divulga un proceso para extraer glucano y manano de la pared celular de microorganismos como la levadura 8440. El método comprende los pasos de: a) tratar las células del microorganismo con una proteasa alcalina y una mananasa; b) separar la mezcla del paso a) en una fase pesada y una fase ligera; c) secar la fase pesada obtenida del paso b) para obtener una preparación de glucano; y d) secar la fase ligera obtenida del paso b) para obtener la preparación de manano. Las preparaciones de glucano y manano están destinadas a aplicaciones terapéuticas.

El documento WO 2010/070207 A1 (Glykos Finland Oy) describe un proceso para preparar una composición inmunoestimulante que comprende una fracción de sacárido, comprendiendo el proceso los pasos de hidrolizar células de levadura y obtener una fracción soluble. La fracción sacárida así obtenida puede incorporarse como componente alimentario o de bebida o utilizarse como producto farmacéutico.

Sin embargo, los métodos conocidos hasta la fecha para aislar biomoléculas técnicamente utilizables a partir de levaduras no son del todo convincentes, especialmente en enfoques a gran escala. La relación entre el rendimiento y el esfuerzo, sobre todo en términos de requisitos de energía y tiempo, es insatisfactoria en muchos procesos, lo que hace muy difícil una producción rentable.

Otros métodos tienen como objetivo la extracción selectiva de componentes individuales (por ejemplo, glucano o manano), mientras que los demás componentes (por ejemplo, proteínas) se ignoran, como en el caso de los métodos descritos en los documentos EP0950716 (Farmint Group Holding SA) o WO2006/121803 (Sensient Flavors Inc). Esto es una desventaja en cuanto al uso más completo posible de los subproductos que contienen levadura.

Por tanto, sigue siendo necesario encontrar soluciones mejoradas que superen al menos parcial o totalmente las desventajas mencionadas.

Descripción de la invención

El objetivo de la invención es proporcionar un método mejorado para la obtención de biomoléculas a partir de células de levadura, en particular células de levadura de cerveza. En particular, se deberían poder aislar simultáneamente varias biomoléculas diferentes con el mayor rendimiento y pureza posibles, especialmente proteínas, glucanos y mananos. El proceso también debería permitir la extracción más eficiente de biomoléculas en enfoques a gran escala. Es deseable que el proceso pueda llevarse a cabo con el menor gasto posible de energía y tiempo.

La solución al problema se define por las características de la reivindicación 1. El núcleo de la invención es, por tanto, un proceso de descomposición de levaduras, en particular levadura de cerveza, para aislar proteínas y sacáridos, que comprende los pasos:

a) provisión de una suspensión de levadura, en particular una suspensión de levadura de cerveza;

b) alteración física de la levadura en la suspensión de levadura;

c) microfiltración de la suspensión de levadura descompuesta del paso b);

d) ultrafiltración del permeado de la microfiltración del paso c), para separar como retenido de la ultrafiltración una fase con proteínas como componente sólido principal;

e) tratamiento del retenido de la microfiltración del paso c) con una proteasa en condiciones básicas y separación posterior de una fase con manano como componente sólido principal, en particular mediante filtración y/o centrifugación;

f) tratamiento de la fase retenida en el paso e) sucesivamente primero en condiciones básicas y luego en condiciones ácidas y separación posterior de una fase con glucano como componente sólido principal, en particular mediante filtración y/o centrifugación.

Se ha demostrado sorprendentemente que la combinación según la invención de pasos de tratamiento físico, químico y bioquímico permite obtener buenos rendimientos con requisitos de energía y tiempo relativamente bajos. Esto se aplica a todos los productos, es decir, proteínas, glucanos y mananos, con lo que se pueden conseguir rendimientos de hasta aproximadamente un 40 % para estas sustancias con una alta pureza.

El proceso también es adecuado para aplicaciones técnicas a gran escala. Se pueden procesar sin problemas decenas de miles de toneladas de suspensión de levadura al año o varios miles de kilogramos de suspensión de levadura por hora.

Los "glucanos" son oligo o polisacáridos compuestos por moléculas de D-glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos. Los glucanos tal como se encuentran en las células de levadura son típicamente betaglucanos, que tienen un enlace β-glucosídico, en particular β-1,3-glucano.

Los "mananos" son polisacáridos que son polímeros del azúcar manosa. Los mananos que se encuentran en la levadura suelen tener una estructura principal unida por enlaces α(1-6) y cadenas laterales unidas por enlaces α(1-2) y α(1-3) que tienen en promedio una longitud de aproximadamente dos unidades de azúcar. “Microfiltración” significa un proceso de filtración a través de un medio filtrante, en particular una membrana, con un tamaño de poro ≥ 0,1 µm. Por el contrario, el tamaño de poro en la ultrafiltración es inferior a 0,1 µm.

A menos que se indique lo contrario, el "contenido sólido" se refiere a la masa seca del componente respectivo. El término "componente sólido principal" se refiere al componente de los sólidos con mayor proporción en peso.

La suspensión de levadura proporcionada en el paso a) es en particular una suspensión de levadura almacenada a una temperatura de 0 a 15 °C, preferiblemente 2 a 12 °C, en particular 3 a 7 °C o 5 °C y/o una suspensión de levadura pasteurizada. Esto garantiza que la suspensión contenga la menor cantidad posible de subproductos no deseados.

En principio, la suspensión de levadura prevista en el paso a) también puede ser una suspensión de levadura almacenada a una temperatura diferente, en particular temperatura ambiente, y no pasteurizada.

La suspensión de levadura es, en particular, una suspensión de levadura acuosa. El agua está presente como una fase líquida continua de la suspensión de levadura.

La suspensión de levadura es en particular una suspensión de levadura de cerveza, que contiene preferiblemente levadura de cerveza usada. Estas suspensiones de levadura de cerveza surgen, por ejemplo, como subproductos en la producción de cerveza y se pueden utilizar directamente en el método según la invención.

La suspensión de levadura tiene preferiblemente un contenido de sólidos de 5 a 30 % en peso, en particular 7 a 20 % en peso, con respecto al peso total de la suspensión de levadura. Esto ha demostrado ser especialmente adecuado para el método según la invención. Si es necesario, el contenido de sólidos de la suspensión de levadura se puede ajustar al rango deseado con líquido, especialmente agua.

En el paso a), la suspensión de levadura tiene una temperatura de en particular 0 a 15 °C, preferiblemente 2 a 12 °C, en particular 3 a 7 °C o 5 °C. Esto garantiza que la composición de la suspensión no cambie más, por ejemplo, debido a las células de levadura activas, o que se reduzca la formación de subproductos no deseados.

Además, preferiblemente, el paso b) y opcionalmente también los pasos c) y d) se llevan a cabo a una temperatura de 0 a 15 °C, preferiblemente 2 a 12 °C, en particular 3 a 7 °C o 5 °C. Esto reduce aún más la formación de subproductos no deseados.

En principio, la suspensión de levadura en los pasos a), b), c) y/o d) también puede tener una temperatura

diferente, por ejemplo, la temperatura ambiente.

Según una forma de realización ventajosa, la suspensión de levadura proporcionada se somete a un proceso de lavado antes del paso b), en el que al menos una parte de la fase líquida de la suspensión de levadura, en particular al menos el 50 % en peso, en particular al menos el 60 % en peso, de la fase líquida de la suspensión de levadura, se sustituye por un líquido adicional o un líquido de sustitución, en particular agua. El proceso de lavado se lleva a cabo preferiblemente en una centrífuga o en un filtro de tambor.

El proceso de lavado puede utilizarse para reducir la proporción de componentes no deseados disueltos en el líquido, si es necesario, mejorando así la pureza y la calidad de las sustancias que se van a aislar. Sin embargo, el proceso de lavado es opcional y puede omitirse.

La desintegración física en el paso b) se lleva a cabo en particular mediante campos eléctricos, en un homogeneizador o en un molino de cuerpos de molienda, en particular en un molino de bolas.

El homogeneizador es en particular un homogeneizador de alta presión, que funciona en particular con una presión de más de 1000 bar, especialmente más de 1200 bar.

En un molino de cuerpos de molienda, el material que se va a moler y los cuerpos de molienda que se mueven libremente, especialmente bolas, circulan en una cámara de proceso. Esto produce colisiones entre los cuerpos de molienda, las paredes de la cámara de proceso y el material que se va a moler. La trituración del material que se va a moler se consigue principalmente mediante trituración.

En este caso, la desintegración con un molino de cuerpos de molienda, en particular un molino de bolas, ha demostrado ser especialmente ventajosa, ya que las proteínas que se quieren aislar se pueden liberar de forma suave pero eficaz. Esto se aplica en particular a las suspensiones de levadura de cerveza. Sin embargo, para aplicaciones especiales, también se pueden utilizar otros métodos de descomposición física.

La descomposición física por campos eléctricos en el paso b) puede llevarse a cabo en particular mediante campos eléctricos pulsados (también conocidos como PEF o "*Pulsed Electric Fields*"). Esta técnica de descomposición es conocida por la persona experta en la materia en otros contextos.

En el tratamiento mediante campos eléctricos pulsados, la suspensión de levadura se coloca entre dos electrodos y se trata con campos eléctricos pulsados. Los campos eléctricos pulsados se caracterizan especialmente por intensidades de campo elevadas y corta duración. Esto produce una formación de poros reversible o irreversible en las membranas celulares, lo que permite que se liberen componentes intracelulares y/o que sustancias extracelulares penetren en las células.

En este caso, los siguientes parámetros han demostrado ser especialmente adecuados para controlar la desintegración de la levadura en la suspensión de levadura: la intensidad del campo eléctrico [kV/cm], la temperatura de entrada de la suspensión de levadura [°C] y la entrada de energía específica [kJ/l]. El aporte energético es la energía requerida para el proceso en kilojulios por litro de suspensión de levadura. Además, la entrada de energía se puede controlar a través de la frecuencia de los pulsos [Hz], que a su vez depende del flujo y se controla automáticamente en los sistemas conocidos.

La intensidad del campo eléctrico es preferiblemente de 1 a 30 kV/cm, en particular de 5 a 24 kV/cm.

El aporte de energía específica es preferiblemente de 1 a 180 kJ/l, en particular de 3 a 120 kJ/l.

La temperatura de entrada de la suspensión de levadura es preferiblemente de 0 a 15 °C, más preferiblemente de 2 a 12 °C, en particular de 3 a 7 °C o 5 °C.

Con estos parámetros, la levadura en la suspensión de levadura se puede descomponer eficazmente.

Existen sistemas disponibles comercialmente para realizar la descomposición física de células mediante campos eléctricos pulsados de diversos proveedores, como el sistema PEF Pilot Dual (Elea-Technology; Alemania).

El tratamiento con campos eléctricos pulsados se realiza preferiblemente después de un postratamiento mecánico. Por lo tanto, este preferiblemente tiene lugar entre los pasos b) y c).

El postratamiento mecánico puede realizarse en particular mediante un mezclador, preferiblemente con fuerzas de cizallamiento elevadas. Un mezclador de rotor-estator, especialmente un mezclador de rotor-estator en línea, es especialmente adecuado. En un mezclador de rotor-estator en línea, el rotor y el estator normalmente están contenidos en una carcasa con una entrada en un extremo y una salida en el otro extremo. La suspensión de levadura a tratar puede ser aspirada a través del mezclador en un flujo continuo.

La velocidad de corte durante el postratamiento mecánico con un mezclador se selecciona de tal manera que las células de levadura se desintegren aún más. Esto permite que se liberen los componentes intracelulares (proteínas) que aún no se hayan liberado completamente después de la aplicación de los campos eléctricos pulsados.

Debido a las elevadas fuerzas de cizallamiento, las células de levadura ya abiertas se "exprimen" aún más y los componentes intracelulares, especialmente las proteínas, pueden escapar de las células.

La microfiltración en el paso c) se lleva a cabo preferiblemente con un medio filtrante con un tamaño de poro de 0,1 a 0,5 µm, preferiblemente 0,1 a 0,2 µm, en particular 0,1 µm. Esto ha demostrado ser especialmente preferible para conseguir un enriquecimiento relativo de las proteínas que se van a aislar en el permeado después de la descomposición física, con respecto al contenido de sólidos, y al mismo tiempo un enriquecimiento de los residuos de biomasa, por ejemplo, fragmentos de células y grasas, en el retenido.

En particular, la microfiltración en el paso c) se lleva a cabo como diafiltración, añadiéndose un líquido de intercambio, en particular agua, preferiblemente de forma continua en el lado receptor. En otras palabras, durante la diafiltración, la fase líquida de la suspensión de levadura descompuesta, que se descarga como permeado, se reemplaza preferiblemente de forma continua al menos parcialmente, en particular completamente, por un líquido de intercambio, en particular por agua.

La suspensión de levadura descompuesta circula principalmente desde un recipiente de almacenamiento. Regulando el flujo después del medio filtrante, se puede establecer una presión transmembrana, que actúa como fuerza impulsora en la diafiltración.

La diafiltración se realiza preferiblemente en un circuito cerrado, de modo que la eliminación del permeado conduce al flujo del disolvente de intercambio, en particular de modo que el volumen circulante permanece constante durante la diafiltración.

En concreto, la microfiltración del paso c) se lleva a cabo preferiblemente de tal manera que una proporción de proteínas en el permeado de la microfiltración del paso c), basada en el peso total de los sólidos en el permeado, sea preferiblemente al menos del 50 % en peso, más preferiblemente del 50-80 % en peso, en particular del 60-70 % en peso.

El contenido total de sólidos en el permeado de la microfiltración en el paso c) es preferiblemente de 1 a 10 % en peso, en particular de 3 a 7 % en peso, con respecto al peso total del permeado.

Además, preferiblemente, la microfiltración en el paso c) se lleva a cabo de tal manera que una proporción de proteínas en el retenido de la microfiltración del paso c) basada en el peso total de los sólidos en el retenido sea menor que el 50 % en peso, preferiblemente menor que el 40 % en peso, en particular menor que el 35 % en peso.

El contenido total de sólidos en el retenido de la microfiltración en el paso c) es preferiblemente del 20 al 50 % en peso, en particular del 25 al 30 % en peso, con respecto al peso total del retenido.

Según otra forma de realización posible, la suspensión de levadura descompuesta se trata con un agente oxidante, en particular ozono (O_3) y/o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En particular, esto puede evitar reacciones químicas que dan lugar a subproductos no deseados y/o cambios en el sabor. Sin embargo, el tratamiento con un agente oxidante es opcional.

Además, la suspensión de levadura descompuesta puede tratarse enzimáticamente antes del paso de microfiltración c). Esto permite aumentar la eficiencia y el rendimiento del proceso si es necesario. Sin embargo, el tratamiento enzimático antes del paso c) de microfiltración es opcional.

La ultrafiltración en el paso d) se lleva a cabo preferiblemente utilizando un medio filtrante con un tamaño de poro inferior a 90 nm y/o un límite de exclusión (límite de peso molecular nominal) de 1 a 100 kDa, especialmente 5 a 100 kDa, preferiblemente 10 a 50 kDa, en particular 15 a 25 kDa, especialmente 20 kDa. El límite de exclusión se define como la masa molecular mínima de moléculas que son retenidas en un 90 % por el medio filtrante, en particular la membrana.

En particular, la ultrafiltración en el paso d) se lleva a cabo como diafiltración, añadiéndose un líquido de intercambio, en particular agua, preferiblemente de forma continua al lado receptor. En otras palabras, en la diafiltración del paso d), la fase líquida del permeado de la microfiltración del paso c), que se descarga como permeado en la diafiltración, se reemplaza preferiblemente de forma continua al menos parcialmente, en particular completamente, en el lado de alimentación por un líquido de intercambio, en particular por agua.

El permeado de la microfiltración del paso c), que forma el receptor en el paso d), se hace circular en particular

desde un tanque de almacenamiento. Regulando el flujo aguas abajo del medio filtrante, se puede establecer una presión transmembrana, que actúa como fuerza impulsora de la diafiltración en el paso d).

La diafiltración en el paso d) se realiza preferiblemente en un circuito cerrado de manera que la eliminación del permeado provoque el flujo del líquido de intercambio, en particular de manera que el volumen circulante permanezca constante durante la diafiltración.

Mediante ultrafiltración y diafiltración en el paso d), se puede aumentar específicamente el contenido sólido relativo de la proteína en el retenido.

Preferiblemente, la ultrafiltración en el paso d) se lleva a cabo de tal manera que una proporción de las proteínas en la fase separada en el paso d) con proteínas como el componente sólido principal, con respecto al peso de los sólidos, sea al menos del 75 % en peso, en particular al menos del 85 % en peso, preferiblemente al menos del 90 % en peso.

El contenido total de sólidos en la fase separada en el paso d) es preferiblemente de 0,5 a 7 % en peso, en particular de 1 a 3 % en peso, con respecto al peso total de la fase separada en el paso d).

En particular, tanto la microfiltración en el paso c) como la ultrafiltración en el paso d) se llevan a cabo como diafiltración.

De manera especialmente preferida, la fase separada en el paso d) con proteínas como componente sólido principal se seca después del paso d), en particular se seca por pulverización. Esto hace que la proteína esté disponible como un producto en polvo con alta pureza. Los dispositivos y métodos correspondientes para el secado por pulverización son conocidos por el experto en la materia.

De forma especialmente preferida, el contenido de sólidos, en particular el contenido de proteínas, se concentra antes del secado por pulverización, en particular hasta un contenido de sólidos de al menos el 50 % en peso, en particular al menos el 60 % en peso, preferiblemente al menos el 70 % en peso. La concentración se realiza en particular en un evaporador, que evapora parcialmente la fase líquida. Los dispositivos y métodos correspondientes para la concentración son conocidos por la persona experta en la materia.

Opcionalmente, la fase separada en el paso d) con proteínas como componente sólido principal puede tratarse después del paso d) con un agente oxidante, en particular ozono y/o peróxido de hidrógeno, y/o ponerse en contacto con un material adsorbente, por ejemplo, carbón activado. Esto puede mejorar particularmente la calidad del producto de las proteínas. Por ejemplo, las decoloraciones y/o sabores no deseados se pueden descomponer y/o eliminar químicamente.

Si se realiza un secado por pulverización, el tratamiento con el agente oxidante y/o el contacto con el material adsorbente se lleva a cabo preferiblemente antes del secado por pulverización y, si se lleva a cabo, antes de la concentración.

El tratamiento con un agente oxidante se lleva a cabo de forma especialmente preferida mediante un contactor de membrana. En un contactor de membrana, los fluidos que experimentan una transferencia de masa están separados por una membrana porosa y pasan uno tras otro. En el presente caso, los fluidos son la fase separada en el paso d) con proteínas como componente sólido principal y el agente oxidante. En el contactor de membrana, el agente oxidante pasa a través de la membrana a la fase separada en el paso d) con proteínas como principal componente sólido. El uso de un contactor de membrana ha demostrado ser especialmente ventajoso y eficiente en comparación con otros contactores. Esto es particularmente cierto porque la pérdida de presión y el requerimiento de energía en el contactor de membrana son relativamente bajos, pero el agente oxidante aún puede ejercer su efecto de manera muy efectiva.

En el paso e) se utiliza una proteasa. Las proteasas son enzimas que pueden descomponer las proteínas hidrolíticamente. Las proteasas también se denominan enzimas proteolíticas.

Preferiblemente, en el paso e), la proteasa se utiliza en una proporción de 0,0001-10 % en peso, en particular 0,001-5 % en peso, especialmente 0,01-1 % en peso o 0,05-0,5 % en peso, con respecto al contenido de sólidos del retenido de la microfiltración del paso c).

La proteasa es preferiblemente una proteasa alcalina, en particular una serina proteasa, de manera particularmente preferible una subtilisina.

Las serina proteasas son una subfamilia de proteasas que tienen el aminoácido serina en su centro activo.

Las proteasas de tipo subtilisina (subtilasas, subtilopeptidasas, EC 3.4.21.62) se clasifican como serina proteasas debido a sus aminoácidos catalíticamente activos. Son producidos y secretados naturalmente por

microorganismos, particularmente especies de *Bacillus*. Actúan como endopeptidasas no específicas, lo que significa que hidrolizan cualquier enlace amida ácido ubicado dentro de péptidos o proteínas. Su pH óptimo suele estar en el rango claramente alcalino.

Las proteasas, y en particular las proteasas específicas mencionadas, han demostrado ser extremadamente ventajosas en el presente proceso. En particular, la proteasa puede liberar selectivamente manano, que puede separarse en forma de una fase líquida con manano como componente sólido principal.

En particular, el proceso se lleva a cabo sin la adición de mananasa o en ausencia de mananasa. La mananasa es una enzima que descompone los mananos.

El tratamiento en el paso e) se lleva a cabo preferiblemente a un valor de pH de 7,5 a 13, preferiblemente 8 a 11, en particular 8,5 a 10,5, y/o a una temperatura de 40 a 80 °C, preferiblemente 50 a 70 °C, en particular 55 a 65 °C. El valor de pH se ajusta preferiblemente a la proteasa utilizada.

En particular, en el paso e) se ajusta el valor de pH añadiendo una base, preferiblemente una base con un valor de pK_B inferior a 4,75, en particular inferior a 1. El valor de pK_B representa el logaritmo decimal negativo de la constante base K_B. Se prefiere especialmente una base inorgánica, especialmente NaOH. Estas bases han demostrado ser especialmente adecuadas.

La base se utiliza preferiblemente en forma diluida, por ejemplo, con una proporción de 30 a 60 % en peso en agua.

El tratamiento en el paso e) dura en particular de 10 minutos a 18 horas, en particular de 3 a 12 horas. Esto permite optimizar el rendimiento.

En una forma de realización adicional, en el paso e) se puede procesar una fracción pastosa con una pequeña cantidad de líquido. Dependiendo de la composición de la suspensión de levadura y del método de reacción, el paso enzimático se puede optimizar en términos de rendimiento.

En el paso f), la fase retenida se trata preferiblemente en un primer intervalo de tiempo, preferiblemente durante 1 a 5 horas, a un valor de pH de 7,5 a 13, preferiblemente 8 a 11, en particular 8,5 a 10,5, y/o a una temperatura de 40 a 95 °C, preferiblemente 65 a 85 °C, en particular 75 a 85 °C. A continuación, la fase retenida se trata preferiblemente en un segundo intervalo de tiempo, preferiblemente durante 0,5 a 2 horas, a un valor de pH de 2 a 6,5, preferiblemente 3 a 5, en particular 3,5 a 4,5, y/o a una temperatura de 50 a 95 °C, preferiblemente 80 a 95 °C, en particular 80 a 90 °C.

La "fase retenida en el paso e)" a la que se hace referencia en el paso f) se refiere en particular a la fase que queda después de la separación de la fase que contiene manano como componente sólido principal en el paso e). En particular, la "fase retenida en el paso e)" corresponde al retenido del paso c), del que se separó la fase con manano como componente sólido principal.

Si la fase que contiene manano como componente sólido principal se separa en el paso e), por ejemplo, mediante filtración, la "fase retenida en el paso e)" a la que se hace referencia en el paso f) es en particular el retenido del paso e). En este caso, la fase con manano como componente sólido principal forma el permeado en el paso e), que se separa.

De manera especialmente preferida, en el paso f), el valor de pH en el primer intervalo de tiempo se selecciona de tal manera que se corresponde con el valor de pH presente durante el tratamiento en el paso e).

Además, se prefiere que en el paso f) la temperatura en el primer intervalo de tiempo sea mayor que la temperatura presente durante el tratamiento en el paso e).

Preferiblemente, en el paso f) la temperatura en el primer intervalo de tiempo es menor que en el segundo intervalo de tiempo y/o el primer intervalo de tiempo es más largo que el segundo intervalo de tiempo.

En el paso f), si es necesario, se ajusta el valor de pH añadiendo una base, preferiblemente NaOH, y/o añadiendo un ácido, preferiblemente H_2SO_4.

La base es preferiblemente una base como la descrita anteriormente en el paso e). De manera especialmente preferible, la base en el paso f) es la misma base que en el paso e).

El ácido es en particular un ácido con un valor de pK_S inferior a 4,75, en particular inferior a 1. El valor de pK_S representa el logaritmo decimal negativo de la constante K_S ácida. Se prefiere especialmente un ácido mineral, en particular H_2SO_4.

El ácido se utiliza preferiblemente en forma diluida, por ejemplo, con una proporción de 30 a 60 % en peso en agua.

Las medidas mencionadas antes, especialmente en combinación, han demostrado ser especialmente ventajosas en términos de eficiencia del proceso.

La separación de la fase con manano como componente sólido principal en el paso e) se lleva a cabo preferiblemente mediante filtración, en particular una microfiltración y ultrafiltración combinadas. Asimismo, la separación de la fase con glucano como componente sólido principal en el paso f) se realiza preferiblemente mediante filtración, en particular una microfiltración y ultrafiltración combinadas.

La fase que queda después de la separación de la fase que contiene manano en el paso e) se trata además en el paso f) en particular como la "fase retenida".

La microfiltración se lleva a cabo preferiblemente utilizando un medio filtrante con un tamaño de poro de 0,1 a 0,5 µm, en particular 0,1 a 0,2 µm, preferiblemente 0,1 µm. La ultrafiltración se lleva a cabo preferiblemente utilizando un medio filtrante con un tamaño de poro inferior a 90 nm y/o un límite de exclusión (límite de peso molecular nominal) de 1 a 100 kDa, especialmente 5 a 100 kDa, preferiblemente 10 a 50 kDa, en particular 15 a 25 kDa, especialmente 20 kDa.

La microfiltración en el paso e) y/o la ultrafiltración en el paso f) se llevan a cabo preferiblemente como diafiltración, en particular de la misma manera que la descrita para los pasos c) y d).

En el paso e), en particular, se retira de la microfiltración la fase con manano como principal componente sólido en forma de permeado, se alimenta a la ultrafiltración y se aumenta la proporción relativa de manano en el retenido de la ultrafiltración.

En el paso f), en particular, se retira de la microfiltración la fase con glucano como principal componente sólido en forma de permeado, se alimenta a la ultrafiltración y se aumenta la proporción relativa de glucano en el retenido de la ultrafiltración.

Durante la diafiltración en los pasos e) y/o f), los líquidos se hacen circular en particular desde el recipiente de reacción en donde tienen lugar los pasos e) y/o f), suministrándose preferiblemente líquido de intercambio de forma continua en el lado receptor.

Según otra forma de realización ventajosa, la separación en los pasos e) y/o f) se lleva a cabo mediante un filtro de tambor y/o una centrífuga. Este es particularmente el caso del paso f).

En una forma de realización particular, la separación en el paso e) se lleva a cabo mediante una microfiltración y ultrafiltración combinadas, como se ha descrito anteriormente, y la separación en el paso f) se lleva a cabo mediante un filtro de tambor y/o una centrífuga, en particular una centrífuga.

Preferiblemente, la fase separada en el paso e) con manano como componente sólido principal se seca después del paso e), en particular por pulverización, y/o la fase separada en el paso f) con glucano como componente sólido principal se seca después del paso f), en particular por pulverización. Esto significa que tanto el manano como el glucano están disponibles como productos en polvo con alta pureza.

Preferiblemente, el contenido de sólidos, en particular el contenido de manano y/o glucano, se concentra antes del secado por pulverización, en particular utilizando un evaporador.

Opcionalmente, la fase separada en el paso e) con manano como componente sólido principal puede tratarse después del paso e) con un agente oxidante, en particular ozono y/o peróxido de hidrógeno, y/o ponerse en contacto con un material adsorbente, por ejemplo, carbón activado.

Asimismo, la fase separada en el paso f) con glucano como componente sólido principal puede tratarse opcionalmente después del paso f) con un agente oxidante, en particular ozono y/o peróxido de hidrógeno, y/o ponerse en contacto con un material adsorbente, por ejemplo, carbón activado.

Al igual que con la separación de proteínas, esto puede mejorar la calidad del producto de manano y/o glucano.

Si el secado por pulverización se lleva a cabo después de los pasos e) y/o f), el tratamiento con el agente oxidante y/o el contacto con el material adsorbente se lleva a cabo preferiblemente antes del secado por pulverización y, si este tiene lugar, antes de la concentración.

El tratamiento con un agente oxidante se lleva a cabo de forma especialmente preferida mediante un contactor de membrana. Las ventajas a este respecto se han descrito anteriormente en relación con el flujo de proteínas.

De la siguiente descripción detallada y de la totalidad de las reivindicaciones de la patente se desprenden otras formas de realización y combinaciones de características de la invención ventajosas.

Breve descripción de los dibujos

Las Fig. 1 y 2 utilizadas para explicar el ejemplo de realización muestran el diagrama de flujo del proceso de un método según la invención para descomponer levadura de cerveza con el fin de aislar proteínas (P), manano (M) y glucano (G).

En principio, las piezas idénticas en las figuras están provistas de signos de referencia idénticos.

Formas de implementar la invención

Las Fig. 1 y 2 muestran el diagrama de flujo del proceso de un método según la invención para descomponer levadura de cerveza con el fin de aislar proteínas (P), manano (M) y glucano (G).

En un primer paso 100, una suspensión BS acuosa de levadura de cerveza enfriada (temperatura = 5 °C; concentración de sólidos = 15 % en peso) es entregada por un camión 1 cisterna para almacenarse temporalmente en un tanque 2 de almacenamiento a 5 °C en el paso 101 posterior.

A continuación, la suspensión de levadura de cerveza BS se somete a un proceso 102 de lavado en una centrífuga 3. La fase líquida de la suspensión BS de levadura de cerveza se sustituye por agua W y se alimenta a un tanque 4 de almacenamiento.

Desde el tanque 4 de almacenamiento, la suspensión de levadura de cerveza lavada se introduce en un molino 5 de bolas, donde las células de levadura de cerveza en la suspensión se desintegran físicamente en el siguiente paso 103 del proceso. La suspensión de levadura de cerveza descompuesta se somete a un paso 104 de microfiltración. La microfiltración se realiza como diafiltración utilizando un medio filtrante con un tamaño de poro de 0,1 µm. La suspensión de levadura de cerveza descompuesta se hace circular desde un depósito 6 con una bomba 7 a través del microfiltro 8, mientras que se añade continuamente agua W al lado del depósito como líquido de intercambio. La presión transmembrana, que se puede regular mediante el flujo de salida del permeado, es de aproximadamente 1,5 bar. La proporción de proteínas en el permeado p1 de la microfiltración, respecto del peso total de sólidos en el permeado p1, es, por ejemplo, del 60 a 70 % en peso.

A continuación, el permeado p1 del paso 104 de microfiltración se somete a un paso 105 de ultrafiltración. La ultrafiltración se realiza como diafiltración utilizando un medio filtrante con un límite de exclusión (límite de peso molecular nominal) de 20 kDa. El permeado p1 se hace circular desde otro depósito 9 con una bomba 10 a través del ultrafiltro 11, suministrándose continuamente agua W como fluido de intercambio en el lado del depósito. La presión transmembrana, que se puede regular mediante el flujo de salida del permeado, es de aproximadamente 2 bar. A través del paso 105 de ultrafiltración, se incrementa el contenido relativo de sólidos de la proteína en el retenido r2, de modo que el contenido de sólidos de las proteínas en relación con el contenido total de sólidos en el retenido r2 restante es de aproximadamente 90 % en peso.

El permeado p2 del paso 105 de ultrafiltración se descarga como agua residual (esta se puede reciclar si es necesario).

El retenido r2 del paso 105 de ultrafiltración con proteínas como componente sólido principal se somete a un proceso 106 de secado, en el que el retenido r2 se alimenta a un dispositivo 13 de secado por aspersión después de pasar a través de un evaporador 12. Esto da como resultado la proteína como un producto P en polvo.

El rendimiento de proteína durante todo el proceso es de aproximadamente 38 % en peso basado en el contenido de proteínas disponibles en la suspensión BS de levadura de cerveza.

El retenido r1 del proceso 104 de microfiltración se trata paso a paso enzimática y químicamente, lo que se muestra en la Fig. 2. La Fig. 2 se conecta con el punto marcado con un asterisco (*) en la Fig. 1.

En un paso 107 de descomposición proteolítica, el retenido r1 se trata en un reactor 14, por ejemplo, durante 8 horas con 0,2 % en peso (basado en el contenido de sólidos del retenido r1) de una proteasa E en forma de subtilisina. El tratamiento se realiza a un valor de pH de aproximadamente 9,5, ajustándose el valor de pH añadiendo base B en forma de solución acuosa de NaOH al 45 % y manteniéndose constante durante el tratamiento con proteasa.

La descomposición proteolítica libera selectivamente el manano, que luego se separa mediante microfiltración y posterior ultrafiltración en forma de una fase acuosa con el manano como principal componente sólido. Tanto la microfiltración como la ultrafiltración se realizan como diafiltraciones. Durante la microfiltración, el líquido que se va a filtrar se hace circular mediante una bomba 15 desde el reactor 14 a través del filtro 16 de microfiltración

(tamaño de poro: 0,1 µm), añadiéndose continuamente líquido de intercambio en el lado del depósito. El permeado de la microfiltración se alimenta luego al depósito 17 del paso de ultrafiltración, desde donde el líquido es circulado por una bomba 18 sobre el ultrafiltro 19 (límite de exclusión: 20 kDa). La ultrafiltración aumenta el contenido relativo de sólidos de manano en el retenido del paso de ultrafiltración, de modo que el contenido de sólidos de manano en relación con el contenido total de sólidos en el retenido restante es de aproximadamente 65 % en peso. El permeado del paso de ultrafiltración se descarga como agua residual (puede reciclarse si es necesario).

El retenido del paso de ultrafiltración con manano como componente sólido principal se somete a un proceso 110 de secado, en el que el retenido se alimenta a un dispositivo 21 de secado por aspersión después de pasar a través de un evaporador 20. Esto da como resultado manano como un producto M en polvo.

El rendimiento de manano durante todo el proceso es de aproximadamente 39 % en peso basado en el contenido de manano disponible en la suspensión BS de levadura de cerveza.

La fase retenida en el reactor 14 se calienta luego a una temperatura de aproximadamente 80 °C y se somete a una extracción 108 básica a un valor de pH de 9,5 en un primer intervalo de tiempo de aproximadamente 3 horas. El valor del valor de pH se mantiene constante mediante la adición controlada de NaOH diluido.

Luego se aumenta nuevamente la temperatura a aproximadamente 85 °C y se ajusta el valor del valor de pH agregando 50 % de H_2SO_4 en agua reducida a un valor de 4. La fase retenida en el reactor se somete luego a una extracción 109 ácida durante un intervalo de tiempo de 1 hora.

Después de la extracción básica y ácida, se separa mediante diafiltración una fase líquida con glucano como componente principal a través de los dos pasos de filtrado (microfiltrado 16 y ultrafiltrado 18), de forma análoga al manano. Esto da como resultado un contenido de sólidos de glucano de aproximadamente 72 % en peso con respecto al contenido total de sólidos en el retenido del paso de diafiltración.

El retenido del paso de ultrafiltración con glucano como componente sólido principal también se somete a un proceso 110 de secado, en el que el retenido se alimenta al dispositivo 21 de secado por aspersión después de pasar por el evaporador 20. Esto da como resultado el glucano como un producto G en polvo.

El rendimiento de glucano durante todo el proceso es de aproximadamente 42 % en peso con respecto al contenido de glucano disponible en la suspensión BS de levadura de cerveza.

Sin embargo, la invención no se limita al ejemplo de realización mostrado. Por lo tanto, esto puede modificarse según se desee dentro del alcance de la invención.

Por ejemplo, se pueden utilizar otras suspensiones de levadura en lugar de una suspensión de levadura de cerveza. Asimismo, se pueden omitir pasos de proceso no obligatorios, como por ejemplo el proceso 102 de lavado. Además, la descomposición celular se puede lograr mediante campos eléctricos pulsados en lugar de un molino 5 de bolas. También es posible, entre otras cosas, separar el manano y/o el glucano utilizando un filtro de tambor o una centrífuga en lugar de los pasos de filtrado descritos (microfiltro 16 y ultrafiltro 18).

Además, opcionalmente se puede prever un contactor MK o MK' de membrana aguas arriba del evaporador 12 y/o aguas arriba del evaporador 20. Esto permite tratar las fases correspondientes con un agente oxidante, como ozono y/o peróxido de hidrógeno, antes del secado por pulverización.

En resumen, se ha proporcionado un método novedoso y particularmente ventajoso para descomponer levadura, en particular levadura de cerveza, para el aislamiento de proteínas y sacáridos, que es particularmente adecuado para enfoques a gran escala.

REIVINDICACIONES

1. Método para descomponer levadura, en particular levadura de cerveza, para el aislamiento de proteínas y sacáridos que comprende los pasos de:

a) provisión de una suspensión de levadura, en particular una suspensión de levadura de cerveza;

b) descomposición física de la levadura en la suspensión de levadura;

c) microfiltración de la suspensión de levadura descompuesta del paso b);

d) ultrafiltración del permeado de la microfiltración del paso c), separándose una fase con proteínas como componente sólido principal como retenido de la ultrafiltración;

e) tratamiento del retenido de la microfiltración del paso c) con una proteasa en condiciones básicas y separación posterior de una fase con manano como componente sólido principal, en particular mediante filtración y/o centrifugación;

f) tratamiento de la fase retenida en el paso e) sucesivamente primero en condiciones básicas y luego ácidas y separación posterior de una fase con glucano como componente sólido principal, en particular mediante filtración y/o centrifugación.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la suspensión de levadura proporcionada en el paso a) tiene un contenido de sólidos de 5-30 % en peso, en particular 7-20 % en peso, con respecto al peso total de la suspensión de levadura.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la suspensión de levadura proporcionada en el paso a) tiene una temperatura de 0 a 15 °C, preferiblemente 2 a 12 °C, más particularmente 3 a 7 °C o 5 °C.

4. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la suspensión de levadura se somete a un proceso de lavado antes del paso b), sustituyéndose al menos una parte de la fase líquida de la suspensión de levadura, en particular al menos el 50 % en peso, especialmente al menos el 60 % en peso, de la fase líquida de la suspensión de levadura, por otro líquido, en particular agua.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la descomposición física en el paso b) se lleva a cabo en un homogeneizador o un molino de cuerpos de molienda, en particular un molino de bolas.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la descomposición física en el paso b) se realiza mediante campos eléctricos pulsados.

7. Método según la reivindicación 6, en el que la intensidad del campo eléctrico es de 1 a 30 kV/cm, en particular de 5 a 24 kV/cm, y/o la entrada de energía específica es de 1 a 180 kJ/l, en particular de 3 a 120 kJ/l.

8. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la microfiltración en el paso c) se lleva a cabo con un medio filtrante que tiene un tamaño de poro de 0,1 a 0,5 µm, preferiblemente 0,1 a 0,2 µm, en particular 0,1 µm, y en el que la ultrafiltración en el paso d) se lleva a cabo con un medio filtrante que tiene un tamaño de poro inferior a 90 nm y/o un límite de exclusión de 1 a 100 kDa, especialmente de 5 a 100 kDa, preferiblemente de 10 a 50 kDa, en particular de 15 a 25 kDa, especialmente de 20 kDa.

9. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la microfiltración en el paso c) y/o la ultrafiltración en el paso d) se llevan a cabo como diafiltración, suministrándose agua preferiblemente de forma continua en el lado de alimentación.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fase separada en el paso d) con proteínas como componente sólido principal se seca, en particular se seca por pulverización, después del paso d).

11. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso e) se utiliza proteasa en una proporción de 0,0001-10 % en peso, en particular 0,001-5 % en peso, especialmente 0,01-1 % en peso o 0,05-0,5 % en peso, con respecto al contenido de sólidos del retenido de la microfiltración del paso c), siendo la proteasa preferiblemente una subtilisina y llevándose el tratamiento en el paso e) a cabo a un valor de pH de 7,5 a 13, preferiblemente 8 a 11, en particular 8,5 a 10,5, y a una temperatura de 40 a 80 °C, preferiblemente 50 a 70 °C, en particular 55 a 65 °C.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tratamiento con proteasa en el

paso e) dura de 10 minutos a 18 horas, en particular de 3 a 12 horas.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso f) la fase retenida se trata en un primer intervalo de tiempo, preferiblemente durante 1 a 5 horas, a un valor de pH de 7,5 a 13, preferiblemente 8 a 11, en particular 8,5 a 10,5, y a una temperatura de 40 a 95 °C, preferiblemente 65 a 85 °C, en particular 75 a 85 °C, y posteriormente se trata en un segundo intervalo de tiempo, preferiblemente durante 0,5 a 2 horas, a un valor de pH de 2 a 6,5, preferiblemente 3 a 5, en particular 3,5 a 4,5, y a una temperatura de 50 a 95 °C, preferiblemente 80 a 95 °C, en particular 80 a 90 °C.

14. Método según la reivindicación 13, en el que en el paso f) el valor de pH en el primer intervalo de tiempo es igual al pH presente durante el tratamiento en el paso e), y en el que en el paso f) la temperatura en el primer intervalo de tiempo es menor que en el segundo intervalo de tiempo y/o el primer intervalo de tiempo es más largo que el segundo intervalo de tiempo.

15. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la separación de la fase con manano como componente sólido principal en el paso e) y/o la separación de una fase con glucano como componente sólido principal en el paso f) se lleva a cabo mediante filtración, en particular una microfiltración y ultrafiltración combinadas.

16. Método según la reivindicación 15, en el que la microfiltración se lleva a cabo con un medio filtrante que tiene un tamaño de poro de 0,1 a 0,5 µm, en particular 0,1 a 0,2 µm, preferiblemente 0,1 µm, y en el que la ultrafiltración se lleva a cabo con un medio filtrante que tiene un tamaño de poro de menos de 90 nm y/o un límite de exclusión de 1 a 100 kDa, especialmente de 5 a 100 kDa, preferiblemente de 10 a 50 kDa, en particular de 15 a 25 kDa, especialmente de 20 kDa.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en el que la microfiltración en el paso e) y/o la ultrafiltración en el paso f) se lleva a cabo como diafiltración.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fase separada en el paso e) con manano como componente sólido principal se seca después del paso e), en particular por pulverización, y/o en el que la fase separada después del paso f) con glucano como componente sólido principal se seca después del paso f), en particular por pulverización.

DIBUJOS

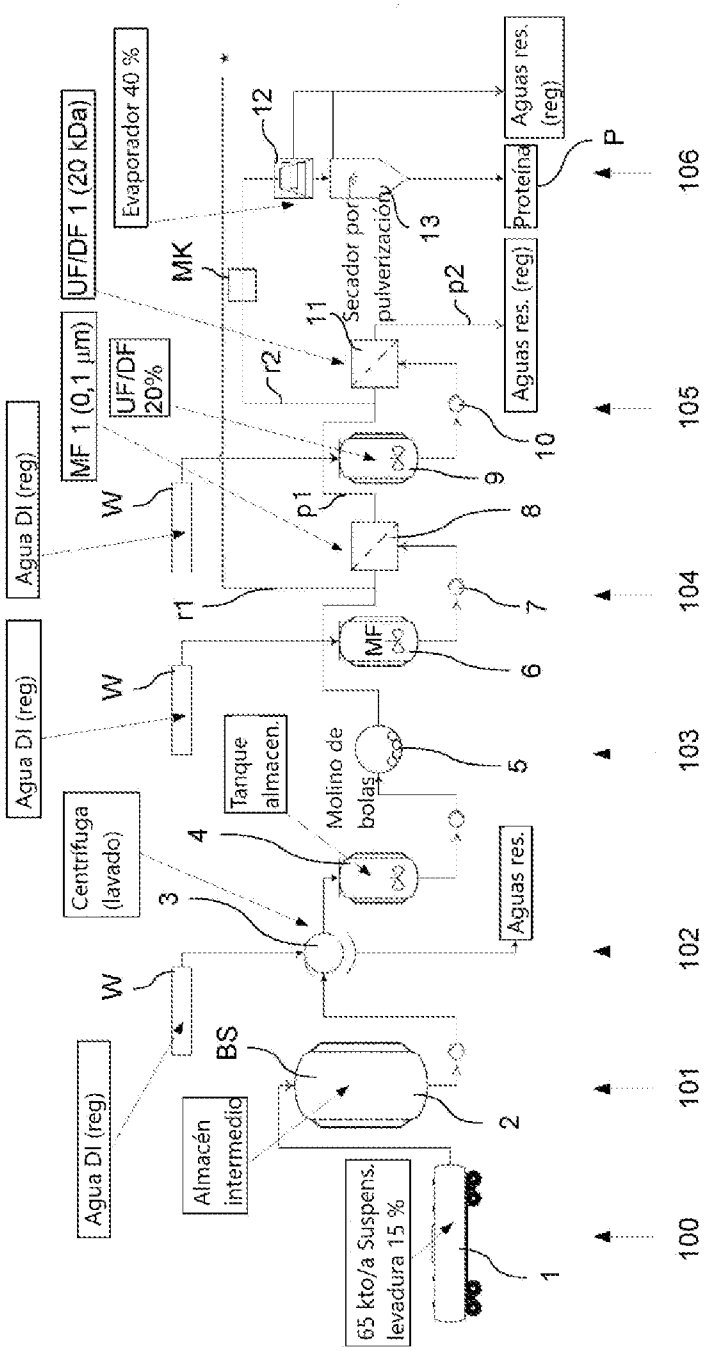


Fig. 1

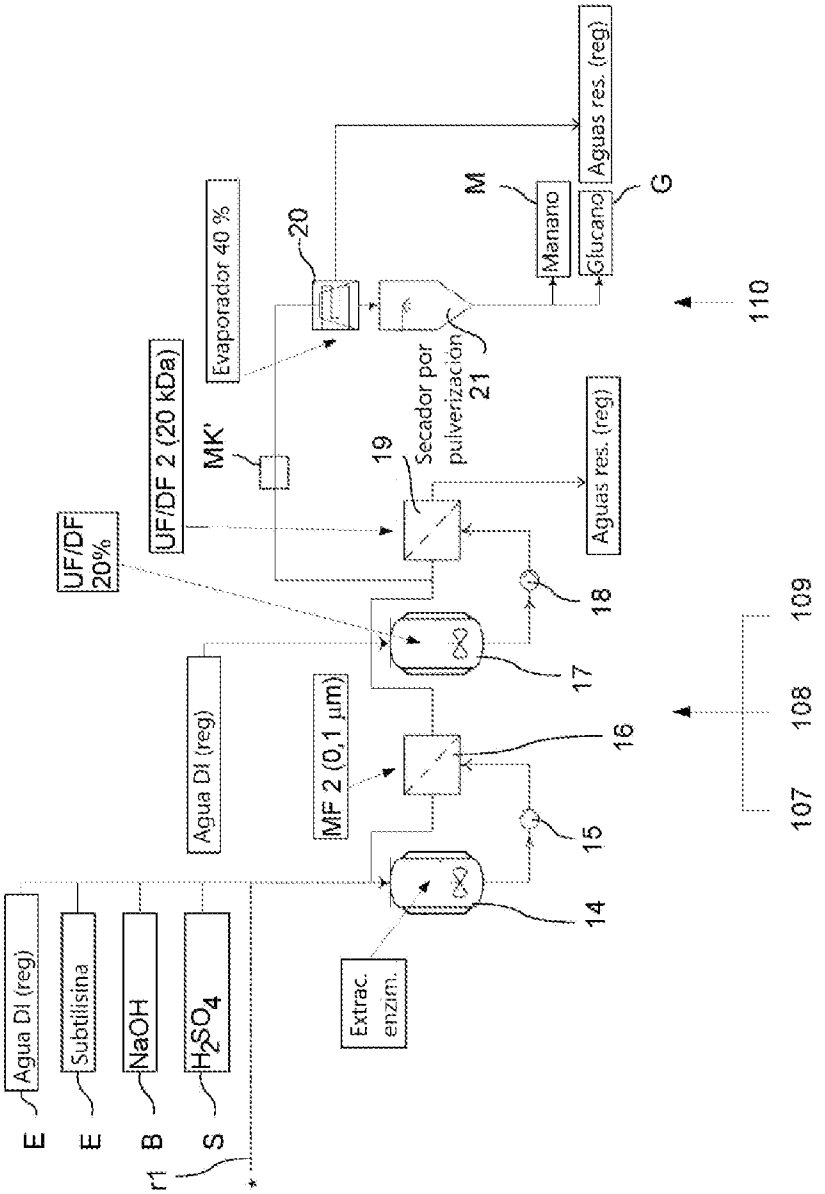

E
Agua DI (reg)
E
Subtilisina
B
NaOH
S
H_2SO_4
r1
Extrac. enzim.
14
15
16
MF 2 (0,1 µm)
Agua DI (reg)
17
18
UF/DF 20%
UF/DF 2 (20 kDa)
MK'
19
Secador por pulverización
21
Aguas res. (reg)
Evaporador 40 %
20
M
Manano
G
Glucano
Aguas res. (reg)
110
107
108
109

Fig. 2