



PATENTE DE INVENCIÓN
=====

O=N. 122.

254704

Memoria Descriptiva

sobre:

254704

"Procedimiento para la obtención de ergosterina y
materias acompañantes".

=====

Solicitante: ZELLSTOFFFABRIK WALDHOF, entidad alemana, domiciliada
en Sandhofer-Strasse, MANNHEIM-WALDHOF, Alemania.

=====

La invención se refiere a un procedimiento para
la obtención de ergosterina y materias acompañantes, tales
como cerebrina de levadura y ácidos grasos de materiales
lipoidosos, preferentemente de levadura..

5. Se conocen distintos procedimientos para la
obtención de ergosterina de la levadura. Según el procedi-
miento de Windaus y Grosskopf (v.physiol.Chemie 124, 8,

254704



- 1522) se calienta por ejemplo levadura de prensa con lejía de potasa cáustica alcohólica, diluida con agua y la ergosterina se extrae con éter. Heiduschka y Lindner han modificado este procedimiento frotando la levadura con
5. alcohol bajo adición de lejía potásica cáustica alcohólica, hirviendo durante 6 horas y filtrando. El residuo se vuelve a hervir con alcohol y lejía potásica cáustica, los filtrados reunidos y concentrados por evaporación se enfrían a 0°, los cristales precipitados se filtran, la lejía se sigue
10. evaporando y nuevamente se enfría y se filtra. La ergosterina en bruto obtenida se extrae con éter y se recristaliza de alcohol.

- Se conocen otros procedimientos en los cuales la levadura se saponifica con alcalí acuoso bajo presión normal (Patente alemana 553 915) o aumentada (Patente alemana 549 110) y a continuación se extraen las esterinas con un disolvente graso. Según la patente checa 53 270 las levaduras se extraen en presencia de amoníaco o sales amónicas con alcohol y el extracto se emplea para una nueva
15. extracción, hasta que se haya logrado la concentración de saturación en ergosterina y ésta se separa en gran parte. La lejía madre se saponifica con la cantidad de alcalí calculada y con éter se extrae la ergosterina. En el
20. procedimiento según la patente americana 1.842.929 se parte de los lipoides, se saponifica la solución acetónica con alcalí acuoso, la mezcla se diluye con agua, se enfría a -20°C y después de 12 horas se separa la ergosterina en
25. bruto precipitada.

- Los procedimientos hasta ahora dados a conocer
30. no solo son complicados y lentos, sino que hidrolizan

254704⁰¹



también con pocas excepciones la substancia de levadura total, tan ampliamente, que el residuo de levadura extraído no entra en consideración para un ulterior empleo. Exigen además el empleo de considerables aparatos para la saponificación y extracción de grandes cantidades de levadura. Además de las elevadas pérdidas en disolvente encarece el procedimiento ante todo la gran necesidad de alcalí y el empleo de temperaturas bajas. Finalmente tampoco es deseable en el interés de la seguridad del servicio el empleo del éter especialmente peligroso al fuego.

El presente procedimiento elimina estas desventajas y representa un procedimiento sorprendentemente sencillo y económico para la obtención de ergosterina, además de cerebrina de levadura y ácidos grasos de lipoides de cualquier origen.

Especialmente ventajoso es el procedimiento si se parte directamente de la levadura, ya que el residuo de la levadura extraído se conserva totalmente con sus valiosos materiales contenidos y se puede seguir elaborando en distintas formas.

Según la invención, la levadura molida se extrae en caliente con alcohol metílico, se filtra y el extracto se concentra por evaporación a un volumen determinado. El residuo de levadura se lava con metanol y este metanol de lavado se emplea para la extracción de ulterior levadura fresca. Después de la adición de alcali acuoso se saponifica el extracto durante $\frac{1}{2}$ hora al reflujo, y después de enfriar a temperatura de ambiente se filtra la ergosterina en bruto que aquí se precipita.

254704³¹⁵



5. La solución alcohólica separada de la ergosterina se acidifica y el alcohol se recupera por destilación. De esta manera, se separan los ácidos grasos como capa aceitosa viscosa, casi cuantitativa, sobre la solución de jabón ácida libre de alcohol y se puede decantar.

10. La ergosterina en bruto, que también contiene toda la cerebrina de levadura, se hierve con tano éter, acetona o cloroformo, de manera que toda la ergosterina y cerebrina se disuelvan, mientras que los hidratos de carbono y las demás impurezas se quedan sin disolver. El extracto acetónico, etérico o clorofórmico se pone ahora a un volumen tal, que toda la ergosterina en él se mantenga disuelta a 20-30°C, mientras que la cerebrina, cuya difícil solubilidad en este disolvente es en sí conocida, al enfriar a esta temperatura, se precipita en forma de copos casi cuantitativamente y se puede filtrar. Decisivo para la pureza de la ergosterina en bruto es el contenido de agua en la solución de jabón metanólica, siendo más pura contra mayor sea la parte de agua, ya que 15. con una concentración metanólica grande las impurezas, ante todo también las sales alcalinas de los ácidos grasos, no se disuelven totalmente y se precipitan también. Por otra parte se precipita con un contenido de agua muy grande la ergosterina en una forma mucosa, de difícil fil- 20. tración, mientras que simultáneamente se reduce el rendimiento absoluto en ergosterina.

30. Una ulterior influencia sobre el rendimiento y pureza de la ergosterina en bruto la ejerce la cantidad total de la mezcla de metanol-agua. Si esta cantidad es demasiado reducida, se obtiene también una ergosterina



254704

en bruto demasiado poco concentrada, con una cantidad demasiado grande, sin embargo, un rendimiento de ergosterina reducido.

5. La concentración de ergosterina óptima en la ergosterina en bruto filtrada se encuentra entre 20-35% con un rendimiento óptimo simultaneo en ergosterina hasta un 98% de la ergosterina total existente en el extracto.

10. Además se ha de prestar atención a que las condiciones de solubilidad de los jabones sódicos y potásicos son muy diferentes. Es necesario emplear al saponificar con sosa cáustica relativamente más metanol a una concentración determinada que al saponificar con potasa cáustica con objeto de mantener los jabones en solución.

15. Teniendo en consideración estos distintos factores, ha demostrado ser conveniente seleccionar la cantidad de metanol y la concentración metanólica de manera que en la saponificación con KOH por 1 kg de lipóide en bruto (= extracto metanólico - substancia seca) se emplee
20. de 3 - 6 veces la cantidad en volumen de alcohol metílico al 60-90%, preferentemente al 75-90%, en la saponificación con NaOH de 4 - 12 veces la cantidad de alcohol metílico al 60-90%, preferentemente al 75-90%. En caso dado, la concentración metanólica más favorable para una grasa en
25. bruto, así como la cantidad más favorable, se pueden determinar rápidamente por ensayos de orientación.

30. Especialmente sencillo y económico es el procedimiento según la presente invención, ante todo en la obtención de ergosterina directamente de la levadura, manteniéndose la levadura extraída, contrario a los procedi-

254704



mientos usuales, en su composición biológica y pudiendose seguir elaborando ulteriormente en las más distintas formas: por ejemplo como alimento animal rico en albúmina, como material inicial para la obtención de albúmina técnica, para la obtención de ácido nucleínico, etc.

5.

EJEMPLO I

108 kg de levadura luto (98% de contenido seco) que contienen 400 g de ergosterina se muelen, lo más fino posible, en un molino de clavijas y se hierven con aprox. 10 veces, es decir, 1000 litros de metanol al 97,5% en el calor de ebullición, agitando, durante 1/2 hora. El extracto metanólico se filtra a 65°C y el residuo de levadura se lava ulteriormente con la misma cantidad de metanol hirviendo. El metanol de lavado se emplea para la extracción de otra levadura fresca. El extracto metanólico, que contiene 20% de la substancia seca de la levadura, entre ella 385 g de ergosterina, se evapora a 160 litros de volumen total y después de la adición de 7,2 kg de NaOH al 50% se saponifica durante 1/2 hora al reflujo. La proporción óptima entre grasa en bruto: metanol, de una concentración determinada, se ha ajustado aquí por sí misma, siendo en el presente volumen final del extracto, que se concentró por evaporación a aprox. un 16 % del volumen inicial, ésta proporción de 1 : 8, ascendiendo la concentración metanólica a aprox. un 85%. Después de enfriar a temperatura de ambiente se filtra la ergosterina en bruto precipitada que después de secar pesa 1165 g y contiene 350 g de ergosterina pura. La ergosterina en bruto se extrae caliente con un total de 49 litros de acetona, el extracto acetónico se enfría a 20°C y la

10.

15.

20.

25.

30.

254704

31



- cerebrina de levadura (60 g de substancia seca) se filtra. Esta contiene aún aprox. 4 g de ergosterina que se puede obtener por ulterior limpieza con acetona. El filtrado acetónico da después de concentrar por evaporación por
5. recristalización según procedimientos conocidos, ergosterina al 98-100%. La lejía madre de la solución de jabón metanólica se pone a un pH de 5 y de ésta se recupera el metanol restante mediante destilación en una columna de rectificación, Si la solución jabonosa ácida libre de
10. metanol se separan arriba como capa 3kg de ácidos grasos.

EJEMPLO II

- Como en el ejemplo 1; pero el extracto metanólico se evapora a 110 litros y se saponifica con 10 kg de potasa cáustica al 50%. Por lo demás como en el ejemplo 1.
15. La proporción grasa en bruto: metanol-agua es en este caso de 1: 5 habiendo adoptado el metanol una concentración en volumen de aprox. 85%.

EJEMPLO III

- 10 kg de extracto metanólico de levadura (100 de substancia seca) que contiene 2,25% = 225 g de ergosterina, se mezclan con 70 litros de metanol al 87% y 3,6 kg de NaOH al 50 %, se saponifica durante $\frac{1}{2}$ hora en el refrigerador al reflujo, se enfría a temperatura de ambiente y la ergosterina en bruto, que después de secar
25. pesa 740 g y contiene 213 g de ergosterina, se filtra. Tratamiento ulterior análogo al ejemplo 1.

EJEMPLO IV

- 5 kg de lipóide puro (100 % de substancia seca) que contienen 6% = 380 g de ergosterina, se mezclan con
20. 2 kg de NaOH al 50 % y se saponifica durante 1/2 hora al

254704



reflujo. Después de enfriar se filtra la ergosterina en bruto y se seca. Se obtienen 340 g de ergosterina y pesa 780 g.

Limpieza y cristalización como arriba.

5. EJEMPLO V

2 kg de lipode soluble en acetona, que se obtienen en el aislamiento fosfatúrico de lipoides de levadura y contienen 12,5 % = 250 g de ergosterina se saponifican con 60 litros de metanol al 82 % y 800 g de NaOH al 50 % durante 1/2 hora. Se obtienen 440 g de ergosterina en bruto que se compone en un 50% de ergosterina. Cristalización como arriba.

N O T A

15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Alemania con fecha 17 de diciembre de 1.951, nº 916.847, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que concede el Convenio Hispano-Alemán de fecha 19 de febrero de 1.959, ratificado el 2 de junio de 1.959, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España: "Procedimiento para la obtención de ergosterina y materias acompañantes"; caracterizándose por lo siguiente:

30. 1º.- Procedimiento para la obtención de ergosterina y materias acompañantes, tales como ácidos

254704




5. grasos, de materiales iniciales lipoidosos, especialmente de levadura, por extracción con alcohol, especialmente metanol, o disolventes de grasa y saponificación de las grasas en bruto así obtenidas u otras grasas en bruto adecuadas de cualquier origen en solución alcoholica-acuosa, especialmente metanólica-acuosa, caracterizado porque la saponificación se efectúa con la presencia simultánea de aquellas cantidades de alcohol-agua que permitan una directa y casi total separación de la ergosterina y cerebrina en forma filtrable al enfriar a 10. temperatura de ambiente, mientras que los ácidos grasos quedan en solución como sales alcalinas y de éstas se obtienen en forma conocida por acidificación.

15. 2º.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la saponificación con NaOH se efectúa en presencia de 4 - 12 veces la cantidad en volumen por kg de lipoide bruto, de metanol al 60-90%, preferentemente 75-90%.

20. 3º.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la saponificación con KOH se efectúa en presencia de 3 - 6 veces la cantidad en volumen, por kg de grasa en bruto, de metanol al 60-90%, preferentemente 75-90%.

25. 4º.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª-3ª, caracterizado porque de la ergosterina en bruto se extrae la ergosterina y cerebrina con acetona, éter o cloroformo y el extracto con el mismo disolvente se pone a un volumen tal, que aquí, a una temperatura determinada, especialmente a 20-30º, se mantenga toda ergosterina disuelta, mientras que la cerebrina se precipita en forma 30.

25470410



de copos y se retira.

5^a.- Procedimiento para la obtención de ergosterina y materias acompañantes; tal y como queda substancialmente descrito en la presente memoria.

5. Este memoria consta de diez hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 31 DIC. 1959

ZELLSTOFFFABRIK WALDHOF.

J. FÓRNEZ AZEDO Y MOGNET
P. R.

