

423262

F.C. 22-10-75



Cl. C. 6076

PATENTE DE INVENCION

por 20 años

por "Un procedimiento para reducir la cantidad de ácidos nucleicos en un material proteínaceo"

a favor de: THE BRITISH PETROLEUM COMPANY LIMITED, de nacionalidad británica, domiciliada en Britannic House, Moor Lane, LONDRES, EC2Y 9BU, Inglaterra.

423262

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un procedimiento para reducir la cantidad de ácidos nucleicos presentes en un material proteínaceo. La invención particularmente se refiere a un procedimiento para reducir la cantidad de ácidos nucleicos presentes en el material proteínaceo derivado de o contenido en las células de microorganismos.

La mayor parte de materiales proteínaceos contienen ácidos nucleicos. La cantidad de ácidos nucleicos presentes en un material proteínaceo es particularmente significativa cuando éste ha de ser usado como o incorporado en sustancias alimenticias destinadas al consumo humano. El sistema humano descompone los ácidos nucleicos introducidos en el estómago en ácido úrico. Desgraciadamente el hombre es incapaz de reducir el ácido úrico a causa de estar deficiente de la enzima uricasa. Además el hombre excreta solamente limitadas cantidades de ácido úrico. Por esto a menos que el ingreso de ácidos nucleicos sea limitado la concentra-



ción de ácido úrico en el cuerpo forma elevadas y extendidas concentraciones que causan dolencias tales como artritis. Un ingreso de ácidos nucleicos de aproximadamente 2 gramos por día parece ser aceptado por la mayoría de los nutrientes.

5 Los materiales proteínicos varían considerablemente en la cantidad de ácidos nucleicos que contienen. Los microorganismos son una comparativamente nueva fuente de tal material. Los microorganismos unicelulares, tales como por ejemplo las levaduras tienen un relativamente elevado contenido de ácidos
10 nucleicos, por ejemplo del orden de 8 al 10 por cien por peso basado en el peso del material seco. El hígado es otro material proteínico que tiene un elevado contenido de ácidos nucleicos, por ejemplo de aproximadamente 50 a 100 miligramos por 100
15 gramos de tejido fresco. Se han aportado métodos para reducir la cantidad de ácidos nucleicos en los microorganismos y en particular en las levaduras. Uno de estos métodos comprende los pasos de suspender todas las células del microorganismo en una solución alcalina acuosa a una elevada temperatura por ejemplo por contracción de las células con hidróxido sódico e
20 hidróxido amónico. Los pH están en el orden de 7,5 a 12 y las temperaturas están en el orden de 30°C a 45°C y 90°C a 125°C.

El objeto de estos procedimientos es obtener la máxima reducción en la cantidad de ácidos nucleicos con una mínima pérdida de proteína. Nosotrossahora hemos comprobado que la
25 cantidad de ácidos nucleicos separada puede ser aumentada tratando el material con un solvente orgánico antes del tratamiento con álcali acuoso facilitando moderadamente las condiciones alcalinas a usarse para ejecutar una reducción dada en áci-



do nucleico contenido. Además nosotros hemos comprobado que el pretratamiento con un solvente orgánico produce un producto inodoro. Este último punto es particularmente significativo cuando el material proteínaceo es un microorganismo, tal como una levadura, que ha sido producido por cultivo del microorganismo es un hidrocarburo tal como un gas-oil con fuente de carbono en presencia de un medio nutriente acuoso y un gas conteniendo oxígeno libre. El tratamiento alcalino de tal material en ausencia de un pretratamiento con solvente da un producto de olor picante.

10 En consecuencia, la presente invención es un procedimiento para reducir la cantidad de ácidos nucleicos presentes en un material proteínaceo el cual proceso comprende el tratamiento del material con un solvente orgánico y después sometimiento del material tratado con el solvente a un álcali acuoso bajo condiciones que so-

15 lubilizan los ácidos nucleicos.

Preferiblemente el material proteínaceo es un microorganismo, por ejemplo un microorganismo producido por cultivo en un sustrato hidrocarburo en presencia de un medio nutriente acuoso y un gas conteniendo oxígeno libre.

20 Los microorganismos preferidos son las levaduras, por ejemplo hidrocarburo utilizando levaduras del género *Candida*, tal como hidrocarburo utilizando linajes de *Candida tropicalis* o *Candida lipolytica*.

Métodos de desarrollo hidrocarburo utilizando levaduras están descritos en las patentes británicas, 1.049.065, 1.049.066, 1.049.067 y 1.059.891.

25 Substratos convenientes en los cuales el hidrocarburo utilizando levaduras puede desarrollarse son sustratos que consisten substancialmente en su utilidad de parafinas normales, o particu-



larmente de parafinas normales por ejemplo fracciones gas-pil de petróleo crudo.

5 El efecto del solvente en el material proteinaceo parece producirse en el componente proteínico bajo la susceptible descomposición de los compuestos solubles por el subsiguiente tratamiento con álcali. El tratamiento con solvente parece modificar la estructura física de la proteína. El puro resultado es reducir la cantidad de proteína malgastada en el tratamiento álcali.

10 El solvente orgánico puede ser alcohol, cetona, hidrocarburo, o compuesto halogenado orgánico. Un solvente conveniente es un alcohol y en particular un alcohol C_1 a C_4 . Los alcoholes C_3 fácilmente obtenibles, propanol y isopropanol son particularmente convenientes. Normalmente cuando el solvente es un alcohol el es usado mezclado con agua por ejemplo en proporciones de agua a solvente del orden de 1:4 a 1:10. Mezclas azeotrópicas de isopropanol y agua son particularmente útiles.

15 El tratamiento solvente puede ser efectuado mezclando o lavando el material proteinaceo con el solvente. Un método conveniente es mezclar el material proteinaceo con el solvente y agitar la mezcla. Son preferidas las extracciones técnicas conocidas de solvente a contracorriente. Las temperaturas de tratamiento están preferiblemente en el orden de 30 a 100°C y más preferiblemente en el orden de 30 a 70°C.

25 Preferiblemente el material proteinaceo a ser tratado debe contener a lo menos el 20% por peso de agua y más preferiblemente 100 a 200% por peso de agua basado en el peso del material seco. Esto es el peso del material después de secado a una temperatura de 120°C.



El solvente es usualmente separado del material antes del tratamiento con álcali. Prefemiblemente a lo menos 20 per cien por peso de agua en relación al peso del material seco debe mantenerse en asociación con el material mientras el solvente está siendo separado. El solvente puede ser separado sometiendo el material a una temperatura elevada y/o presión reducida. Deben usarse temperaturas relativamente suaves y la temperatura debe ser inferior que aquella en la cual la proteína es desnaturalizada. Temperaturas del orden de aproximadamente 110°C pueden ser usadas. Además de separar el solvente este tratamiento seca de modo efectivo el material.

El tratamiento álcali puede efectuarse usando métodos conocidos. En la práctica del material proteínaceo es usualmente secado antes del tratamiento con álcali. Una forma importante del tratamiento es la concentración de álcali presente en relación con el peso de proteína. La concentración de álcali en relación al peso de proteína para dar una reducción deseada en la cantidad de ácidos nucleicos en una cantidad dada de material proteínaceo puede ser determinada empíricamente por simples experimentos para cada material y condiciones establecidas. Por ejemplo cuando el material proteínaceo es una levadura que tiene un contenido de ácidos nucleicos del orden de 8 por cien por peso de un peso seco base y el deseado contenido de ácidos nucleicos es aproximadamente 2,0 por cien por peso una concentración conveniente de álcali estará en el orden 0,01 a 0,1N para aproximadamente 100 gramos por litro peso seco de levadura.



El pH de la solución álcali-usada en el tratamiento alcalino es preferiblemente desde 8,5 a 9,5.

El álcali es normalmente ya un hidróxido de un metal alcalino, por ejemplo hidróxido sódico o potásico o amoníaco o hidróxido amónico.

La temperatura preferida puede variar para el tratamiento alcalino de 50°C a 90°C, y preferiblemente de 60°C a 80°C.

La duración de tratamiento puede ser de orden de 5 a 60 minutos y normalmente es de aproximadamente 30 minutos.

El tratamiento puede efectuarse a la presión atmosférica. Preferiblemente ha de haber la suficiente agitación para mantener una mezcla homogénea.

Después de completado el tratamiento álcali, las proteínas que tienen una reducida cantidad de ácidos nucleicos pueden ser recuperadas como un material sólido por cualquier técnica para separación de sólidos de los líquidos. Algunos ejemplos de técnicas convenientes son la de centrifugación, filtración o sedimentación.

Después de completada la etapa de tratamiento álcali y la etapa de neutralización con ácido si se efectúa, la proteína es preferiblemente lavada con agua para separar las sales alcalinas residuales y ácidos nucleicos solubilizados. El lavado con agua puede efectuarse por suspensión de la proteína en agua y agitación, preferiblemente una cantidad de agua sustancialmente igual al peso de proteína es la usada. Después de lavada la proteína puede ser separada de la suspensión por ejemplo por centrifugación, filtración o sedimentación.

La fase acuosa que es separada de la proteína sólida por

423262



- 7 -

las técnicas precedentes contiene ácidos nucleicos solubilizados que si se desea pueden ser recuperados por técnicas conocidas tales como por ejemplo precipitación en un medio ácido, ósmosis inversa, ultra filtración, diálisis o ataque enzimico.

- 5 La invención es a continuación ilustrada a título de ejemplo sin carácter alguno limitativo en los siguientes Ejemplos.

EJEMPLO 1

10 Un hidrocarburo utilizando linaje de la levadura *Candida tropicalis* fué cultivado en un gas-oil pesado comprendiendo aproximadamente 15% por peso de parafinas de cadena recta como el sustrato carbono presencia de un medio nutriente acuoso y un gas conteniendo oxígeno libre. La levadura así producida fué separada del caldo de cultivo y deshidratada por aspersión. La levadura deshidratada por aspersión fué tratada con una mezcla 15 isopropanol/agua, 88/12 volumen/volumen, en un extractor contracorriente. El tiempo de residencia de la levadura fué 30 minutos. La proporción relativa de flujo de levadura a solvente fué 1/10 volúmenes y la temperatura de tratamiento fué 70°C.

20 La levadura tratada con solvente fué luego secada a 110°C durante 3 horas. 1 kilogramo de levadura seca tratada con solvente fué mezclada con 10 litros de hidróxido potásico 0.05N. La mezcla fué agitada en un recipiente con un agitador Mexitz a 1500 revoluciones por minuto y mantenida a 80°C durante 30 minutos. La suspensión así formada fué centrifugada para separar un sedimento conteniendo proteína de levadura de una fracción acuosa conteniendo ácidos nucleicos solubilizados. El sedimento que tenía un contenido de materia seca de 30 a 40 por cien por peso fué re-suspendido en agua 1 parte por peso ~~1~~ volumen de agua, la suspensión agitada durante 10 minutos con un agitador que iba a una velocidad de 1500 revoluciones por minuto y luego centrifugado. El 25 sedimento fué luego secado a 120°C en un secador de tambor rot.



tatorio Mitchell a 4 revoluciones por minuto.

El porcentaje de pérdida global de material proteináceo durante el tratamiento fué del 10 por ciento.

El contenido de ácidos nucleicos de la levadura a diferentes etapas del procedimiento se dan en la Tabla 1.

T A B L A 1

	levadura no tratada a deshidratación astringente	levadura tratada con solvente	levadura seca después del tratamiento con alcali	levadura seca después del lavado con agua
Contenido de ácidos nucleicos				
Porcentaje por peso seco de levadura	8	9	3	2

Los ácidos nucleicos solubilizados presentes en la fracción acuosa que son separados de la proteína sólida pueden ser recuperados de acuerdo con cualquiera de los siguientes métodos:

La fracción acuosa conteniendo ácidos nucleicos solubilizados fué dividida en 4 porciones:

- 5 (1) El pH de una porción fué ajustado a 3,5 por adición de ácido sulfúrico. Después de acidificación y 3 horas de sedimentación el residuo fué centrifugado y lavado con agua a temperatura ambiente. El residuo lavado contenía los ácidos nucleicos separados y algunas proteínas. El residuo tenía la siguiente composición expresada como un porcentaje por peso en una base seca:

10 Ácidos nucleicos 50; proteína 35; polisacáridos 15.

- (2) Una segunda porción fué continuamente dializada por



cuenta de agua a temperatura ambiente para eliminar sales y reducir la concentración o material orgánico.

La fase acuosa tenía una composición en peso antes de la diálisis de 35% de proteína, 50% de ácidos nucleicos y 15% de polisacáridos, y después de la diálisis tenía una composición de 35% de proteínas, 35% de ácidos nucleicos y 30% de polisacáridos. La fracción no dializada contenía los ácidos nucleicos que fueron precipitados como arriba.

(3) Una tercera porción fué tratada por ósmosis reversiva a temperatura ambiente. En este caso el agua fué separada y la solución líquida recuperada fué precipitada como arriba para obtener los ácidos nucleicos.

(4) Una cuarta porción fué ultracentrifugada a temperatura ambiente. La solución líquida recuperada contenía ácidos nucleicos, algunas proteínas y polisacáridos de elevado peso molecular.

EJEMPLO 2

Una muestra de la levadura *Candida tropicalis* fué obtenida usando el cultivo técnico y tratamiento solvente descrito en el Ejemplo 1. La levadura tratada con solvente, de mezcla azeotrópica isopropanol/agua de 50 por cien por peso en relación al peso seco de levadura. Esta muestra húmeda fué luego tratada con álcali de acuerdo con el proceder descrito en el Ejemplo 1. El contenido de ácidos nucleicos de la levadura a diferentes etapas del proceso se dá en la Tabla 2. Hubo aproximadamente un 20 por cien menos de proteína durante todo este tratamiento.



T A B L A 2

	Levadura húmeda sin tratar	Levadura tratada con solvente.	Levadura seca después del tratamiento alcalino.	Levadura seca después de lavada con agua.
Acido nucleico contenido % por peso en levadura seca	8	9	4	2

EJEMPLO 3

Un hidrocarburo utilizando linaje de la levadura *Candida lipolytica* fué cultivado en parafinas normales de gas-oil en presencia de un medio nutriente acuoso y un gas conteniendo oxígeno libre.

5 La levadura fué separada del caldo y secada, y fué tratada con 6 volúmenes de una azeotrópica mezcla de isopropanol/agua durante 30 minutos a 80°C enfriada y el solvente decantado. Las levaduras sólidas fueron pastadas nuevamente con un volumen similar de azeotrópica, bastante para clarificarlas y decantadas. El proceso fué repetido y el producto fué filtrado para separar solvente y los sólidos secados bajo vacío a 60°C durante la noche.

15 4 kilogramos de levadura seca fueron suspendidos en 20 litros de agua, el pH ajustado a 9 con hidróxido sódico, y calentados a 60°C durante 30 minutos con inyección directa de vapor para aumentar el volumen a 28 litros. La pasta fué centrifugada y un volumen igual de agua adicionada a la crema centrifugada. El pH fué ajustado a 7.0 y la pasta centrifugada. Los sólidos fueron lavados con agua con uno a tres lavados y pasterizados a 90°C



El contenido de ácido nucleico de la levadura se reduce desde 9.2% por peso a 2.4% por peso por este procedimiento. Los porcentajes basándose en el peso de la levadura seca.

EJEMPLO 4

El ejemplo 3 fué repetido usando una muestra diferente de levadura. El ácido nucleico contenido fué reducido desde 9.0% a 2.0% en peso. La cantidad de hidróxido sódico requerido para ajustar el pH a 9 fué establecida en 1 litro de álcali 2.7N necesario para 20 litros de pasta de concentración 200g/l de levadura.

EXPERIMENTO COMPARATIVO

El ejemplo 4 fué repetido sin la extracción usando el azetropico isopropanol/agua. El contenido de ácido nucleico del producto fué 3.4% por peso.

NOTA

Por la patente de invención a que se refiere la presente memoria descriptiva se REIVINDICA la propiedad y la explotación de:

1.- Un procedimiento para reducir la cantidad de ácidos nucleicos en un material proteínico, caracterizado por el hecho que consiste en tratar el material con un solvente orgánico y después someter el material tratado con el solvente a un álcali acuoso bajo condiciones en las cuales los ácidos nucleicos solubilizan.

2.- Un procedimiento tal como el especificado en 1, caracterizado por el hecho que el material proteínico es un microorganismo.

3.- Un procedimiento tal como el especificado en 2, caracterizado por el hecho que el material proteínico es un microor-

Res

423262



- 12 -

ganismo que ha sido producido por cultivo del microorganismo en un hidrocarburo en presencia de un medio nutriente acuoso y un gas conteniendo oxígeno libre.

4.- Un procedimiento tal como el especificado en 3, caracterizado por el hecho que el hidrocarburo consiste total o parcialmente de parafinas normales.

5.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado por el hecho que el microorganismo es una levadura.

6.- Un procedimiento tal como el especificado en 5, caracterizado por el hecho que la levadura es del género *Candida*.

7.- Un procedimiento tal como el especificado en 6, caracterizado por el hecho que la levadura es un hidrocarburo que utiliza linaje de *Candida lipolytica* o *Candida tropicalis*.

8.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado por el hecho que el solvente orgánico es un alcohol, cetona, un hidrocarburo o un compuesto halogenado orgánico.

9.- Un procedimiento tal como el especificado en 8, caracterizado por el hecho que el alcohol es un C1-4 alcohol.

10.- Un procedimiento tal como el especificado en 9, caracterizado por el hecho que el alcohol es mezclado con agua.

11.- Un procedimiento tal como el especificado en 10, caracterizado por el hecho que la proporción de volumen de agua a alcohol es 1:4 a 1:10.

12.- Un procedimiento tal como el especificado en 11, caracterizado por el hecho que el solvente orgánico es una mezcla azeotrópica de isopropanol y agua.

423262



- 13 -

13.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, caracterizado por el hecho que el material proteináceo es tratado con el solvente orgánico por mezclado con éste y agitación a una temperatura de 30 a 70°C.

5

14.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, caracterizado por el hecho que el material proteináceo contiene a lo menos 20% por peso de agua, basado en el peso del material seco.

10

15.- Un procedimiento, tal como el especificado en 14, caracterizado por el hecho que el material proteináceo contiene de 100 a 200% por peso de agua, basado en el peso del material seco.

15

16.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, caracterizado por el hecho que antes del tratamiento con el álcali el material proteináceo es secado.

20

17.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, caracterizado por el hecho que el material tratado con solvente es sometido a una solución alcalina acuosa de concentración 0.01 a 0.1N por 100 gramos de peso de levadura seca.

25

18.- Un procedimiento tal como el especificado en las reivindicaciones 1-17, caracterizado por el hecho que el pH del alcali acuoso es 8.5-9.5.

19.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, caracterizado por el hecho que el álcali es hidróxido potásico, amoniaco o hidróxido amónico.

Re



5

20.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, caracterizado por el hecho que el material tratado con solvente es sometido a un álcali acuoso a una temperatura de 50 a 90°C.

21.- Un procedimiento tal como el especificado en 20, caracterizado por el hecho que el material tratado con solvente es sometido a un álcali acuoso a una temperatura de 60 a 80°C.

10

22.- Un procedimiento tal como el especificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, caracterizado por el hecho que después de someter el material tratado con solvente a un álcali acuoso de la proteína que tiene un contenido reducido de ácido nucleico es recuperada como un material sólido.

15

23.- Un procedimiento tal como el especificado en 22, caracterizado por el hecho que el material proteínico recuperado con un sólido es lavado con agua.

20

24.- Un procedimiento tal como el especificado en 23, caracterizado por el hecho que el material recuperado como un sólido es lavado con agua suspendiendo el material en ésta a una proporción en peso de sustancialmente una parte por peso del material a 1 parte por peso de agua.

25.- "Un procedimiento para reducir la cantidad de ácidos nucleicos en un material proteínico".

Consta.

423262



Consta la presente memoria descriptiva de quince hojas
foliadas, escritas por una sola cara.

Barcelona, 7 de Febrero de 1974.

A large, stylized handwritten signature or mark, possibly a name or initials, written in dark ink.

A small handwritten mark or signature, possibly a name or initials, written in dark ink.