



ESPAÑA

19 ES	21	22	10 AT
NÚMERO 460877			
FECHA DE PRESENTACION 20-7-77			

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES: 51 NÚMERO	52 FECHA	53 PAIS
P 26 33 666.3	27-7-76	Rep.Federal Alemana

47 FECHA DE PUBLICIDAD	54 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12C // A23K	

54 TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO PARA DISMINUIR EL CONTENIDO DE LIPIDOS Y ACIDOS NUCLEICOS EN MASAS CELULARES MICROBIANAS"

71 SOLICITANTE (ES)
HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT (HOE 76/F 171)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
D-6230 Frankfurt/Main 80, República Federal Alemana

72 INVENTOR (ES)
Dr. Kerten Schlingmann y Dr. Laslo Vértesy.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 66.105)

1 El invento concierne a un procedimiento para dis-
minuir la cantidad de lípidos y de ácidos nucleicos, que es
5 tá contenida en células de microorganismos. Cada célula con-
tiene hidratos de carbono, proteínas, lípidos y ácidos nu-
cleicos. La posibilidad de utilización de masas celulares -
microbianas como alimentos y piensos es afectada negativa-
mente por un contenido de ácidos nucleicos y lípidos.

10 Un contenido de ácidos nucleicos es peligroso, ya
que conduce a estados patológicos (gota o artrosis, piedras
en la orina). Los lípidos limitan la capacidad para almace-
namiento por enranciamiento y perjudican el sabor.

15 Es misión del presente invento, por lo tanto, dis-
minuir el contenido de lípidos y ácidos nucleicos en masas
celulares microbianas. Según procedimientos conocidos, los
lípidos son extraídos por disolución desde las paredes celu-
lares y las membranas mediante disolventes orgánicos, o son
saponificados por tratamiento con álcalis acuosos.

20 Un procedimiento conocido para extraer los lípi-
dos por disolución a partir de microorganismos trabaja con
mezclas de metanol y cloroformo. El procedimiento es caro y
puede conducir a productos tóxicos. Extracciones de lípidos
con mezclas de alcohol y agua (de acuerdo con la DT-OS - -
2.405.593 o la DT-OS 2137 038) son mal apropiadas para bac-
terias y también son costosas en la realización a escala --
25 técnica.

1 Otros procedimientos conocidos para empobrecer -
en ácidos nucleicos y en lípidos a masas celulares micro--
bianas, utilizan la disgregación alcalina a temperaturas -
5 elevadas. En este caso es desventajosa la puesta en liber-
tad de los ácidos grasos libres que resultan en la hidrólí-
sis, los cuales se separan juntamente con la proteína.

 Además de ello, una parte de los aminoácidos - -
esenciales contenidos en la proteína, por ejemplo lisina,
se transforman en un estado no aprovechable por parte del
10 organismo.

 Se ha encontrado ahora un procedimiento para dis-
minuir el contenido de lípidos y ácidos nucleicos en masas
celulares microbianas, que está caracterizado porque se --
trata a las masas celulares con una mezcla de extracción a
15 base de amoníaco o hidróxido de amonio y un disolvente or-
gánico de la fórmula general I



20 en donde R_1 y R_2 significan hidrógeno y n representa los -
números uno, dos o tres, o en donde R_1 significa el grupo
hidroxi y R_2 significa hidrógeno, metilo o etilo y n repre-
senta los números dos o tres, y tras separar la mezcla de
extracción se lava con agua el residuo de la masa celular,
25 se separa la fase acuosa y se seca - eventualmente después

1 de extracción con un disolvente orgánico de la fórmula general I—.

5 Como masas celulares microbianas se utilizan preferentemente microorganismos, que son producidos por ejemplo por cultivo sobre alcohol o n-parafinas en presencia de un medio nutricio acuoso y de un gas que contiene oxígeno libre. Como microorganismos se prefieren bacterias, levaduras y hongos.

10 Ejemplos de tales microorganismos son bacterias que consumen metanol de la familia Methylomonas, por ejemplo Methylomonas clara ATCC 31226, o levaduras tales como Candida Lipolytica ATCC 20.383, que pueden ser obtenidas mediante cultivo sobre n-parafinas en presencia de un medio nutricio acuoso.

15 También pueden utilizarse micelios secos de hongos. Este material celular puede ser retirado de la recuperación de antibióticos, por ejemplo, a partir de fermentaciones de penicilina, después de que hubo sido extraído el antibiótico.

20 Como disolventes de la fórmula I entran en consideración alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol e isopropanol. Se prefieren metanol y etanol, especialmente metanol. Aparte de los alcoholes mencionados, son apropiados glicoles y sus monoéteres de la fórmula I, a saber glicol y monometilglicol.

25

1 El amoníaco puede ser añadido a los disolventes
mencionados en forma de gas (NH_3) o en forma de solución -
acuosa concentrada (NH_4OH). La elección se efectúa depen--
diendo del contenido de agua del material celular seco así
5 como dependiendo de la cantidad y del contenido de agua --
del disolvente empleado. El NH_4OH es apropiado en el caso
de masas celulares con pequeño contenido de humedad (0 -
15%), y por el contrario el NH_3 es más apropiado en el ca-
so de masas celulares con contenido de agua más elevado --
10 (10 - 30%).

La porción de los lípidos, que es eliminada por
la extracción con amoníaco y disolvente, depende del conte-
nido total de agua, que es referido en % en peso a la can-
tidad utilizada de disolvente, y de la concentración de --
15 NH_3 en % en peso, referida al disolvente empleado.

Se pudieron lograr resultados de ensayos espe- -
cialmente buenos con una proporción ponderal de masa celu-
lar a disolvente de 1:3 hasta 1:6 en el caso de metanol y
etanol, y de 1:8 hasta 1:12 en el caso de propanol, glicol
20 y los monoglicoléteres. La concentración de amoníaco, refe-
rida a la cantidad de disolvente, fue de 1 a 10% en peso,
preferiblemente de 1 a 5%. La suma de las cantidades de --
agua, que provienen de la masa celular, del disolvente y -
eventualmente del amoníaco acuoso fue de 0 - 30% en peso,
25 preferentemente 0 - 20% en peso, especialmente 0 - 10% en

1 peso, referido a la cantidad empleada de disolvente.

5 Cuando se trabaja a escala técnica se puede re--
nunciar a un secado de las células después de la fermenta--
ción hasta quedar sólo un pequeño contenido residual de --
agua, de 4% o menor. Es suficiente llevar la masa celular
a un peso en seco de células tal que después de añadir la
cantidad necesaria de disolvente el contenido total de --
agua se encuentre en el margen óptimo; eventualmente, se --
añadirá al disolvente NH_3 gaseoso.

10 La disolución de las grasas a partir de las ma--
sas celulares microbianas se lleva a cabo suspendiendo el
material celular en el disolvente orgánico de la fórmula I
e introduciendo NH_3 o añadiendo NH_4OH . Es conveniente mez--
clar a fondo la suspensión por agitación. Las temperaturas
15 de tratamiento se encuentran en general en el margen de --
-20° hasta +60°C, siendo preferido un margen de +5° hasta
+50°C y especialmente de +10° hasta +30°C. La duración del
tratamiento es de 5 a 120 minutos y se encuentra preferi--
blemente en 25 a 35 minutos. El tratamiento es llevado a --
20 cabo en general a presión normal.

25 Después de terminado el tratamiento con disolven--
te y amoníaco el material celular obtenido (proteína) es --
separado del disolvente de acuerdo con un procedimiento --
cualquiera, tal como centrifugación, filtración y sedimen--
tación.

1 Se prefiere la filtración. El material celular -
sólido obtenido puede ser tratado de nuevo para la elimina-
ción más completa posible de los lípidos con uno de los di-
solventes orgánicos mencionados.

5 El residuo puede ser secado para la eliminación
de restos de disolvente y amoníaco. Convenientemente esto
se lleva a cabo a presión reducida, preferiblemente a - -
80-150 Torr, y a temperatura elevada, preferiblemente - -
40-50°C. El producto desengrasado y secado de este modo es
10 inodoro.

 La fase líquida separada del material celular só-
lido, de acuerdo con el procedimiento precedentemente men-
cionado, contiene amoníaco y lípidos disueltos. El disol-
vente empleado puede ser separado de las grasas mediante -
15 destilación en vacío y puede ser empleado de nuevo.

 A continuación las masas celulares desengrasadas
y eventualmente secadas son recogidas en agua. Se prefie--
ren cantidades de agua que están con respecto a la masa ce-
lular en la proporción ponderal de 1:1 hasta 1:30, espe- -
20 cialmente de 1:5 hasta 1:15. La cantidad de agua se dosifi-
cará por lo menos de manera tal que sea posible una agita-
ción de la suspensión.

 El valor del pH durante el tratamiento con agua
debe encontrarse en el margen de 5 a 8,5, preferiblemente
25 de 6 a 7,5, y eventualmente es ajustado a este margen. Es-

1 to es necesario especialmente cuando se utilizan masas ce-
lulares no secadas o no totalmente secadas, procedentes de
la primera etapa, que entonces contienen además también --
cantidades residuales de amoníaco, lo cual puede conducir
5 a un valor de pH demasiado alto.

Esta extracción con agua de los ácidos nucleicos,
sales, polisacáridos y metabolitos secundarios solubles en
agua, se realiza en general en un margen de temperaturas -
de 30 a 95°C a presión normal. Se prefieren temperaturas de
10 40 a 70°C, y especialmente preferidas son las de 50 a 60°C.
La duración de la extracción, dependiendo de la temperatu-
ra de extracción y la cantidad de agua, puede ser de 5 a -
120 minutos, y se logran buenos resultados con un tiempo -
de extracción de 25 a 45 minutos. Para la separación de --
15 componentes sólidos y líquidos la suspensión es centrifuga
da, preferiblemente a temperaturas de 10-30°C. Otros proce-
dimientos apropiados de separación son sedimentación y fil-
tración.

Para la separación más sencilla de la masa celu-
20 lar, se añade ventajosamente al agua de la segunda etapa -
hasta 20% en peso, preferiblemente 5 a 15% en peso, de un -
alcohol inferior, tal como etanol, metanol, y preferible-
mente metanol.

La fase sólida es liberada de restos de líquido
25 según procedimientos habituales, tales como liofilización,

1 secado en vacío o secado por atomización. El producto po--
see agradables propiedades de olor, un color más claro que
el material de partida, y una capacidad fijadora de agua --
especialmente buena. Mediante la eliminación de los lípi--
5 dos y ácidos nucleicos éste es especialmente apropiado pa--
ra la preparación de alimentos y piensos.

Así, en el caso del producto de acuerdo con el --
invento se eliminan los lípidos hasta un contenido resi--
dual de 0,5 a 3,5% en peso, y se eliminan los ácidos nu--
10 cleicos hasta un contenido residual de 0,5 a 4,5% en peso.

El procedimiento de acuerdo con el invento evita
las desventajas de los procedimientos conocidos tales como
tratamiento con disolventes o disgregación alcalina. No se
necesitan hidrocarburos clorados. El desengrasado con mez--
15 clas de amoníaco y disolventes es, especialmente en el ca--
so de bacterias, esencialmente más completo que en el caso
de tratamiento de la masa celular con mezclas de disolven--
te y agua. Se evitan márgenes extremados de temperatura y
de pH, que disminuyen la posibilidad de utilización del --
20 producto. El consumo de energía es menor que en los proce--
dimientos de disgregación alcalina conocidos. El enriqueci--
miento en proteínas se logra sin que resulten grandes can--
tidades de sales de neutralización.

La fase acuosa separada del material celular só--
25 lido contiene, además de otros componentes solubles en --

1 agua, los ácidos nucleicos, que pueden ser recuperados de
acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo mediante
precipitación en medios ácidos, ultrafiltración, diálisis
o tratamiento con enzimas.

5 El invento es explicado mediante los siguientes
ejemplos.

Ejemplo 1

10 Se cultiva en condiciones aerobias *Methylomonas*
clara ATCC 31226 en una solución nutritiva que contiene me-
tanol como único manantial de carbono, amoníaco, como úni-
co manantial de nitrógeno, fosfato, sales de hierro y mag-
nesio, y otros elementos traza usuales. La masa celular --
bacteriana producida de este modo fue separada de la solu-
15 ción y sometida al secado por atomización.

100 g de esta masa celular fueron mezclados con --
300 g de metanol. Con agitación de la suspensión se intro-
dujeron y disolvieron 10 g de NH_3 gaseoso. Por enfriamien-
to se mantuvo la temperatura a $25^\circ - 35^\circ\text{C}$ durante la intro-
20 ducción. La mezcla de metanol, amoníaco y masa celular fue
agitada durante 30 minutos a 20°C .

Para la separación de la fase sólida y la fase --
líquida, se filtró y el residuo sólido se lavó una vez con
300 ml de metanol. Después de filtración renovada ambos --
25 productos filtrados fueron reunidos. Esta solución de co--

1 lor pardo contenía los lípidos de la sustancia de partida
empleada. Se eliminaron metanol y amoniaco mediante desti-
lación en vacío (100 Torr, 40°C). El residuo, que ascendía
5 a 9,5% en peso del material celular empleado, era una pas-
ta de color pardo oscuro, maloliente, que consistía en áci-
dos grasos libres, glicéridos, fosfolípidos y metabolitos
secundarios.

El residuo sólido, obtenido en la filtración, de
la masa celular extraída fue secado durante 5 horas a 40°C
10 en vacío (100 Torr). De este modo se pudieron obtener 90 g
de masa celular desengrasada, que era inodora y tenía un -
color más claro que el material de partida.

Para disminuir el contenido de ácidos nucleicos,
esta masa celular fue suspendida en 900 ml de agua. El va-
15 lor del pH de la suspensión homogeneizada por agitación --
fue de 6,9.

Después de aumentar la temperatura a 55°C se con-
tinuó agitando durante 20 minutos más, se enfrió a 30°C, y
se separó mediante centrifugación en fase sólida y en fase
20 líquida. El sedimento obtenido fue mezclado nuevamente con
900 ml de agua y agitado durante 10 minutos a 20°C. Des- --
pués de ello se centrifugó de nuevo y se secó el sedimento
bajo presión reducida.

El rendimiento fue de 65 g. El contenido de áci-
25 dos nucleicos había descendido desde originalmente 11,2% -

1 hasta 1,5%. El producto era inodoro en estado seco, y en -
estado humedecido con agua poseía un olor agradable y sim-
pático.

5 Los resultados de este y de los otros ejemplos -
se recopilan en las siguientes Tablas Ia y Ib.

Ejemplo 2

10 Como material de partida sirvió la misma masa ce-
lular bacteriana que se utilizó en el Ejemplo 1. Esta fue
sometida a las mismas etapas de procedimiento y condicio-
nes, pero en lugar de NH_3 gaseoso se utilizaron como reac-
tivo 30 ml de NH_4OH concentrado (al 33%).

Ejemplo 3

15 Se procedió como en el Ejemplo 2, pero se emplea-
ron 60 ml de NH_4OH concentrado (al 33%).

Ejemplo 4

20 En un modo de procedimiento como en el Ejemplo -
2, se utilizó etanol como disolvente en lugar de metanol.

Ejemplo 5

25 En un modo de procedimiento por lo demás igual -
al Ejemplo 3, se utilizó glicolmonometiléter en calidad de
disolvente en lugar de metanol.

1 Ejemplo 6

Se procedió como en el Ejemplo 2. En lugar de metanol se utilizó isopropanol como disolvente.

5 Ejemplo 7

Como material de partida se utilizó una masa celular a base de *Methylomonas clarus* tal como se describe en el Ejemplo 1. 100 g del producto secado por atomización fueron disgregados y desengrasados tal como se describe en el Ejemplo 1 (15 g de NH_3). No obstante, se renunció a secar totalmente el residuo. La torta de filtración filtrada con succión a fondo, con un contenido de sustancia sólida de 85% fue suspendida en 900 ml de agua. El valor del pH se ajustó a 8,9, debido al amoníaco que había quedado en la biomasa húmeda.

Las temperaturas de la suspensión fueron aumentadas a 65°C con agitación y después de 5 minutos se ajustó a 7,2 el valor del pH por adición de HCl. Después de ello se continuó agitando durante 15 minutos más a 65°C, luego se enfrió a 40°C y se centrifugó. El sedimento obtenido fue secado.

25 Ejemplo 8

Una cepa consumidora de hidrocarburos de la levadura *Candida lipolytica* ATCC 20.383 fue cultivada sobre --

1 n-parafinas en presencia de un medio nutricio acuoso y de
un gas que contenía oxígeno. La masa celular de levadura -
fue separada de la solución nutritiva y secada.

5 100 g de la masa celular secada de levadura fue-
ron suspendidos a la temperatura ambiente a presión normal
en 300 g de metanol y en esta mezcla se introdujeron 10 g
de NH_3 gaseoso en el transcurso de 15 minutos. En tal caso
la temperatura de la suspensión se mantuvo a 15°C por en--
friamiento. Después de introducción del gas, se continuó -
10 agitando a 22°C durante 20 minutos más y a continuación se
filtró a través de una frita de succión. La torta de fil--
tración fue mezclada a fondo una vez con 300 ml de metanol
sobre la frita y a continuación fue filtrada con succión.
Los dos productos filtrados fueron reunidos. La solución -
15 era amarilla y contenía los lípidos del material celular -
empleado. Se eliminaron metanol y NH_3 a presión reducida -
(14 Torr).

20 El residuo que quedó después de la segunda fil--
tración, que consistía en las células destruidas y desen--
grasadas del microorganismo, fue secado en una estufa de -
secado en vacío a 40°C (100 Torr) durante 5 horas. El pro-
ducto así obtenido tenía un color más claro que la masa ce-
lular de levadura utilizada inicialmente, y era inodoro.

25 Para disminuir el contenido de ácidos nucleicos
desde originalmente 7,5% en peso, referido al material de

1 partida, se suspendieron 100 g de la levadura desengrasada
y secada en una solución a base de 1 litro de agua destila-
da y 1.000 ml de metanol. Con agitación, la mezcla, con el
valor de pH de 6,8 que se ajustó, fue llevada durante 15 mi-
5 nutos a 50°C y separada por centrifugación en un sedimento,
que contenía la proteína de levadura y en una fase líquida
que contenía ácido nucleico solubilizado. El sedimento, des-
pués de un nuevo lavado a la temperatura ambiente, fue some-
tido a liofilización.

10 El contenido de ácidos nucleicos del material se-
cado había disminuido a 0,4% desde originalmente 7,5% en pe-
so.

Ejemplo 9

15 En un procedimiento igual que en el Ejemplo 8, se
emplearon etanol en lugar de metanol, y 60 ml de NH_4OH (al
33%) en lugar de 10 g de NH_3 gaseoso.

Ejemplo 10

20 Se cultivó de modo aerobio *Penicillium chrysoge--*
num ATCC 10.238 en una solución nutritiva que contenía lacto-
sa, líquido de maceración de maíz líquido, fosfato, carbona-
to y sulfato de magnesio según métodos usuales. Después de
separar la penicilina producida quedó el micelio, que en es-
25 tado secado sirvió como material de partida.

1 El procedimiento se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 8. En lugar de NH_3 se empleó NH_4OH al 33%. El micelio seco desengrasado fue lavado a 30°C con agua.

5

Ejemplo 11

Como material de partida sirvió la misma masa celular que se describe en el Ejemplo 10. En lugar de metanol se utilizó etanol. La temperatura durante la extracción con agua fue elevada a 85°C y se mantuvo en tal valor durante 15 minutos.

10

En las siguientes Tablas I se exponen los resultados de los Ejemplos 1 a 11.

15

20

25

1

Tabla I a

Eliminación de los lípidos

Ejem plo	100 g de masa celular empleada			Disolvente 300 g	NH ₃ (g) ó NH ₄ OH (al 33%, ml)		
	Tipo	% en peso de grasa	% en peso de ácidos nucleicos				
	1	Methyl- omonas	7	11,2	Metanol	NH ₃	10
10	2	"	7	11,2	Metanol	NH ₄ OH	30
	3	"	7	11,2	Metanol	NH ₄ OH	60
	4	"	7	11,2	Etanol	NH ₄ OH	30
15	5	"	7	11,2	Glicolmono metiléter	NH ₄ OH	60
	6	"	7	11,2	Isopropa nol	NH ₄ OH	30
	7	"	9,6	15,4	Metanol	NH ₃	15
20	8	Candida lipolyti ca	8,2	7,5	Metanol	NH ₃	10
	9	"	8,2	7,5	Etanol	NH ₄ OH	60
	10	Micelio seco	3,5	2,6	Metanol	NH ₄ OH	30
25	11	"	3,5	2,6	Etanol	NH ₄ OH	30

Tabla I b

Eliminación de los ácidos nucleicos

Ejem plo	Aguas de lavado			Masa celular obtenida		
	Cantidad (l)	PH	Tempera- tura (°C)	Cantidad (g)	Grasas % en peso	Acidos nu- cleicos % en peso
1	0,9	6,9	55	68	0,8	1,5
2	0,9	6,9	60	67	1,3	1,2
3	0,9	7,0	65	63	2,0	1,1
4	0,9	6,9	50	67	2,2	1,5
5	0,9	7,1	55	63	2,8	2,3
6	0,9	7,0	60	64	3,4	4,0
7	0,9	7,2	65	62	1,2	1,4
8	0,8	6,8	50	68	1,4	0,4
9	0,8	6,5	45	67	1,8	0,7
10	0,9	6,5	30	78	1,1	0,5
11	0,9	6,5	85	79	1,3	0,8

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para disminuir el contenido de lípidos y ácidos nucleicos en masas celulares microbianas, caracterizado porque se trata a las masas celulares con una mezcla de extracción a base de amoníaco o hidróxido de amonio y un disolvente orgánico de la fórmula general I

15



20

en donde R_1 y R_2 significan hidrógeno y n representa los números uno, dos o tres, o en donde R_1 significa el grupo hidróxido y R_2 significa hidrógeno, metilo o etilo y n representa los números dos o tres, y tras separar la mezcla de extracción se lava con agua el residuo de la masa celular, se separa la fase acuosa y se seca -- eventualmente después de extracción con un disolvente orgánico de la fórmula general I. --

25

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el contenido total de agua durante la --

1 disgregación asciende a 0 hasta 30% en peso, preferiblemen-
te 0 hasta 20% en peso, especialmente 0 hasta 10% en peso,
referido a la cantidad empleada de disolvente.

5 3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª
y 2ª, caracterizado porque el contenido de NH_3 durante la -
disgregación es de 1 a 10% en peso, preferiblemente 2 a 8%
en peso, especialmente 3 a 5% en peso, referido a la canti-
dad empleada de disolvente.

10 4ª.- Procedimiento para disminuir el contenido de
lípidos y ácidos nucleicos en masas celulares microbianas.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede y para los fines que se han especificado.

15 Esta Memoria consta de veinte hojas escritas a má-
quina por una sola cara.

Madrid, 20. JUL. 1977

P.A.

20 **Alberto de Ezaburu**
Por Poder



25

F C M

