



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 12 N 1/08
A 23 K 1/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

635 615

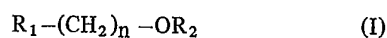
②① Gesuchsnummer:	9139/77	⑦③ Inhaber:	Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt a.M. 80 (DE)
②② Anmeldungsdatum:	22.07.1977		
③③ Priorität(en):	27.07.1976 DE 2633666	⑦② Erfinder:	Dr. Merten Schlingmann, Kelkheim (DE) Dr. Laslo Vértessy, Eppstein/Taunus (DE)
②④ Patent erteilt:	15.04.1983		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	15.04.1983	⑦④ Vertreter:	Brühwiler & Co., Zürich

⑤④ Verfahren zur Verminderung des Lipid- und Nucleinsäure-Gehaltes in mikrobiellen Zellmassen.

⑤⑦ Der Lipid- und Nucleinsäuregehalt in mikrobiellen Zellmassen wird vermindert, indem man die Zellmassen mit einer Extraktionsmischung aus Ammoniak oder Ammoniumhydroxyd und einem organischen Lösungsmittel der Formel I behandelt. Nach dem Abtrennen der Extraktionsmischung wäscht man den Rückstand der Zellmasse mit Wasser und trennt die wässrige Phase ab. Anschliessend wird der Rückstand - gegebenenfalls nach Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel der Formel I - getrocknet.

Die Substituenten in der Formel I haben die im Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen.

Anstelle einer Verbindung der Formel I kann Isopropanol als organisches Lösungsmittel verwendet werden.



PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Verminderung des Lipid- und Nucleinsäuregehaltes in mikrobiellen Zellmassen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Zellmassen mit einer Extraktionsmischung aus Ammoniak oder Ammoniumhydroxyd und einem organischen Lösungsmittel der Formel I



worin entweder R₁ und R₂ Wasserstoff bedeuten und n für eins, zwei oder drei steht, oder worin R₁ die Hydroxygruppe und R₂ Wasserstoff, Methyl oder Äthyl bedeuten und n für zwei oder drei steht, behandelt, und nach Abtrennen der Extraktionsmischung den Rückstand der Zellmasse mit Wasser wäscht, die wässrige Phase abtrennt und trocknet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man den Rückstand der Zellmasse nach der Abtrennung der wässrigen Phase und vor dem Trocknen einer Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel der Formel I unterwirft.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Gesamt-Wassergehalt während des Aufschlusses 0 bis 30 Gew.-%, vorzugsweise 0 bis 20 Gew.-%, insbesondere 0 bis 10 Gew.-%, bezogen auf die eingesetzte Lösungsmittelmenge, beträgt.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der NH₃-Gehalt während des Aufschlusses 1 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise 2 bis 8 Gew.-%, insbesondere 3 bis 5 Gew.-%, bezogen auf die eingesetzte Lösungsmittelmenge, beträgt.

5. Verfahren zur Verminderung des Lipid- und Nucleinsäuregehaltes in mikrobiellen Zellmassen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Zellmassen mit einer Extraktionsmischung aus Ammoniak oder Ammoniumhydroxyd und Isopropanol als organisches Lösungsmittel behandelt, und nach Abtrennen der Extraktionsmischung den Rückstand der Zellmasse mit Wasser wäscht, die wässrige Phase abtrennt und trocknet.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man den Rückstand der Zellmasse nach der Abtrennung der wässrigen Phase und vor dem Trocknen einer Extraktion mit Isopropanol unterwirft.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Gesamt-Wassergehalt während des Aufschlusses 0 bis 30 Gew.-%, vorzugsweise 0 bis 20 Gew.-%, insbesondere 0 bis 10 Gew.-%, bezogen auf die eingesetzte Lösungsmittelmenge, beträgt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der NH₃-Gehalt während des Aufschlusses 1 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise 2 bis 8 Gew.-%, insbesondere 3 bis 5 Gew.-%, bezogen auf die eingesetzte Lösungsmittelmenge, beträgt.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verminderung der Lipid- und Nucleinsäuremenge, die in Zellen von Mikroorganismen enthalten ist. Jede Zelle enthält Kohlehydrate, Proteine, Lipide und Nucleinsäure. Die Verwendbarkeit von mikrobiellen Zellmassen als Nahrungsmittel und Futtermittel wird durch einen Gehalt an Nucleinsäuren und Lipiden negativ beeinflusst.

Ein Nucleinsäuregehalt ist bedenklich, da er zu pathologischen Zuständen (Gicht, Harnsteine) führt. Lipide beschränken die Lagerfähigkeit durch Ranzigwerden und beeinträchtigen den Geschmack.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, den Lipid- und Nucleinsäuregehalt in mikrobiellen Zellmassen zu senken. Nach bekannten Verfahren werden die Lipide entweder aus

Zellwand und Membran durch organische Lösungsmittel herausgelöst oder durch Behandlung mit wässrigen Alkalien verseift.

Ein bekanntes Verfahren zum Herauslösen der Lipide aus Mikroorganismen arbeitet mit Gemischen aus Methanol und Chloroform. Das Verfahren ist aufwendig und kann zu toxischen Produkten führen. Lipidextraktionen mit Alkohol-Wasser-Gemischen (nach DT-OS 2 405 593 oder DE-OS 21 37 038) eignen sich schlecht für Bakterien und sind in der technischen Ausführung ebenfalls aufwendig.

Weitere bekannte Verfahren, mikrobielle Zellmassen nucleinsäure- und lipidarm zu machen, verwenden den alkalischen Aufschluss bei erhöhten Temperaturen. Nachteilig ist hierbei die Freisetzung der bei der Hydrolyse entstandenen freien Fettsäuren, die sich zusammen mit dem Protein abscheiden.

Ausserdem geht ein Teil der im Protein enthaltenen essentiellen Aminosäuren, z.B. Lysin, in einen vom Organismus nicht verwertbaren Zustand über.

Es wurde nun ein Verfahren zur Verminderung des Lipid- und Nucleinsäuregehaltes in mikrobiellen Zellmassen gefunden, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man die Zellmassen mit einer Extraktionsmischung aus Ammoniak oder Ammoniumhydroxyd und einem organischen Lösungsmittel der Formel



worin entweder R₁ und R₂ Wasserstoff bedeuten und n für eins, zwei oder drei steht, oder worin R₁ die Hydroxygruppe und R₂ Wasserstoff, Methyl oder Äthyl bedeuten und n für zwei oder drei steht, behandelt und nach Abtrennen der Extraktionsmischung den Rückstand der Zellmasse mit Wasser wäscht, die wässrige Phase abtrennt und - gegebenenfalls nach Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel der Formel I - trocknet.

Anstelle eines organischen Lösungsmittels der Formel I kann erfindungsgemäss auch Isopropanol verwendet werden.

Als mikrobielle Zellmassen werden vorzugsweise Mikroorganismen, die z.B. durch Züchtung auf Alkohol oder n-Paraffinen in Gegenwart eines wässrigen Nährmediums und eines freien Sauerstoff enthaltenden Gases erzeugt sind, verwendet. Bevorzugt als Mikroorganismen werden Bakterien, Hefen und Pilze.

Beispiele für solche Mikroorganismen sind Methanol verwertende Bakterien der Gattung Methylomonas, z.B. Methylomonas clara ATCC 31226, oder Hefen wie Candida lipolytica ATCC 20383, die durch Züchtung auf n-Paraffinen in Gegenwart eines wässrigen Nährmediums erhalten werden können.

Pilztrockenmycelien können ebenfalls verwendet werden. Dieses Zellmaterial kann aus der Antibiotika-Gewinnung beispielsweise aus Penicillinfermentationen entnommen werden, nachdem das Antibiotikum extrahiert wurde.

Als Lösungsmittel der Formel I kommen Alkohole wie Methanol, Äthanol, n-Propanol in Betracht. Bevorzugt sind Methanol und Äthanol, insbesondere Methanol.

Ausser den genannten Alkoholen eignen sich Glykole und ihre Monoäther der Formel I, namentlich Glykol und Monomethylglykol. Als organisches Lösungsmittel eignet sich auch Isopropanol.

Ammoniak kann den genannten Lösungsmitteln gasförmig (NH₃) oder als konzentrierte wässrige Lösung (NH₄OH) zugesetzt werden. Die Wahl erfolgt im allgemeinen nach Wassergehalt des Zelltrockenmaterials sowie nach Menge und Wassergehalt des eingesetzten Lösungsmittels. NH₄OH eignet sich im allgemeinen bei Zellmassen mit geringem Feuchtigkeitsgehalt (0 bis 15%), NH₃ dagegen besser bei Zellmassen mit höherem Wassergehalt (10 bis 30%).

Der Anteil der Lipide, der durch die Extraktion mit Ammo-

niak und Lösungsmittel entfernt wird, hängt vom Gesamtwassergehalt ab, der in Gew.-% auf die verwendete Lösungsmittelmenge bezogen wird, und von der NH_3 -Konzentration in Gew.-%, bezogen auf das eingesetzte Lösungsmittel.

Besonders gute Versuchsergebnisse liessen sich bei einem Zellenmasse-Lösungsmittel-Gewichtsverhältnis von 1:3 bis 1:6 bei Methanol und Äthanol, und 1:8 bis 1:12 bei Propanol, Glykol und den Monoglykoläthern erzielen. Die Ammoniakkonzentration, bezogen auf die Lösungsmittelmenge, betrug bevorzugt 1 bis 10 Gew.-%, besonders vorzugsweise 2 bis 8 Gew.-%, insbesondere 3 bis 5 Gew.-%. Die Summe der Wassermengen, die herrühren aus Zellmasse, Lösungsmittel und gegebenenfalls aus wässrigem Ammoniak, betrugen bevorzugt 0 bis 30 Gew.-%, besonders bevorzugt 0 bis 20 Gew.-%, insbesondere 0 bis 10 Gew.-%, bezogen auf die eingesetzte Lösungsmittelmenge.

Beim Arbeiten im technischen Massstab kann auf eine Trocknung der Zellen nach der Fermentation bis auf einen geringen Restwassergehalt von 4% oder niedriger verzichtet werden. Es genügt, die Zellmasse auf ein solches Zellrockengewicht zu bringen, dass nach Zusatz der benötigten Lösungsmittelmenge der Gesamtwassergehalt im optimalen Bereich liegt; gegebenenfalls wird man dem Lösungsmittel gasförmiges NH_3 zusetzen.

Das Lösen der Fette aus den mikrobiellen Zellmassen wird im allgemeinen so durchgeführt, dass das Zellmaterial im organischen Lösungsmittel der Formel I suspendiert und NH_3 eingeleitet oder NH_4OH zugegeben wird. Zweckmässig ist das Durchmischen der Suspension durch Rühren. Die Behandlungstemperaturen liegen im allgemeinen im Bereich von -20 bis $+60$ °C, wobei ein Bereich von $+5$ bis $+50$ °C und insbesondere von $+10$ ° bis $+30$ °C bevorzugt ist. Die Behandlungsdauer beträgt im allgemeinen 5 bis 120 Minuten und liegt vorzugsweise bei 25–35 Minuten. Die Behandlung wird im allgemeinen bei Normaldruck durchgeführt.

Nach Beendigung der Lösungsmittel-Ammoniak-Behandlung wird das erhaltene Zellmaterial (Protein) nach beliebigen Verfahren wie Zentrifugieren, Filtration und Sedimentation vom Lösungsmittel getrennt.

Bevorzugt wird die Filtration. Das erhaltene feste Zellmaterial kann zur möglichst vollständigen Entfernung der Lipide mit einem der genannten organischen Lösungsmittel nochmals behandelt werden.

Der Rückstand kann zur Entfernung von Lösungsmittelresten und Ammoniak getrocknet werden. Zweckmässig wird dies unter vermindertem Druck, vorzugsweise 80–150 Torr, und erhöhter Temperatur, vorzugsweise 40–50 °C, durchgeführt. Das so entfettete und getrocknete Produkt ist geruchlos.

Die nach dem vorstehend genannten Verfahren vom festen Zellmaterial abgetrennte flüssige Phase enthält Ammoniak und gelöste Lipide. Das eingesetzte Lösungsmittel kann durch Vakuumdestillation von den Fetten abgetrennt und wieder eingesetzt werden.

Anschliessend werden die entfetteten und gegebenenfalls getrockneten Zellmassen in Wasser aufgenommen. Bevorzugt sind Wassermengen, die zur Zellmasse im Gew.-Verhältnis 1:1 bis 30:1, insbesondere 5:1 bis 15:1, stehen. Die Wassermenge wird im allgemeinen mindestens so bemessen, dass ein Rühren der Suspension möglich ist.

Der pH-Wert während der Wasserbehandlung soll im allgemeinen im Bereich von 5–8,5, bevorzugt 6–7,5, liegen und wird gegebenenfalls auf diesen Bereich eingestellt. Dies ist insbesondere dann notwendig, wenn nicht oder nicht vollständig getrocknete Zellmassen aus der ersten Stufe verwendet werden, die dann auch noch Restmengen an Ammoniak enthalten, was zu einem zu hohen pH-Wert führen kann.

Diese Extraktion der Nucleinsäuren, Salze, Polysaccharide und wasserlöslichen Sekundärmetabolite mit Wasser wird im allgemeinen in einem Temperaturbereich von 30–95 °C bei

Normaldruck durchgeführt. Bevorzugt sind Temperaturen von 40–70 °C, besonders bevorzugt 50–60 °C. Die Extraktionsdauer kann je nach Extraktionstemperatur und Wassermenge 5–120 Minuten betragen, gute Ergebnisse erzielt man mit 25- bis 45minütiger Extraktionszeit. Zur Trennung fester und flüssiger Bestandteile wird die Suspension, vorzugsweise bei Temperaturen von 10–30 °C, im allgemeinen zentrifugiert. Andere geeignete Trennverfahren sind Sedimentation und Filtration.

Zur einfacheren Abtrennung der Zellmasse wird vorteilhaft dem Wasser der zweiten Stufe bis zu 20 Gew.-%, vorzugsweise 5–15 Gew.-%, eines niederen Alkohols wie Äthanol, Methanol, vorzugsweise Methanol, zugesetzt.

Die feste Phase wird nach gängigen Verfahren wie Gefrier-, Vakuum- oder Sprühtrocknung von Flüssigkeitsresten befreit. Das Produkt besitzt angenehme Geruchseigenschaften, eine hellere Farbe als das Ausgangsmaterial und ein besonders gutes Wasserbindevermögen. Durch die Entfernung der Lipide und Nucleinsäuren eignet es sich besonders zur Herstellung von Nahrungs- und Futtermitteln.

So sind bei dem erfindungsgemäss hergestellten Produkt die Lipide im allgemeinen bis auf einen Restgehalt von 0,5 bis 3,5 Gew.-%, die Nucleinsäuren im allgemeinen bis auf einen Restgehalt von 0,5–4,5 Gew.-%, entfernt.

Das Verfahren gemäss der Erfindung vermeidet die Nachteile der bekannten Verfahren wie Lösungsmittelbehandlung oder alkalischer Aufschluss. Chlorierte Kohlenwasserstoffe werden nicht benötigt. Die Entfettung mit Ammoniak-Lösungsmittel-Gemischen ist, insbesondere bei Bakterien, wesentlich vollständiger als bei Behandlung der Zellmasse mit Lösungsmittel-Wasser-Gemischen. Extreme Temperatur- und pH-Bereiche, die die Verwendbarkeit des Produktes herabsetzen, werden vermieden. Der Energieaufwand ist geringer als bei den bekannten alkalischen Aufschlussverfahren. Die Proteinanreicherung gelingt ohne das Anfallen grosser Mengen von Neutralisationssalzen.

Die vom festen Zellmaterial abgetrennte wässrige Phase enthält neben anderen wasserlöslichen Bestandteilen die Nucleinsäuren, die nach bekannten Verfahren, z.B. durch Ausfällen in sauren Medien, Ultrafiltration, Dialyse oder Enzymbehandlung, gewonnen werden können.

Die Erfindung wird durch folgende Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Methylomonas clara ATCC 31226 wurde in einer Nährlösung enthaltend Methanol als einzige Kohlenstoffquelle, Ammoniak als einzige Stickstoffquelle, Phosphat, Eisen-, Magnesiumsalze und andere übliche Spurenelemente unter aeroben Bedingungen gezüchtet. Die dabei erzeugte Bakterienzellmasse wurde von der Lösung abgetrennt und der Sprühtrocknung unterworfen.

100 g dieser Zellmasse wurden mit 300 g Methanol versetzt. Unter Rühren der Suspension wurden 10 g NH_3 -Gas eingeleitet und gelöst. Durch Kühlen wurde die Temperatur während des Einleitens auf 25–35 °C gehalten. Das Gemisch aus Methanol, Ammoniak und Zellmasse wurde 30 Minuten bei 20 °C gerührt.

Zur Trennung der festen und flüssigen Phase wurde filtriert und der feste Rückstand einmal mit 300 ml Methanol gewaschen. Nach erneuter Filtration wurden beide Filtrate vereinigt. Diese braune Lösung enthielt die Lipide der eingesetzten Ausgangssubstanz. Methanol und Ammoniak wurden durch Vakuumdestillation (100 Torr, 40 °C) entfernt. Der Rückstand, der 9,5 Gew.-% des eingesetzten Zellenmaterials betrug, war eine dunkelbraune, übelriechende Paste, die aus freien Fettsäuren, Glyceriden, Phospholipiden und Sekundärmetaboliten bestand.

Der bei der Filtration erhaltene feste Rückstand der extrahierten Zellmasse wurde im Vakuum (100 Torr) bei 40 °C 5 Stunden getrocknet. Es konnten so 90 g entfettete Zellmasse

erhalten werden, die geruchlos war und eine hellere Farbe als das Ausgangsmaterial besass.

Zur Verminderung des Nucleinsäuregehaltes wurde diese Zellmasse in 900 ml Wasser suspendiert. Der pH-Wert der durch Rühren homogenisierten Suspension betrug 6,9.

Nach Erhöhung der Temperatur auf 55 °C wurde noch 20 Minuten weitergerührt, auf 30 °C abgekühlt und durch Zentrifugieren in feste und flüssige Phase getrennt. Das erhaltene Sediment wurde erneut mit 900 ml Wasser vermischt und 10 Minuten bei 20 °C gerührt. Danach wurde erneut zentrifugiert und das Sediment unter vermindertem Druck getrocknet.

Die Ausbeute betrug 65 g. Der Nucleinsäuregehalt war von ursprünglich 11,2% auf 1,5% gesunken. Das Produkt war in trockenem Zustand geruchlos, mit Wasser befeuchtet besass es einen sympathischen Geruch.

Das Ergebnis dieses und der weiteren Beispiele sind in den nachfolgenden Tabellen Ia und Ib zusammengefasst.

Beispiel 2

Als Ausgangsmaterial diente die gleiche Bakterienzellmasse wie in Beispiel 1 verwendet. Sie wurde den gleichen Verfahrensschritten und Bedingungen unterworfen, doch wurden statt gasförmigem NH_3 30 ml konzentriertes NH_4OH (33%ig) als Reagenz verwendet.

Beispiel 3

Es wurde wie in Beispiel 2 verfahren, jedoch wurden 60 ml konz. NH_4OH (33%ig) eingesetzt.

Beispiel 4

Bei einer Verfahrensweise wie in Beispiel 2 wurde statt Methanol Äthanol als Lösungsmittel verwendet.

Beispiel 5

Bei sonst gleicher Verfahrensweise wie in Beispiel 3 wurde statt Methanol Glykolmonomethyläther als Lösungsmittel verwendet.

Beispiel 6

Es wurde verfahren wie in Beispiel 2. Statt Methanol wurde i-Propanol als Lösungsmittel eingesetzt.

Beispiel 7

Als Ausgangsmaterial wurde eine Zellmasse aus *Methylobacterium clarus* wie in Beispiel 1 beschrieben verwendet. 100 g des sprühgetrockneten Produkts wurden wie in Beispiel 1 beschrieben aufgeschlossen und entfettet (15 g NH_3). Jedoch wurde auf die vollständige Trocknung des Rückstandes verzichtet. Der gründlich abgesaugte Filterkuchen mit einem Fettstoffgehalt von 85% wurde in 900 ml Wasser suspendiert. Der pH-Wert stellte sich auf 8,9 ein, bedingt durch den in der feuchten Biomasse verbliebenen Ammoniak.

Die Temperaturen der Suspension wurde unter Rühren auf 65 °C erhöht und nach 5 Minuten der pH-Wert durch Zugabe von HCl auf 7,2 eingestellt. Danach wurde noch 15 Minuten bei 65 °C weitergerührt, dann auf 40 °C abgekühlt und zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde getrocknet.

Beispiel 8

Ein Kohlenwasserstoffe verwertender Stamm der Hefe *Candida lipolytica* ATCC 20383 wurde auf n-Paraffinen in Gegenwart eines wässrigen Nährmediums und eines Sauerstoff enthaltenden Gases kultiviert. Die Hefezellmasse wurde von der Nährlösung abgetrennt und getrocknet.

100 g der trockenen Hefezellmasse wurden bei Raumtemperatur unter Normaldruck in 300 g Methanol suspendiert und dieser Mischung im Verlauf von 15 Minuten 10 g NH_3 -Gas zugeführt. Dabei wurde die Temperatur der Suspension durch

Kühlung auf 15 °C gehalten. Nach Einleiten des Gases wurde noch 20 Minuten bei 22 °C weitergerührt und anschliessend über eine Saugfritte filtriert. Der Filterkuchen wurde einmal mit 300 ml Methanol auf der Fritte durchmischt und anschliessend abgesaugt. Die beiden Filtrate wurden vereinigt. Die Lösung war gelb und enthielt die Lipide des eingesetzten Zellmaterials. Methanol und NH_3 wurden bei vermindertem Druck (14 Torr) entfernt.

Der nach der zweiten Filtration verbliebene Rückstand, der aus den zerstörten und entfetteten Zellen des Mikroorganismus bestand, wurde im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C (100 Torr) 5 Stunden getrocknet. Das so erhaltene Produkt hatte eine hellere Farbe als die anfangs verwendete Hefezellmasse und war geruchlos.

Zur Verminderung des Nucleinsäuregehaltes von ursprünglich 7,5 Gew.-%, bezogen auf das Ausgangsmaterial, wurden 100 g der entfetteten und getrockneten Hefe in einer Lösung aus 1 Liter destilliertem Wasser und 100 ml Methanol suspendiert. Unter Rühren wurde die Mischung bei dem sich einstellenden pH-Wert von 6,8 für 15 Minuten auf 50 °C gebracht und durch Zentrifugieren in ein Sediment, das das Hefeprotein enthielt, und in eine flüssige Phase, die löslich gemachte Nucleinsäure enthielt, getrennt. Das Sediment wurde nach einer nochmaligen Wäsche bei Raumtemperatur der Gefriertrocknung unterworfen.

Der Nucleinsäuregehalt des getrockneten Materials war von ursprünglich 7,5 Gew.-% auf 0,4 Gew.-% gesunken.

Beispiel 9

Bei einem Verfahren wie in Beispiel 8 wurde statt Methanol Äthanol und statt 10 g NH_3 -gasförmig 60 ml NH_4OH (33%ig) eingesetzt.

Beispiel 10

Penicillium chrysogenum ATCC 10238 wurde in einer Nährlösung enthaltend Lactose, Cornsteep flüssig, Phosphat, Carbonat und Magnesiumsulfat nach üblichen Methoden aerob gezüchtet. Nach Abtrennung des produzierten Penicillins verblieb das Mycel, das getrocknet als Ausgangsmaterial diente.

Das Verfahren wurde wie in Beispiel 8 beschrieben durchgeführt. Statt NH_3 wurde NH_4OH 33%ig eingesetzt. Das entfettete Trockenmycel wurde bei 33 °C mit Wasser gewaschen.

Beispiel 11

Als Ausgangsmaterial diente die gleiche Zellmasse wie in Beispiel 10 beschrieben. Statt Methanol wurde Äthanol verwendet. Die Temperatur während der Wasserextraktion wurde auf 85 °C erhöht und 15 Minuten dabei gehalten.

In den folgenden Tabellen Ia und Ib sind die Ergebnisse der Beispiele 1-11 aufgeführt.

Tabelle Ia
Entfernung der Lipide

Bei- spiel	100 g eingesetzte Zellmasse Art	Fett Gew.-%	Nuclein- säure Gew.-%	Lösungs- mittel 300 g	NH ₃ (g) bzw. NH ₄ OH (33%ig, ml)
1	Methylo- monas	7	11,2	Methanol	NH ₃ 10
2	dito	7	11,2	Methanol	NH ₄ OH 30 ¹⁰
3	dito	7	11,2	Methanol	NH ₄ OH 60
4	dito	7	11,2	Äthanol	NH ₄ OH 30
5	dito	7	11,2	Glykolmon- omethyl- äther	NH ₄ OH 60
6	dito	7	11,2	i-Propanol	NH ₄ OH 30
7	dito	9,6	15,4	Methanol	NH ₃ 15
8	Candida lipolytica	8,2	7,5	Methanol	NH ₃ 10
9	dito	8,2	7,5	Äthanol	NH ₄ OH 60 ²⁰
10	Trocken- mycel	3,5	2,6	Methanol	NH ₄ OH 30
11	dito	3,5	2,6	Äthanol	NH ₄ OH 30

Tabelle Ib
Entfernung der Nucleinsäuren

Bei- spiel	Waschwasser			Erhaltene Zellmasse		
	Menge (l)	pH	Temp. (°C)	Menge (g)	Fette Gew.-%	Nucleinsäure Gew.-%
1	0,9	6,9	55	65	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	1,0	6,8	50	68	1,4	0,4
9	0,8	6,5	45	67	1,8	0,7
10	0,9	6,5	75	78	1,1	0,5
11	0,9	6,5	85	79	1,3	0,8