

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

50093

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 27.XII.1961 (P 97 970)

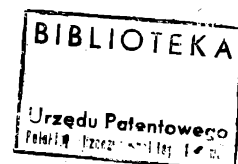
Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 30.IX.1965

Kl. 6 a, 22/05

MKP C 12 d 13/00

UKD



Współtwórcy wynalazku: Mariji Miwa, Tatsuro Kagani

Właściciel patentu: Toyo Boseki Kabushiki Kaisba, Osaka (Japonia), Takada Chemical Industries Limited, Osaka (Japonia)

Sposób otrzymywania kwasu rybonukleinowego z drożdży

1

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania kwasu rybonukleinowego z drożdży.

Kwas rybonukleinowy nazywany dalej RNA według danych np. z „The Nucleic Acids” R. Caryaff’a i I. N. Dawidsona (Akademic Press, New York, 1955) jest związkiem organicznym uważanym za spolimeryzowany nukleotyd, który składa się z kwasu fosforowego, cukru (w postaci D — rybozy) i puryny albo pirymidyny. Związek ten występuje w drożdżach, oraz w wszelkiego rodzaju komórkach zarówno roślinnych jak i zwierzęcych.

Ponieważ drożdże są łatwo dostępne oraz należą do mikroorganizmów szczególnie bogatych w RNA prowadzono już badania nad ekstrakcją kwasu rybonukleinowego z drożdży (Gł Clark, G. B. Schryver. (Biochem. J.11.319 (1917) i A. M. Chem. 216 185 (1955)). Jednak te znane sposoby były pierwotnie opracowywane w celu studiów biochemicznych nad rolą, którą jak przypuszczano, RNA odgrywa w życiu i wskutek tego nie można ich dostosować do celów przemysłowych na wielką skalę.

W związku z niedawnym odkryciem aktywności farmakologicznej RNA i jego niektórych pochodnych, jak też w związku z zastosowaniem nukleotydu zasady 5'-puryny (wytwarzanego z RNA) w przemyśle spożywczym, popyt na RNA wzrósł tak znacznie, że dotychczas znane sposoby jego otrzymywania pozwalające na wytwarzanie tylko

2

niewielkich ilości RNA stały się w skali przemysłowej nieekonomiczne.

Przedmiotem wynalazku jest przemysłowa metoda otrzymywania kwasu rybonukleinowego przez ekstrahowanie go z drożdży.

Według wynalazku mleko drożdżowe zawierające dodatek ługu posiarczynowego, albo mleko drożdżowe nie oddzielone jeszcze od brzezki, otrzymywane przez hodowlę drożdży na pożywcze zawierającej ług posiarczynowy poddaje się ogrzewaniu, następnie zaś oddziela się ciecz od stałej zawiesiny i z cieczy tej wyodrębnia kwas rybonukleinowy.

Stwierdzono bowiem, że ług posiarczynowy, otrzymany jako produkt odpadowy przy rotwarczeniu celulozy metodą siarczynową, korzystnie, gdy jest rozcieńczony, stanowi doskonały środek ekstrakcyjny przy wydobywaniu kwasu rybonukleinowego z drożdży. Stwierdzono również, że odciek podrożdżowy uzyskany po oddzieleniu z brzezki drożdży, hodowanych na pożywcze zawierającej ług posiarczynowy, korzystnie po rozcieńczeniu, także nadaje się jako środek ekstrakcyjny do ekstrakcji kwasu rybonukleinowego z drożdży.

Ponieważ nie jest całkowicie zrozumiały mechanizm ekstrakcji kwasu rybonukleinowego z drożdży za pomocą ługu posiarczynowego lub z wyżej wymienionego odcieku przyjęto, że działanie ekstrakcyjne tych cieczy w stosunku do RNA jest wynikiem obecności pewnego składnika (składni-

ków), przypuszczalnie lignosulfonianów. W związku z tym, gdy ług posiarzynowy stosuje się jako pożywkę hodowlaną w fermentacji drożdży tylko pewna ilość jego składników (zwłaszcza cukry ulegające fermentacji) zostaje pobrana przez drożdże, a skład odcieku podrożdżowego, jeżeli chodzi o związki wykazujące zdolność ekstrahowania kwasu rybonukleinowego jest zasadniczo taki sam jak w ługu posiarzynowym nie poddanym fermentacji.

Jako surowiec w sposobie według wynalazku można stosować drożdże suche lub żywe komórki drożdżowe otrzymane na pożywce zawierającej ług posiarzynowy, ponieważ jak już wyżej podano odciek z brzezki zawierającej ług posiarzynowy może być stosowany do ekstrakcji kwasu rybonukleinowego. Ług posiarzynowy jako produkt odpadowy stanowi bardzo tani surowiec. W sposobie według wynalazku można stosować ług posiarzynowy otrzymany przy roztworzeniu różnych surowców drzewnych.

Ponieważ skład ługu posiarzynowego bywa różny, w zależności od rodzaju drewna, metody i warunków stosowanych w procesie roztworzenia, można przyjąć, że przeciętny skład ługu w procentach wagowych jest następujący: sucha nielotna pozostałość 10—15%, lignosulfoniany około 5—8%, ogólna zawartość cukru około 2,5—4,5%, cukier fermentacyjny około 1—3,3%, siarka około 0,8—1,2%. Ług stanowi ciecz koloru ciemnobrązowego.

Sposobem według wynalazku można poddawać ekstrakcji drożdże otrzymane w znany sposób w środowisku zawierającym ług posiarzynowy. W procesie wytwarzania drożdży, przy zastosowaniu ługu posiarzynowego postępuje się w sposób następujący:

Najpierw za pomocą pary odpędza się z ługu posiarzynowego dwutlenek siarki, a jeżeli to jest pożądane ług przepuszcza się przez warstwę wapna palonego, w celu zmniejszenia jego kwasowości. Po takiej obróbce ług posiarzynowy wprowadza się do kadzi fermentacyjnej z amoniakiem i innymi pożywkami. Kadź fermentacyjna jest zaopatrzona w specjalne urządzenie do przewietrzania, ażeby pobudzić drożdże do normalnej aerobowej fermentacji i gwałtownego rozmnażania. Rozmnożone drożdże wyładowuje się z kadzi fermentacyjnej razem z wyczerpaną brzezka (lub odciekiem) i doprowadza do wirówek, w których oddziela się zawieszinę drożdży zwaną mlekiem drożdżowym od odcieku. Następnie mleko drożdżowe poddaje się kilkakrotnie naprzemian odwirowaniu i przemylaniu wodą, aż do uzyskania czystego produktu, który się suszy. Proces ten jest opisany bardziej szczegółowo w Industrial Engineering Chemistr. 43 8 (1951).

Do ekstrakcji kwasu rybonukleinowego z drożdży, można stosować w sposobie według wynalazku również wywar otrzymany po fermentacyjnym przerobieniu ługów posiarzynowych.

Ponadto stwierdzono, że do otrzymywania kwasu rybonukleinowego z drożdży nadają się także mleko drożdżowe z brzezka lub mleko drożdżowe oddzielone na wirówkach od brzezki (odcieku) i

jeszcze nie oczyszczone na drodze przemylania.

Skład mleka drożdżowego, stosowanego do ekstrakcji kwasu rybonukleinowego sposobem według wynalazku, może się wahać w szerokich granicach lecz korzystnie jest, żeby stężone drożdże wynosiło 3—15% wagowych (w przeliczeniu na suchą pozostałość), a stężenie stałych składników zawartych w ługu posiarzynowym było takie same przed przerobem tych ługów na drożdże i po przerobieniu ługów 0,2—0,5% wagowo (w stosunku do suchej pozostałości).

Mleko drożdżowe stosowane do ekstrakcji kwasu rybonukleinowego powinno wykazywać $\text{pH} = 4-9$, korzystnie 5—7,5. Wartość pH mleka można dowolnie regulować, na przykład przez dodawanie alkaliów, np. wodorotlenku sodowego. Jeżeli wartość pH jest niższa od 4 lub wyższa od 9, ekstrahowany kwas rybonukleinowy wykazuje tendencje do depolimeryzacji.

W procesie ekstrakcji kwasu rybonukleinowego korzystne jest mieszanie i ogrzewanie mleka drożdżowego. Czas i temperatura ogrzewania muszą być różne, w zależności od rodzaju drożdży, pożądanej wydajności i ilości mleka poddawanego obróbce. Na ogół ogrzewanie prowadzi się w temperaturze 90—120°C (ciśnienie atmosferyczne) w ciągu 30—300 minut. Na ogół im wyższa jest temperatura, tym krótszy czas ogrzewania. Najkorzystniej jest ogrzewać mleko do temperatury wrzenia (około 100°C) w ciągu 50—200 minut.

Podczas ogrzewania kwas rybonukleinowy znajdujący się w drożdżach, przechodzi do fazy ciekłej. Mleko drożdżowe po obróbce cieplnej przesyła się następnie na przykład na wirówki lub prasy filtracyjne w celu oddzielenia substancji stałej od cieczy, z której z kolei wyosobnia się wyekstrahowany kwas rybonukleinowy.

Wydzielenie kwasu rybonukleinowego z cieczy prowadzi się korzystnie przez jej zakwaszenie do wartości $\text{pH} = 1,5-3,5$ kwasem np. kwasem solnym, siarkowym, fosforowym itp. organicznym kwasem karboksylowym, takim jak kwas octowy, kwas monochlorooctowy itp. i kwasem takim jak organiczny kwas sulfonowy zwłaszcza benzenosulfonowy, toluenosulfonowy i ligninosulfonowy. Przez zakwaszenie opisanej cieczy wytrąca się kwas rybonukleinowy w postaci osadu, który odsadza się lub odwirowuje.

Sposób według wynalazku pozwala na wyekstrahowanie z dobrą wydajnością kwasu rybonukleinowego z drożdży. Na przykład jeżeli stosuje się żywe drożdże, otrzymane w wyniku aerobowej ciągłej fermentacji drożdży w środowisku zawierającym ług posiarzynowy i pobrane z kadzi fermentacyjnej podczas stadium wzrostu, otrzymuje się surowy kwas rybonukleinowy (zawartość organicznego fosforu 8%) z wydajnością 4—6% w stosunku do masy drożdży.

Tak otrzymany surowy kwas rybonukleinowy można stosować bez oczyszczania do celów przemysłowych np. można go w znany sposób hydrolizować do rybonukleotydu, użytecznego w przemyśle spożywczym. Można także surowy kwas rybonukleinowy oczyszczać w znany sposób, np. me-

tołą Sevag'a (M. G. Sevag i inni, Journal of Biological Chemistry 124 425 (1938)).

Sposobem według wynalazku można traktować drożdże zarówno suszone jak i żywe. Odpowiednikami rodzajami drożdży są np. Hansenula anomala, Endomyces vernalis, Sacharomyces cerevisiae, Candina tropicalis, Torulopsis utilis, Mycotyryla japonica, itp. spośród których torulopsis utilis są korzystne wskutek ich wysokiej zdolności rozmnażania.

Następujące przykłady wyjaśniają bliżej sposób według wynalazku. Podane w przykładach procenty oznaczają procenty wagowe.

Przykład I. Po wstępnym traktowaniu jak odpędzanie dwutlenku siarki zalkalizowany wapnem powarzelną ług posiarzynowy z roztwarzania drewna sosnowego, zawierający 12,7% nielotnego produktu stałego (7,8% lignosulfonianów, 4,3% ogólnej zawartości cukru, 3,2% fermentującego cukru wprowadzono wraz z małą ilością materiału pożywkowego (chlorek potasu, fosforan dwuamoniowy i amoniak), do kadzi fermentacyjnej pracującej metodą ciągłą (zmodyfikowany typ kadzi fermentacyjnej Waldhof'a). Wartość pH brzezki wynosiła około 5,0. Na wymienionej pożywce hodowano drożdże Torulopsis utilis w ciągu 6 godzin w temperaturze 33°C przy przewietrzeniu. Następnie rozmnożone drożdże wraz z brzezką podrożdżową spuszczone z kadzi fermentacyjnej i naprzemian poddawano odwirowaniu i przemylaniu wodą. Te kolejne operacje powtarzano dwukrotnie, w celu otrzymania mleka drożdżowego o stężeniu drożdży 11,5% w przeliczeniu na suchą pozostałość i odcieku zawierającego 2% stałych składników (wysuszone stała pozostałość).

1 kg mleka drożdżowego doprowadzono do wartości pH = 7, za pomocą wodorotlenku sodowego i mieszając ogrzewano do wrzenia w autoklawie z nierdzewnej stali, w ciągu 90 minut. Następnie mleko oziębiono do temperatury 5°C i przesączono w prasie filtracyjnej. Przesącz zawierający kwas rybonukleinowy doprowadzono do wartości pH = 3,0 za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego. Wytrącony wyekstrahowany kwas rybonukleinowy oddzielono przez odwirowanie, przemyto wodą i wysuszone w próżni. Otrzymano 6,3 g surowego sproszkowanego kwasu rybonukleinowego. Surowy kwas rybonukleinowy zawierał 8% organicznego fosforu, według kolorymetrycznego oznaczenia fosforanu metodą Allen'a (R. Y. L. Allen Biochem. I. (London) 34 858 (1940)), co odpowiada wydajności 5,5% w stosunku do drożdży.

Surowy kwas nukleinowy oczyszcza się metodą Sevag'a (według danych J-Biol. Chem. 124 425 (1938) M. G. Sevag i inni) i otrzymany czysty kwas nukleinowy hydrolizuje kwasem solnym. Chromatografia bibułowa otrzymanego nukleotydu wykazała, że w stosunku do czystego kwasu nukleinowego, zawierał on 57% puryny, która może być stosowana jako produkt wyjściowy w produkcji kwasu 5-inozynowego i kwasu 5-guanylowego.

Przykład II. Na pożywce hodowlanej, zawierającej ług posiarzynowy z roztwarzania drev-

na bukowego, zalkalizowany wapnem o zawartości nielotnego produktu stałego 13,0% (lignosulfoniany 5,7%, ogółem cukru 3,6%) hodowano drożdże typu Torula w warunkach aerobowych w taki sam sposób jak w przykładzie I. Rozmnożone drożdże z odciekiem odwirowano i przemyto wodą w celu utworzenia mleka drożdżowego, zawierającego 10,5% suchej pozostałości i odcieku zawierającego 4,3% suchej pozostałości.

1 kg tego mleka doprowadzono do wartości pH = 6,5 i ekstrakcję prowadzono w autoklawie w ciągu 70 minut, w temperaturze 100°C. Po tym traktowaniu usunięto komórki drożdżowe i pozostałą ciecz doprowadzono do wartości pH = 2,0 za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego. Wytrącony kwas rybonukleinowy odwirowano, przemyto wodą i wysuszone. Otrzymano w postaci proszku surowy kwas nukleinowy (zawartość fosforu 8,0%) w ilości 5,7 g, co odpowiada około 5,5% użytych drożdży.

Przykład III. Suche drożdże Torula wyhodowano na pożywce hodowlanej, zawierającej ług posiarzynowy, jak w przykładzie I, dodano do roztworu zawierającego 2% substancji stałej i otrzymanego przez rozcieńczenie 6,3-krotnie ługu posiarzynowego, stosowanego w przykładzie I, tak że otrzymano mleko drożdżowe, zawierające 5% drożdży.

1 kg tego mleka doprowadzonego do wartości pH = 6,5 ogrzewano w ciągu 120 minut do temperatury 100°C podczas mieszania i przesączono. Z przesączu otrzymano 2,4 g (wydajność 4,8% w stosunku do drożdży) surowego kwasu nukleinowego (zawartość fosforu organicznego 7,3%).

Surowy kwas nukleinowy oczyszczono w taki sam sposób jak w przykładzie I, po czym hydrolizowano. Chromatografia bibułowa otrzymanego nukleotydu wykazała, że zawiera on 56% nukleotydów adeniny i guaniny.

Przykład IV. Przykład ten wyjaśnia ekstrakcję kwasu rybonukleinowego z drożdży wyhodowanych w środowisku odmiennym od środowiska zawierającego ług posiarzynowy.

Drożdże piekarniane hodowano na melasie we wstrząsanym naczyniu fermentacyjnym.

Do autoklawu wprowadzono rozcieńczony ług posiarzynowy z roztwarzania drewna bukowego, zawierający 3,3% stałej substancji, to znaczy roztwór otrzymany przez 4-krotne rozcieńczenie ługu posiarzynowego, stosowany w przykładzie II. Do tego roztworu dodano drożdże piekarniane, do uzyskania mleka drożdżowego o wartości pH = 6,5 zawierającego 8% drożdży. Mleko drożdżowe ogrzewano do temperatury 110°C w ciągu 100 minut podczas mieszania. Po oziębieniu mleko odsączono i przesącz doprowadzono do wartości pH = 2,5 za pomocą kwasu octowego i odwirowano w celu oddzielenia wytrąconego kwasu rybonukleinowego. Otrzymano 0,22 części (wydajność 2,7% w stosunku do drożdży) surowego kwasu nukleinowego (fosforan organiczny = 7,1%).

Przykład V. Powtórzono postępowanie z przykładu IV, z wyjątkiem tego, że stosowano

drożdże piwowskie lub drożdże ze sfermentowanego ryżu wyhodowane w środowisku odmiennym od środowiska zawierającego ług posiarzynowy. Zawiesinę wodną tych drożdży ekstrahowano ługami posiarzynowymi otrzymanymi z miazgi celulozowej. W żadnym przypadku nie wyekstrahowano kwasu rybonukleinowego z drożdży z dobrą wydajnością.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania kwasu rybonukleinowego z drożdży, **znamienny tym**, że rozcieńczone mleko drożdżowe otrzymane z drożdży wyhodowanych na pożywce zawierającej ług posiarzynowy doprowadza się do $\text{pH} = 4-9$, korzystnie 5-7,5 następnie ogrzewa najkorzystniej do temperatury $90-120^{\circ}\text{C}$, przy czym kwas rybonukleinowy przechodzi do fazy ciekłej, a uzyskany roztwór kwasu rybonukleinowego oddziela się od drożdży przez odsączenie lub odwirowanie, po czym zakwasza do uzyskania wartości $\text{pH} = 1,3-3,5$ w celu wytrącenia kwasu.

5

10

15

20

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako mleko drożdżowe stosuje się zawiesinę zawierającą w przeliczeniu na suchą pozostałość 3-15% drożdży i 0,2-5% stałych składników ługu posiarzynowego, występujących w niezmiennej ilości przed i po drożdżowaniu tych ługów.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako rozcieńczone mleko drożdżowe stosuje się zawiesinę drożdży nie oddzieloną od odcieku.
4. Odmiana sposobu według zastrz. 1, **znamienna tym**, że jako mleko drożdżowe, stosuje się zawiesinę otrzymaną przez zmieszanie suchych drożdży z ługiem posiarzynowym.
5. Sposób według zastrz. 1-4, **znamienny tym**, że jako drożdże stosuje się *Torulopsis utilis*.

Dokonano jednej poprawki

