



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2007 00178**

(22) Data de depozit: **08.03.2007**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.06.2011** BOPI nr. **6/2011**

(41) Data publicării cererii:
30.09.2008 BOPI nr. **9/2008**

(73) Titular:
• **ASOCIAȚIA CENTRUL DE BIOTEHNOLOGII MICROBIENE, BD. MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **JURCOANE ȘTEFANA, STR. BODEȘTI NR.5, BL.K8, SC.A, ET. 5, AP.24, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **LUPESCU IRINA, STR. PREVEDERII NR. 15A, BL. C1, SC. A, AP. 9, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TCACENCO LUMINIȚA, STR. EDUCAȚIEI NR.35, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GROPOȘILĂ-CONSTANTINESCU SIANA-GABRIELA, STR. PĂDURENI NR. 10, BL. 58B, SC.1, PARTER, AP. 1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DIGUȚĂ FILOFTEIA CAMELIA, STR. TÂRGU DIN VALE NR. 68, BL. P20, SC. C, AP. 1, PITEȘTI, AG, RO;**
• **COZEA ANDREEA, STR. 1 DECEMBRIE 1918 NR.135, BL.C, SC.3, AP.49, BRĂILA, BR, RO;**

• **PELINESCU DIANA, STR. CRISTEA MATEESCU NR.3, BL.T4B, SC.1, AP.42, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SĂSĂRMAN ELENA, BD. IULIU MANIU NR.158, BL.37, SC.2, ET.2, AP.50, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
P.FICKERS, M.ONGENA, J.DESTAIN, F.WEEKERS, P.THONART, "PRODUCTION AND DOWN-STREAM PROCESSING OF AN EXTRACELLULAR LIPASE FROM THE YEAST YARROWIA LIPOLYTICA", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY 38 (2006), PP. 756-759; P.FICKERS, F.FUDALEJ, J.-M.NICAUD, J.DESTAIN, P.THONART, "SELECTION OF NEW OVER-PRODUCING DERIVATIVES FOR THE IMPROVEMENT OF EXTRACELLULAR LIPASE PRODUCTION BY THE NON-CONVENTIONAL YEAST YARROWIA LIPOLYTICA", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY 115 (2005), PP. 379-386.

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A LIPAZEI CU O TULPINĂ DE YARROWIA LIPOLYTICA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a lipazei cu o tulpină de *Yarrowia lipolytica*, prin cultivarea submersă a microorganismului pe un mediu cu săruri minerale, glucoză, peptonă, extract de drojdie și ulei de floarea-soarelui sau ulei de măsline, urmată de extracția și purificarea enzimei, în care uleiul de

floarea-soarelui sau uleiul de măsline este conținut în mediul de fermentație într-o concentrație cuprinsă între 0,05 și 0,1%.

Revendicări: 1

Examinator: biochimist **BABALIGEA IRINA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 123298 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a lipazei microbiene cu o
tulpină de *Yarrowia lipolytica*.

3 Potențialul tehnologic al lipazelor microbiene se referă la: 1) stabilitate în solvenții
organici, 2) absența necesității cofactorilor, și 3) posesia unei largi specificități de substrat
5 și a unei selectivități enantiomorfe.

7 Lipazele catalizează o gamă largă de reacții, incluzând hidroliza, interesterificarea,
acidoliza și amiloliza, reacțiile putând fi desfășurate atât în medii apoase, cât și în medii
neapoase. Direcția de reacție este reversibilă, fiind în funcție de conținutul în apă al mediului.
9 Astfel, într-un mediu sărac în apă, lipazele catalizează esterificarea, transesterificarea și
interesterificarea.

11 Cererea de enzime microbiene în general și cea de lipaze în special, pe plan mondial,
este în continuă creștere, lipazele fiind folosite în industria alimentară, farmaceutică, a
13 detergenților și cosmeticelor.

15 Lipaza este o enzimă extracelulară, produsă de o serie de drojdii (*Candida antarctica*,
C. lipolytica etc.), mucegaiuri (*Rhizopus delemar*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei* etc.),
și bacterii (*Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis* etc.).

17 Se cunosc procedee de producere a lipazei cu tulpini de drojdii pe medii conținând
2...3% ulei de măsline sau de floarea soarelui, săruri minerale și surse de azot (extract de
19 drojdie, triptonă, proteoză, peptonă) (CN 1730653/2006-02-08; US 2002142399/2002-10-03;
US 4999289/1991).

21 De asemenea, se cunoaște documentul "Production and down-stream processing of
an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*", P. Fickers, M. Ongena, J. Destain,
23 F. Weekers, P. Thonart, *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006) 756-759 care descrie
cultivarea unei tulpini de *Yarrowia lipolytica* pe un mediu de biosinteză care conține 1,5%
25 glucoză, 3% pudră de zer, 3% extract de drojdie, 1% extract de porumb, 0,5% ulei de
măsline și 0,8% sulfat de amoniu.

27 Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția constă în obținerea unei
activități lipazice crescute în mediile de fermentație și a unui preparat cu activitate lipazică
29 crescută.

31 Procedeu de obținere a lipazei cu o tulpină de *Yarrowia lipolytica*, conform invenției,
se realizează prin cultivarea submersă a microorganismului pe un mediu de cultură
conținând săruri minerale, glucoză, peptonă, extract de drojdie și ulei de floarea soarelui sau
33 ulei de măsline, urmată de extracția și purificarea enzimei, uleiul de floarea soarelui sau
uleiul de măsline fiind conținut în mediul de fermentație într-o concentrație cuprinsă între 0,05
35 și 0,1%.

Prin aplicarea invenției, se realizează următoarele avantaje:

37 - obținerea unei activități lipazice crescute în mediile de fermentație;

39 - obținerea unui produs lipazic purificat sub formă de pudră, cu largi utilizări în
industrie.

41 Procedeu conform invenției constă în aceea că dezvoltarea tulpinii de *Yarrowia*
lipolytica se face pe un mediu de cultură a cărui concentrație în ulei de floarea soarelui sau
în ulei de măsline este de 0,05...0,1%.

43 Concentrații mai scăzute de ulei de floarea soarelui sau de măsline (0,05...0,10%)
induc pe de o parte formarea și acumularea enzimei în mediul de fermentație și permit o
45 bună separare a masei microbiene, iar pe de altă parte, realizarea unei izolări și purificări a
enzimei în condiții optime.

47 Prin separarea biomasei, precipitarea ei și purificarea parțială a enzimei din
supernatant, se obțin preparate lipazice cu activități enzimatic cuprinse în intervalul
49 3,4...19 U/mg, în funcție de condițiile de fermentație, preparate utilizabile în industria alimen-
tară, farmaceutică și în sinteza organică fină.

RO 123298 B1

În cadrul prezentei invenții, lipaza a fost obținută cu o tulpină de *Yarrowia lipolytica*, pornind de la un mediu de biosinteză conținând extract de drojdie 10 g/l, peptonă Bacto 20 g/l, glucoză 20 g/l, săruri minerale: FeSO_4 1 g/l, Mg SO_4 0,04 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, ulei de măsline 1...20 g/l, în condiții de fermentație în baloane de 500 ml, conținând între 50 și 125 ml mediu de fermentație, sub agitare de 240 rpm, la temperatura de 28°C, timp de 48 h.

Enzima a fost izolată prin precipitare cu alcool etilic din mediul extracelular, după concentrarea acestuia sub vid.

Procedeele propuse pentru obținerea preparatului enzimatic cu activitate lipolitică se realizează pornind de la o cultură de întreținere a tulpinii *Yarrowia lipolytica*, obținută prin însămânțarea unui mediu solid conținând extract de drojdie 10 g/l, peptonă Bacto 20 g/l și glucoză 20 g/l și agar 15 g/l și dezvoltarea microorganismului la 28°C, timp de 48 h.

Din cultura de întreținere se prepară apoi inoculul, însămânțând în proporție de 10% v/v un mediu nutritiv conținând extract de drojdie 10 g/l, peptonă Bacto 20 g/l, glucoză 20 g/l, și săruri minerale: FeSO_4 - 1 g/l, Mg SO_4 - 0,04 g/l, KH_2PO_4 - 2 g/l, $\text{pH}=6$.

Pentru biosinteza enzimei se prepară 50...125 ml medii de fermentație ce conțin extract de drojdie 10 g/l, peptonă Bacto 20 g/l, glucoză 20 g/l, ulei de măsline 1...20 g/l sau ulei de floarea soarelui 0,5...1 g/l și săruri minerale: FeSO_4 - 1 g/l, Mg SO_4 - 0,04 g/l, KH_2PO_4 - 2 g/l, care se repartizează în flacoane Erlenmeyer de 500 ml, se sterilizează și se însămânțează în proporție de 5...10%. Fermentația se desfășoară la 28°C, sub agitare și aerare, timp de 48 h.

În finalul fermentației, masa celulară se separă prin filtrare sub vid, iar filtratul se prelucrează în continuare prin concentrare sub vid, la temperatura de maximum 30°C, până la 1/3 din volumul inițial. Soluția concentrată se tratează apoi, sub agitare și răcire, cu alcool etilic (3 volume alcool față de volumul soluției apoase conținând enzima). După perfectarea precipitării timp de 30 min, sub agitare, în gheață, suspensia rezultată se filtrează sub vid, iar enzima astfel separată se spală pe filtru cu alcool etilic rece, se esorează bine și apoi se usucă la temperatura camerei, de asemenea sub vid.

Determinarea activității lipazice atât în mediul de fermentație, cât și în cazul preparatului enzimatic izolat, s-a efectuat printr-o metodă titrimetrică, utilizând ca substrat trigliceridele din uleiul de măsline. Cantitatea de acizi grași formată sub acțiunea enzimei se măsoară prin titrare cu o soluție diluată standardizată de NaOH. Cantitatea de soluție de NaOH necesară pentru neutralizarea acizilor grași eliberați (fenolfaleina, viraj incolor - roșu, $\text{pH}=8,2...10$) este proporțională cu activitatea lipazică.

O unitate (U) de activitate lipazică a fost definită drept cantitatea de enzimă care eliberează, prin hidroliza trigliceridelor din uleiul de măsline, 1 μmol de acid gras, în condițiile analizei (temperatura = 37°C, $\text{pH}=7$, timp de reacție = 60 min).

Se dau în continuare trei exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Obținerea lipazei cu tulpina *Yarrowia lipolytica* se realizează după următoarea schemă, bazată pe crearea unei culturi de întreținere (mediul A), a unui inocul (mediul B) și a unui mediu de biosinteză (mediul C).

Cultura de întreținere (mediul A): *Yarrowia lipolytica*, dezvoltare 48 h, la 28°C.

Inoculul (mediul B): 10 ml mediu însămânțat cu 1 ml suspensie de *Yarrowia lipolytica* 10 UFC/ml, dezvoltare 20...24 h pe agitator rotativ cu o turație de 240 rpm.

Mediul de biosinteză (mediul C): 75 ml mediu însămânțat cu 5% inocul, dezvoltare 48...72 h la 28°C, pe agitator rotativ cu o turație de 240 rpm.

Cultura de întreținere

Cultura de întreținere se prepară pe mediul A solidificat, repartizat în eprubete, mediul A conținând: extract de drojdie 10 g/l, peptonă Bacto 20 g/l și glucoză 20 g/l.

RO 123298 B1

1 Mediul se însămânțează cu ansa dintr-un conserv vegetativ sau conserv congelat la
-70°C, conform tehnicilor folosite la Centrul de Biotehnologii Microbiene.

3 Materialul de însămânțare se dezvoltă static la 28°C, timp de 48 h.

5 Din cultura de întreținere astfel dezvoltată se prepară o suspensie microbiană în apă
distilată sterilă. 1 ml suspensie conținând 10^7 UFC/ml se însămânțează în 10 ml mediu B
(mediul de inocul), care conține extract de drojdie 10 g/l, peptonă Bacto 20 g/l, glucoză
7 20 g/l, săruri minerale FeSO_4 1 g/l, Mg SO_4 0,04 g/l, KH_2PO_4 2 g/l și are înainte de sterilizare
 $\text{pH}=6$.

9 *Inoculul*

11 Mediul de inocul astfel preparat și inoculat se repartizează în flacoane Erlenmayer
cu capacitate de 100 ml. Se supune apoi unei dezvoltări de 20...24 h în condiții de agitare
și aerare continuă pe agitator rotativ cu 240 rpm.

13 *Biosinteza*

15 Mediul de biosinteză (mediul C) conține extract de drojdie 10 g/l, peptonă Bacto
20 g/l, glucoză 20 g/l, săruri minerale FeSO_4 1 g/l, Mg SO_4 0,04 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, ulei de
măslină 20 g/l. Mediul se repartizează câte 50, 75, 100, 125 ml în flacoane cu capacitate de
17 500 ml.

19 Cultura de inocul preparată în modul arătat mai sus este transvazată pentru
fermentație în flacoanele Erlenmayer conținând mediul C, în procente de 5...10 % (v/v), după
care urmează o dezvoltare de 48 h în condiții de agitare și aerare continuă pe agitator rotativ
21 cu 240 rpm.

23 Prelucrarea mediului de biosinteză se face prin separarea biomasei prin centrifugare
la 4000 rpm, timp de 20 min. Supernatantul limpede, conținând lipază, se supune opera-
țiunilor de izolare a enzimei printr-un procedeu care constă în două etape, și anume:
25 concentrarea supernatantului la 1/3 din volumul inițial și precipitarea enzimei din soluția
concentrată, prin tratarea acesteia cu alcool etilic.

27 După izolarea enzimei, se obține un preparat lipazic sub formă de pudră de culoare
crem.

29 Activitatea enzimatică obținută (tabelul 1), este de 3 U/ml pentru condiții puternice de
aerare (în flacoanele de 50 și 75 ml), fiind corelată cu formarea unei biomase specifice de
31 1,96, respectiv 1,36 DO/640 nm.

33 *Tabelul 1*

Volum mediu (ml)	D.O. 640 nm	Activitate lipazică	
		U/ml fermentație	U/mg preparat
50	1,96	3,00	4,6
75	1,36	3,00	5,0
39 100	1,11	2,40	3,8
41 125	1,0	2,40	3,4

43 **Exemplul 2.** Dezvoltarea culturii de întreținere și a inoculului se face conform
exemplului 1.

45 Mediul de biosinteză (mediul C), repartizat câte 75 ml în flacoane Erlenmayer de 500
ml, conține ulei de măsline în concentrații de 0,1, 0,5 și respectiv 2%. Se realizează și un
martor, într-un mediu fără glucoză, cu adaos de 2% ulei de măsline.

RO 123298 B1

Valorile de activitate obținute pentru exemplul 2 sunt redată în tabelul 2. Se observă că activitatea lipazică este invers proporțională cu conținutul uleiului de măsline din mediu. Concentrația maximă a enzimei de 11,37 U/ml se atinge la un conținut de 0,1% ulei și descrește odată cu creșterea conținutului acestuia în mediu. Valoarea biomasei acumulate în timpul biosintezei rămâne constantă, cu excepția variantei în care unica sursă de carbon este uleiul (variantea mator-fără glucoză).

Tabelul 2

Volum mediu (ml)	Ulei de măsline ml%	D.O. 640 nm	Activitate lipazică	
			U/ml fermentație	U/mg preparat
75	0,1	1,10	11,37	18,88
75	0,5	1,12	3,30	9,90
75	2,0	1,37	3,00	9,20
75 (glucoză)	2,0	0,59	4,79	14,71

Exemplul 3. Dezvoltarea culturii de întreținere, a inoculului și a biosintezei se realizează conform exemplului 2, cu deosebirea că, în acest caz, uleiul de măsline este înlocuit cu ulei de floarea soarelui.

Valorile de activitate obținute pentru exemplul 3, redată în tabelul 3, evidențiază superioritatea uleiului de floarea soarelui comparativ cu uleiul de măsline, atingându-se activități lipazice de 12 U/ml, similare cu cele din exemplul 2, la un conținut al uleiului de floarea soarelui de 0,05% în mediul de biosinteză, ceea ce asigură o rentabilitate economică superioară exemplului 2.

Tabelul 3

Volum (ml)	Ulei de floarea soarelui %	D.O. 640 nm	Activitate lipazică	
			U/ml fermentație	U/mg preparat
75	0,05	1,92	12,00	19,00
75	0,10	1,32	9,00	17,25

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere a lipazei cu o tulpină de *Yarrowia lipolytica*, prin cultivarea submersă a microorganismului pe un mediu de cultură conținând săruri minerale, glucoză,

5

peptonă, extract de drojdie și ulei de floarea soarelui sau ulei de măsline, urmată de extracția și purificarea enzimei, **caracterizat prin aceea că** uleiul de floarea soarelui sau uleiul de

7

măsline este conținut în mediul de fermentație într-o concentrație cuprinsă între 0,05 și 0,1%.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci