

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) OPIS PATENTOWY (19) PL (11) 188717

(13) B1

(21) Numer zgłoszenia: 326829

(22) Data zgłoszenia: 16.06.1998

(51) IntCl⁷
C12N 9/14
C12P 1/34
C12N 9/20

(54)

Sposób otrzymywania lipazy

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
20.12.1999 BUP 26/99

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
29.04.2005 WUP 04/05

(73) Uprawniony z patentu:
Instytut Biotechnologii Przemysłu
Rolno-Spożywczego, Warszawa, PL

(72) Twórcy wynalazku:
Andrzej Krakowiak, Warszawa, PL
Regina Sawicka-Żukowska, Warszawa, PL
Barbara Jędrychowska, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:
Kuciak Karyna, Instytut Biotechnologii
Przemysłu Rolno-Spożywczego

(57) 1 Sposób otrzymywania lipazy metodą hodowli wglębnej grzyba strzępkowego rodzaju *Rhizopus* w warunkach aerobowych na pożywce ciekłej uprzednio wysterylizowanej zawierającej kazeinę techniczną i olej jadalny oraz wzbogaconej solami mineralnymi, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się przy użyciu szczepu *Rhizopus cohnii* KKP/787 na pożywce zawierającej kazeinę techniczną uprzednio rozpuszczoną w wodzie w obecności potasowego fosforanu dwuzasadowego, przez stopniowe podgrzewanie środowiska do wrzenia z jednoczesnym mieszaniem, przy czym na 0,2-2,5% kazeiny technicznej w stosunku do ilości wody użytej do pożywki dodaje się 0,1-0,5% potasowego fosforanu dwuzasadowego.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się przy nieregulowanym pH w temperaturze 35-45°C.

PL 188717 B1

Sposób otrzymywania lipazy

Zastrzeżenia patentowe

1 Sposób otrzymywania lipazy metodą hodowli wglębnej grzyba strzępkowego rodzaju *Rhizopus* w warunkach aerobowych na pożywce ciekłej uprzednio wysterylizowanej zawierającej kazeinę techniczną i olej jadalny oraz wzbogaconej solami mineralnymi, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się przy użyciu szczepu *Rhizopus cohnii* KKP/787 na pożywce zawierającej kazeinę techniczną uprzednio rozpuszczoną w wodzie w obecności potasowego fosforanu dwuzasadowego, przez stopniowe podgrzewanie środowiska do wrzenia z jednoczesnym mieszaniem, przy czym na 0,2-2,5% kazeiny technicznej w stosunku do ilości wody użytej do pożywki dodaje się 0,1-0,5% potasowego fosforanu dwuzasadowego.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się przy nieregulowanym pH w temperaturze 35-45°C.

* * *

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania lipazy przeznaczonej głównie do produkcji środków piorących i oczyszczania ścieków przemysłowych obciążonych dużą ilością związków tłuszczowych, uzyskanej na drodze hodowli wglębnej grzyba strzępkowego.

Lipazy występują w komórkach roślinnych i zwierzęcych, a także są wytwarzane przez bakterie, drożdże i grzyby strzępkowe. Enzymy te odgrywają niezwykle ważną rolę w procesach hydrolizy i syntezy połączeń estrowych. Cechą charakterystyczną lipaz, różniącą je od innych enzymów, jest zdolność działania na substraty nierozpuszczalne w wodzie.

Z literatury naukowej, np. Applied Biochemistry and Biotechnology 1994, 49(1), 59-75, Journal of Fermentation and Bioengineering 1993, 76(2), 94-97, Biotechnology Letters 1993, 15(4), 357-360, Biotechnologia 1995, 2(29), 82-91, Bioresource Technology 1995, 54(1), 81-83, Enzyme and Microbial Technology 1995, 17(9), 832-838, znane jest otrzymywanie lipazy metodą hodowli wglębnej drobnoustrojów na pożywkach ciekłych zawierających wytloki sojowe, ekstrakt kukurydziany, ekstrakt drożdżowy, mleko odtuszczone, mocznik, sacharozę, glukozę, serwatkę w proszku, rozmaite sole mineralne stanowiące źródło nieorganicznego azotu, fosforu, magnezu, oraz jako induktor biosyntezy enzymu, najczęściej olej z oliwek, Tween 80, kwasy kaprikowy, kumarowy, ferukowy.

Z patentu polskiego nr 150 601 znany jest sposób otrzymywania preparatów lipaz i esteraz polegający na hodowli szczepu pleśni *Mucor javanicus* T45 na podłożu zawierającym oliwę z oliwek lub olej, korzystnie sojowy, słonecznikowy, uniwersalny, stołowy, namok kukurydziany, azotan sodowy, siarczan magnezowy. Hodowlę prowadzi się w temperaturze 29-31°C. Preparaty te przeznaczone są do katalizowania reakcji estryfikacji kwasów karboksylowych i alkoholi alifatycznych w środowisku rozpuszczalników organicznych. Wykazują też aktywność w reakcji hydrolizy estrów kwasów karboksylowych i alkoholi alifatycznych w środowisku wodnym.

W patencie polskim nr 167 092 opisano sposób otrzymywania preparatu lipazy poprzez hodowlę szczepu pleśni *Rhizopus nigricans* IBT-23 na podłożu produkcyjnym zawierającym w swoim składzie oliwę z oliwek lub olej, korzystnie sojowy, rzepakowy, słonecznikowy, lniany, oraz kazeinę techniczną. Hodowlę produkcyjną prowadzi się w temperaturze 25-30°C. Otrzymany preparat ma zastosowanie, zwłaszcza jako katalizator reakcji hydrolizy tłuszczów roślinnych i zwierzęcych.

Patent amerykański nr 4665029 ujawnia preparat lipazy, otrzymany w wyniku hodowli grzyba strzępkowego *Rhizopus chinensis* FERM BP-936, który jest specyficzny przeciw trójglicerydom - rozbija wiązania estrowe w 1 i 3 pozycji, ale nie w 2 pozycji. W patencie tym

podany jest przykładowy sposób hodowli grzyba *Rhizopus*, w temperaturze 27°C, na pożywce zawierającej pepton, glukozę, azotan sodu, kwaśny fosforan potasu i siedmiowodny siarczan magnezu.

Według znanych metod, pożywka przeznaczona do hodowli wglębnej grzybów strzępkowych w celu biosyntezy lipazy jest sterylizowana pod ciśnieniem za pomocą wymienników ciepła lub bezpośrednio w fermentorze, a następnie schładzana do temperatury właściwej dla rozwoju użytego mikroorganizmu. Schłodzona pożywka jest szczepiona najczęściej grzybnia uzyskaną z hodowli wglębnej. Po zaszczepieniu, proces biosyntezy prowadzony jest przy stałym mieszaniu i napowietrzaniu środowiska hodowlanego w czasie 60-120 godzin w temperaturze 28-32°C.

Znane preparaty lipaz działają w różny sposób na kwasy tłuszczowe posiadające różne długości łańcuchów węglowych, co daje w efekcie różny stopień degradacji tłuszczów roślinnych lub zwierzęcych. W związku z tym otrzymane lipazy mogą być bardziej przydatne do degradacji określonych rodzajów tłuszczów, np. w przypadku tłuszczów zwierzęcych - jedne są bardziej przydatne do degradacji tłuszczów drobiowych, inne - do degradacji tłuszczów wołowych.

W różnych opisach patentowych są podawane różne aktywności otrzymanych preparatów lipaz, jednak jednostki te nie mogą być porównywalne między sobą, ponieważ istnieje bardzo różnorodna ilość metod oznaczania aktywności lipazy i w związku z tym wyrażanie tej aktywności w różnych jednostkach.

Celem wynalazku jest opracowanie ekonomicznego i wydajnego sposobu produkcji lipazy na drodze hodowli grzyba strzępkowego metodą wglębną aerobową w pożywce ciekłej opartej o minimalną zawartość łatwo dostępnych i tanich surowców.

Sposób według wynalazku polegający na hodowli wglębnej grzyba strzępkowego rodzaju *Rhizopus* w warunkach aerobowych na pożywce ciekłej uprzednio wysterylizowanej zawierającej kazeinę techniczną i olej jadalny oraz wzbogaconej solami mineralnymi polega na tym, że hodowlę prowadzi się przy użyciu szczepu *Rhizopus cohnii* KKP/787 na pożywce zawierającej kazeinę techniczną uprzednio rozpuszczoną w wodzie w obecności potasowego fosforanu dwuzasadowego, przez stopniowe podgrzewanie środowiska do wrzenia z jednoczesnym mieszaniem, przy czym na 0,2-2,5% kazeiny technicznej w stosunku do ilości wody użytej do pożywki dodaje się 0,1-0,5% potasowego fosforanu dwuzasadowego. Zgodnie ze sposobem według wynalazku hodowla grzyba przebiega przy nieregulowanym pH w temperaturze 35-45°C.

W wyniku wielu przeprowadzonych doświadczeń z użyciem grzybów strzępkowych różnych rodzajów jak np. *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, stwierdzono nieoczekiwanie, że szczep grzyba *Rhizopus cohnii* KKP/787 odznacza się dużą zdolnością wytwarzania lipazy na oszczędnej pożywce produkcyjnej. Zgodnie z wynalazkiem hodowlę grzyba *Rhizopus cohnii* KKP/787 prowadzi się na pożywce zawierającej w stosunku do ilości użytej wody: 0,2-2,5% kazeiny technicznej, 0,3-2,0% oleju jadalnego, najkorzystniej słonecznikowego, 0,1-0,5% potasowego fosforanu dwuzasadowego, 0,02-0,1% siarczany magnezowego siedmiowodnego. Kazeina techniczna, jako jeden z wybranych i podstawowych składników pożywki do biosyntezy lipazy przez szczep *Rhizopus cohnii* KKP/787 jest w pełni przyswajalna przez drobnoustroj jedynie w formie całkowicie rozpuszczonej. Nieoczekiwanie okazało się, że jej rozpuszczalność jest możliwa wyłącznie w obecności potasowego fosforanu dwuzasadowego, który stanowi jednocześnie dogodne źródło fosforu dla użytego drobnoustroju. Szczep *Rhizopus cohnii* KKP/787 jest zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego.

Nieoczekiwanie okazało się również, że lipaza otrzymana sposobem według wynalazku wykazuje wyjątkowo wysokie predyspozycje do głębokiej degradacji (hydrolizy) zarówno tłuszczu wołowego jak i tłuszczu drobiowego.

Ważną zaletą wynalazku jest dobór szczepu grzyba pozwalający na prowadzenie hodowli w temperaturach od 35 do 45°C, a więc znacznie wyższych niż optymalna temperatura wzrostu większości grzybów strzępkowych. Stwarza to ograniczenie do minimum możliwości powstania zakażeń pożywki w czasie hodowli. Zgodnie z wynalazkiem, hodowlę prowadzi się

przy naturalnym pH tzn. nie ustala się początkowego pH hodowli jak również nie ma potrzeby jego regulowania w trakcie procesu. Stanowi to znaczne uproszczenie w prowadzeniu biosyntezy lipazy, a wynika z odpowiednio dobranego składu ilościowego i jakościowego podłoża. Ponadto sposób według wynalazku pozwala na wykorzystanie tanich i łatwo dostępnych surowców jako składników pożywki.

Otrzymana sposobem według wynalazku lipaza ma optymalny zakres działania pH od 7,5 do 9,5 i optymalny zakres temperatury działania od 35 do 45°C, co umożliwia jej zastosowanie w chemii gospodarczej do produkcji środków piorących i do degradacji tłuszczów w ściekach przemysłowych. Otrzymany preparat lipazy charakteryzuje się specyficznymi właściwościami, szczególnie przydatnymi do transestryfikacji tłuszczu w układach o subkrytycznie niskiej zawartości wody i środowiskach bezwodnych.

Sposób otrzymywania lipazy według wynalazku ilustrują przykłady wykonania nie ograniczając jego zakresu.

P r z y k ł a d 1. Do 8 litrów wody wodociągowej dodano 90 g kazeiny technicznej, 6,0 g potasowego fosforanu dwuzasadowego i 4,5 g siarczanu magnezowego siedmiowodnego. Stopniowo podgrzewano roztwór do wrzenia z jednoczesnym mieszaniem. W wyniku rozpuszczenia kazeiny następowała zmiana barwy roztworu do mlecznej. Roztwór przeniesiono do fermentora, dodano 120 g oleju jadalnego słonecznikowego i uzupełniono objętość pożywki wodą do 9 litrów. Pożywkę bez ustalenia początkowej wartości pH sterylizowano przy ciśnieniu 1 bara w czasie 1 godziny. Po schłodzeniu do 38°C, pożywkę zaszczerpiono zawiesiną grzybni *Rhizopus cohnii* KKP/787 w ilości 7,0% objętościowych. Hodowlę prowadzono w temperaturze 38°C w ciągu 70 godzin przy napowietrzaniu w ilości 0,5 litra powietrza/1 litr pożywki · minutę i mieszaniu z szybkością 240 obrotów mieszadła/minutę. Końcowe pH hodowli wyniosło pH 6,5. Po zakończeniu hodowli, grzybnię oddzielono za pomocą wirówki koszowej przy szybkości 3000 obrotów/minutę w czasie 10 minut, a otrzymaną ciecz zawierającą lipazę zagęszczono w wyparce próżniowej do uzyskania koncentratu o końcowej zawartości suchej masy 55%. Otrzymany koncentrat preparatu lipazy miał aktywność 75000 J/ml.

W otrzymanym preparacie oznaczono optimum działania enzymu przy różnym pH i w różnej temperaturze. Wyniki podano w tabelach 1 i 2.

T a b e l a 1

pH mieszaniny reakcyjnej w temp. 37°C	% aktywności lipolitycznej
6,5	47,0
7,0	83,0
7,5	90,0
8,0	98,0
8,5	100,0
9,0	97,0
9,5	88,0

Tabela 2

Temperatura mieszaniny reakcyjnej w °C	% aktywności lipolitycznej przy pH 7,0
30	40,0
35	97,0
37	100,0
40	96,0
45	85,0
50	68,0
55	48,0
60	30,0

Otrzymany preparat zastosowano do hydrolizy tłuszczu wołowego i drobiowego. Preparat ten wykazał wyjątkowe predyspozycje do głębokiej degradacji (hydrolizy) zarówno tłuszczu wołowego jak i tłuszczu drobiowego. W przypadku hydrolizy tłuszczu wołowego, po 24 godzinach działania enzymu stwierdzono, w zależności od dawki preparatu, obecność od 51,2% do 58,2% wyższych kwasów tłuszczowych zaś w przypadku tłuszczu drobiowego od 53,8% do 71,8% wyższych kwasów tłuszczowych po tym samym czasie prowadzenia reakcji. W produktach uzyskanych w wyniku degradacji (hydrolizy) tłuszczu wołowego i tłuszczu drobiowego występowały głównie triacylglicerole, odpowiednio 94,2% i 96,6%. Nie stwierdzono obecności monoacylgliceroli natomiast obecność diacylgliceroli była na poziomie odpowiednio, w tłuszczu wołowym 3,6% i w tłuszczu drobiowym 1,4%.

P r z y k ł a d II. Do 8 litrów wody wodociągowej dodano 25 g kazeiny technicznej, 3,0 g potasowego fosforanu dwuzasadowego i 2,0 g siarczanu magnezowego siedmiowodnego. Dalej postępowano analogicznie jak w przykładzie 1, tj. do momentu rozpuszczenia kazeiny i przeniesienia roztworu do fermentora. Następnie dodano 60 g oleju jadalnego słonecznikowego. Dalej postępowano analogicznie jak w przykładzie 1, tj. do momentu uzyskania cieczy pozbawionej składników stałych. Do cieczy pochodzącej dodano porcjami siarczan amonowy doprowadzając jego stężenie w mieszaninie do 75% przy ciągłym powolnym mieszaniu. Roztwór pozostawiono przez okres 60 minut, tj. do momentu uformowania precypitatu. Uformowany precypitat oddzielono od cieczy w wirówce przy 4500 obrotów/minutę przez 20 minut. Otrzymany osad rozpuszczono w wodzie wodociągowej. Proces oddzielenia soli amonowej z jednoczesnym zagęszczeniem enzymu prowadzono w komorze ultrafiltracyjnej firmy AMICON na membranie PM-10 o współczynniku odcinania 10000. Zagęszczony trzykrotnie tym sposobem roztwór enzymu, pozbawiony większej ilości soli amonowej, mieszano ze skrobią rozpuszczalną i mieszaninę pozostawiono do momentu uzyskania powietrznie suchego preparatu lipazy w stanie stałym. Aktywność preparatu wynosiła 6500 J/g.