



MD 1930 G2 2002.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1930⁽¹³⁾ G2
(51) Int. Cl.⁷: C 11 B 1/10;
C 12 N 1/16

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2000 0094 (22) Data depozit: 2000.05.29	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2002.05.31, BOPI nr. 5/2002
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: USATÎ Agafia, MD; CALCATINIUC Aurica, MD; GROSU Lilia, MD; ȘIRȘOV Tatiana, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de extragere a lipidelor din drojdii

(57) Rezumat:

1 Invenția se referă la biotehnologie, și anume la
procedeul de obținere a lipidelor din drojdii.

Esența invenției constă în aceea că procedeul
de extragere a lipidelor din drojdii include tratarea
biomasei umede cu amestecul de solvenți organici
etanol:cloroform:acid acetic de 10% în raportul
5:1:1 timp de 20 min, cu adăugarea ulterioară la
suspensia obținută a cloroformului până la
atingerea raportului final al solvenților de 5:10:1,
respectiv. După extracția timp de 20 min faza
lichidă se decantează, se spală și se evaporă până la
uscare. Cantitatea totală a amestecului de solvenți

2
5 constituie 48...80 părți de volum la o parte de masă
de biomasă uscată.

Rezultatul invenției constă în micșorarea
cantității de solvenți organici utilizați, reducerea
duratei de extracție a lipidelor din biomasa de
drojdii și în mărirea randamentului lor.

10 Revendicări: 1

15

MD 1930 G2 2002.05.31

MD 1930 G2 2002.05.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie și anume la procedeele de obținere a lipidelor din drojdii, folosite în medicină, medicina veterinară, industria cosmetică.

5 Este cunoscut procedeul de extracție a lipidelor din biomasa umedă a ciupercilor miceliale, bazat pe utilizarea succesivă a soluției 0,3...3% de acid acetic și etanol cu 0,1...5% trinitrufosfat, apoi a hexanului [1].

Se mai cunoaște și procedeul de extracție a lipidei A din celulele liofilizate a bacteriilor gramnegative cu amestecul cloroform : metanol - 0,9 : acid clorhidric 1,8% [2].

10 Dezavantajele acestor procedee se exprimă prin procesul complicat al lucrărilor și durata de extracție de peste 5...6 ore.

De asemenea este cunoscut procedeul Bligh, Dyer, care constă în extracția lipidelor din biomasa microbiană cu sistemul de solvenți cloroform : metanol în raportul 1:2 în mai multe repetări [3]. Elementele esențiale: 1) biomasa se diluează cu apă (40...50 mg celule + 1 ml apă), se adaugă 3,75 ml amestec cloroform : metanol (1:2), se agită și se lasă la temperatura camerei câteva ore periodic agitând. Celulele microbiene se sedimentează, extractul se decantează; 2) celulele microbiene iarăși se suspendă în 4,75 ml amestec cloroform : metanol : apă (1:2:0,8 după volum), amestecul se agită și se centrifughează, extractul (supernatantul) se decantează; 3) extractele decantate se unesc și la ele se adaugă 2,5 ml cloroform și 2,5 ml apă. Stratul de cloroform cu lipide se separă de la stratul apă-metanol prin centrifugare; 4) cloroformul se evaporă la rotor.

20 Acest procedeu prezintă dezavantaje prin aceea că are o durată lungă de extracție și consum mare de solvenți.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în îmbunătățirea procesului tehnologic exprimată prin micșorarea duratei de extracție a lipidelor din biomasa de drojdie și a cantităților de solvenți utilizați.

25 Esența invenției constă în aplicarea procedurii ce se bazează pe hidroliza selectivă a biopolimerilor nemijlocit în celula microbiană cu amestecul de solvenți organici etanol : cloroform : acid acetic de 10%. Biomasa umedă (umiditatea 70...75%) de drojdii, spre exemplu reprezentanții genurilor *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* sau *Lipomyces*, se tratează cu amestecul de solvenți organici etanol : cloroform : acid acetic de 10% în raportul 5:1:1. Suspensia de celule și solvenți se agită 20 min la temperatura camerei la agitatorul magnetic. În continuare se adaugă cloroform până la raportul final al solvenților de 5:10:1 și extracția se prelungește încă 20 min, astfel că cantitatea totală de solvenți alcătuiește 48...80 părți de volum la o tracțiune gravimetrică a biomasei. Acest amestec asigură un grad satisfăcător de distrugere a peretelui celular și eliberare a lipidelor la temperatura camerei. În continuare, faza lichidă se decantează, se spală de impuritățile nelipide cu apă distilată de 2-3 ori în pâlniile de separare. Extractul de lipide și cloroform (faza de jos) se deshidratează trecându-l prin sulfat de sodiu anhidru. Cloroformul se evaporă la rotor. Lipidele uscate se cântăresc.

35 Rezultatul invenției constă în micșorarea cantităților de solvenți organici utilizați, reducerea duratei de extracție a lipidelor din biomasa de drojdii și în mărirea randamentului lor.

Exemple de realizare a invenției.

40 *Exemplul 1.* 1 g biomasă uscată de drojdie (*Sporobolomyces pararoseus*, *Rhodotorula gracilis* sau *Lipomyces lipofer*) se umezește, apoi se tratează cu 35 ml amestec de etanol : cloroform : acid acetic de 10% în proporția 5:1:1. Suspensia se agită 20 min la agitatorul magnetic la temperatura camerei. În continuare, la această suspensie se adaugă 45 ml cloroform, raportul final fiind 5:10:1, raportul biomasă uscată : solvent - 1:80. Agitarea se prelungește încă 20 min. Apoi, faza lichidă se decantează prin filtrare, se spală de impuritățile nelipide cu apă distilată (după volum 1:1) în pâlniile de separare. Extractul de lipide și cloroform (faza de jos) se deshidratează trecându-l prin sulfat de sodiu anhidru. Amestecul de lipide și cloroform se concentrează prin evaporarea cloroformului la rotor la temperatura de 35°C până la greutatea constantă a lipidelor.

Lipidele extrase alcătuiesc 33,5±5,1%, 16,3±1,4%, 24,5±1,2% din biomasă, respectiv, pentru drojdiile nominalizate. Consumul specific de solvenți pentru tratarea 1 kg de biomasă uscată alcătuiește 25 L etanol, 50 L cloroform, 5 L acid acetic de 10% (tabel).

50 *Exemplul 2.* Procesul de extracție se repetă conform exemplului 1, însă biomasa se tratează la prima etapă cu 28 ml amestec etanol : cloroform : acid acetic de 10% în proporția 5:1:1. După 20 min de agitare se adaugă 36 ml cloroform, raportul final etanol : cloroform : acid acetic de 10% fiind 5:10:1, raportul biomasă uscată : solvenți - 1:64.

MD 1930 G2 2002.05.31

4

Cantitatea lipidelor extrase constituie $30,8 \pm 5,1\%$, $15,3 \pm 1,0\%$, $23,3 \pm 1,3\%$ din biomasă. Consumul specific de solvenți pentru 1 kg biomasă uscată de drojdie alcătuiește 20 L etanol, 40 L cloroform, 4 L acid acetic de 10% (tabel).

5 *Exemplul 3.* Procesul de extracție se repetă conform exemplului 1, însă biomasă se tratează la prima etapă cu 21 ml amestec etanol : cloroform : acid acetic de 10% în proporție 5:1:1. După 20 min de agitare se adaugă 27 ml cloroform, raportul final etanol : cloroform : acid acetic de 10% fiind 5:10:1, raportul biomasă uscată : solvenți - 1:48.

10 Cantitatea lipidelor extrase constituie $28,8 \pm 4,7\%$, $12,9 \pm 1,7\%$, $21,3 \pm 0,9\%$ din biomasă. Consumul specific de solvenți pentru 1 kg biomasă uscată de drojdie alcătuiește 15 L etanol, 30 L cloroform, 3 L acid acetic de 10% (tabel).

Tabel

Eficiența procedeeelor de extracție a lipidelor din drojzii										
Procedeul	Raportul 1 biomasă uscată : solvenți	Cantitatea lipidelor in extract, %						Consum specific de solvenți, L/kg biomasă uscată		
		<i>Sp. pararoseseus ICNM-YS-01</i>		<i>Rh. gracilis BKM-y-335</i>		<i>L. lipofer BKM-y-218</i>		Alcool	Cloro- form	Acid acetic de 10%
		(M+m)	T _{95%}	(M+m)	T _{95%}	(M+m)	T _{95%}			
Propus	1:80	33,3±5,1	2,90	16,3±1,4	4,10	24,5±1,2	8,80	25 (etanol)	50	5
	1:64	30,8±5,1	2,78	15,3±1,0	4,40	23,3±1,3	7,80	20 (etanol)	40	4
	1:48	28,8±4,7	2,58	12,9±1,7	2,82	21,3±0,9	8,26	15 (etanol)	30	3
Bligh, Dyer, soluția cea mai apropiată	1:200	17,0±2,2	-	9,2±0,9	-	11,83±0,72	-	100 (metanol)	100	0

15 Valorile criteriului de autenticitate teoretică T_{95%} = 2,78

MD 1930 G2 2002.05.31

5

(57) Revendicare:

- Procedeu de extragere a lipidelor din drojdii ce include tratarea biomasei umede cu amestec de solvenți organici, decantarea fazei lichide, spălarea și evaporarea ei până la uscare, **caracterizat prin aceea că** tratarea biomasei umede se efectuează cu amestec de etanol:cloroform:acid acetic de 10% în raportul 5:1:1 timp de 20 min, apoi componența solvenților se schimbă prin adăugarea cloroformului în suspensia obținută până la atingerea raportului final al solvenților organici de 5:10:1, respectiv, și tratarea continuă încă 20 min, cantitatea totală de solvenți organici constituind 48...80 părți de volum la o parte de masă de biomasă uscată.
- 10

(56) Referințe bibliografice:

1. SU 1693055 A1
2. SU 1581718 A1
3. Кейтс М. Техника липидологии. Москва, Мир, 1975, с. 304

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2000 0094	(85) Data fazei naționale PCT:	
(22) Data depozit: 2000.05.29	(86) Cerere internațională PCT:	
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (51) Int. Cl. (7) : C 11 B 1/10, C 12 N 1/16 Alți indici de clasificare: (54) Titlul : Procedeu de extracție a lipidelor din drojdii (71) Solicitantul : Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD Termeni caracteristici :		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. - 7)		
C 11 B 1/10, C 12 N 1/16		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
A - document care definește statutul general al tehnicii		T - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data efectuării de documentare		2000.12.05
Examinatorul		Bantaș Valentina

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr. depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4