



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 288 076**

⑫ Número de solicitud: 200501553

⑮ Int. Cl.:
C12N 9/20 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **24.06.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2007**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.12.2007

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Vigo**
Campus Universitario Lagoas Marcosende
36310 Vigo, Pontevedra, ES

⑱ Inventor/es: **Longo González, María Asunción;**
Fuciños González, Juan Pablo;
Domínguez Represas, Alberto;
Rúa Rodríguez, María Luisa;
Sanromán Braga, María Ángeles y
Pastrana Castro, Lorenzo Miguel

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Procedimiento para la obtención de enzimas termofílicas con actividad lipolítica de microorganismos del género *Thermus*.**

㉕ Resumen:

Procedimiento para la obtención de enzimas termofílicas con actividad lipolítica de microorganismos del género *Thermus*.

El procedimiento consiste en cultivar microorganismos del género *Thermus* en un medio de crecimiento preparado con un agua termal minero-medicinal y someter los postincubados a etapas secuenciales de congelación, descongelación y centrifugación. El resultado de tal proceder es la obtención de enzimas termofílicas con actividad lipolítica en el líquido extracelular. El procedimiento y el producto de su aplicación son de interés en industrias de fabricación de enzimas, farmacéutica, química fina o actividades de investigación y desarrollo.

ES 2 288 076 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de enzimas termofílicas con actividad lipolítica de microorganismos del género *Thermus*.

Sector de la técnica

El procedimiento que se describe es de aplicación inmediata en la industria de fabricación de enzimas, destinándose el producto obtenido (enzimas lipolíticas termofílicas) a la industria farmacéutica, química fina o actividades de investigación y desarrollo.

Estado de la técnica

Las enzimas lipolíticas (lipasas, esterases) presentan una gran variedad de aplicaciones industriales en sectores muy diversos, tales como la fabricación de detergentes, aromas y principios farmacéuticos homóquiales, industria alimentaria, del papel y pasta de papel, cuero, e incluso en la depuración de aguas residuales.

Uno de los mayores problemas encontrados en la utilización de enzimas como biocatalizadores industriales es su desactivación a altas temperaturas, lo que supone un incremento en los costes de operación asociados. Se han desarrollado estrategias para obtener enzimas termoestables, tales como la variación de su estructura molecular por mutagénesis dirigida o por modificación química de superficie, o la aplicación de técnicas de inmovilización que permiten además recuperar y reutilizar el biocatalizador.

Los microorganismos termófilos crecen a temperaturas por encima de los 45°C, y en algunos casos (hipertermófilos) incluso por encima de 90°C. Las enzimas producidas por estos microorganismos presentan una elevada estabilidad térmica y resistencia a desnaturalizantes químicos (sales caotrópicas, disolventes orgánicos, detergentes). Estas propiedades hacen posible su utilización en procesos a temperatura elevada con pérdidas mínimas de actividad, con el consiguiente incremento en la velocidad de reacción y en la solubilidad de reactivos. Se han descrito diversas enzimas termofílicas de potencial aplicación en procesos biotecnológicos, destacando las enzimas amilolíticas, celulasas, xilanasas, quitinasa, proteasas, DNA polimerasas, transcriptasas inversas, ligasas, glucosa isomerasas y alcohol-des-hidrogenasas.

Recientemente se ha indicado la capacidad de diversas cepas de género *Thermus* para producir enzimas con actividad lipolítica, que pueden ser liberadas al medio de cultivo. Se han identificado dos enzimas, de pesos moleculares 32 y 64 kDa, que presentan elevada actividad a pH alcalino y alta temperatura, así como una excepcional termoestabilidad y estabilidad en presencia de concentraciones elevadas de disolventes orgánicos. Si bien se han descrito aspectos relacionados con las condiciones de cultivo a pequeña escala, purificación y caracterización, no existen procedimientos registrados para su obtención con vistas a su aplicación industrial.

A continuación se concretan algunos artículos relacionados:

BECKER R.J., STARZYK M.J. (1984) Morphology and rotund body formation in *Thermus aquaticus*. *Microbios*. 41, 115-129.

BERGER J.L., LEE B.H., LACROIX C. (1995) Identification of new enzyme activities of several strains of *Thermus species*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 81-87.

DOMÍNGUEZ A., SANROMÁN A., FUCIÑOS P., RÚA M.L., PASTRANA L., LONGO M.A. (2004) Quantification of intra- and extracellular thermophilic lipase/esterase production by *Thermus sp.* *Biotechnol. Lett.* 26, 705-708.

FUCIÑOS P., ABADÍN C.M., SANROMÁN A., LONGO M.A., PASTRANA L., RÚA M.L. (2005) Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: partial purification and preliminary biochemical characterisation. *J. Biotechnol.* 117, 233-241.

JAEGER K.E., REETZ M.T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH* 16, 396-403.

LAGARDE D., NGUYEN H.K., RAVOT G., WAHLER D., REYMOND J.L., HILLS G., VEIT T., LEFEVRE F. (2002) High-throughput screening of thermostable esterases for industrial bioconversions. *Organic Process Res. Develop.* 6, 441-445.

NIEHAUS F., BERTOLDO C., KAHLER M., ANTRANIKIAN G. (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 711-729.

SCHIRALDI C., DE ROSA M. (2002) The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *TIBTECH* 20, 515-521.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

- 5 Se propone un procedimiento para la obtención de enzimas con actividad lipolítica por cultivo de microorganismos del género *Thermus*, consistente en el diseño de un medio de cultivo y las condiciones de operación adecuadas para la producción de un nivel elevado de actividad lipolítica extracelular, así como en la definición de un sistema para la recuperación en el líquido extracelular de las enzimas producidas.

10 Descripción detallada de la invención

- La obtención de enzimas termofílicas con actividad lipolítica se basa en cultivar un microorganismo del género *Thermus* en un medio y condiciones adecuados, y posteriormente recuperar las enzimas en el líquido extracelular mediante etapas de congelación/descongelación y centrifugación.

- 15 Los detalles del procedimiento son los siguientes:

Composición del medio de cultivo

- 20 El medio de cultivo utilizado consiste en una disolución en agua minero-medicinal termal de alta mineralización y con un elevado contenido en residuo seco de una fuente de carbono como glucosa u otro azúcar simple, una fuente de nitrógeno como extracto de levadura u otro hidrolizado proteico y una mezcla de sales, todos ellos a las concentraciones adecuadas para promover el crecimiento del microorganismo y la producción de enzimas con actividad lipolítica, cuyo pH se ajusta inicialmente a un valor cercano a la neutralidad. Cuando se utilizan fuentes de nitrógeno complejas puede 25 obviarse la adición de la fuente de carbono al medio de cultivo.

Cultivo para obtención de inóculo

- El inóculo para el proceso de producción se obtiene por cultivo axénico de un microorganismo del género *Thermus* 30 en el medio descrito anteriormente mediante la adición de células del microorganismo conservadas congeladas a matraces de tipo Erlenmeyer con una relación de carga inferior al 50% y sin necesidad de aireación forzada. Tras homogeneizar la mezcla, se incuba con agitación constante y temperatura controlada comprendida entre 50 y 90°C durante un tiempo que permita alcanzar un nivel suficiente de crecimiento celular.

- 35 A continuación, se recupera la biomasa por centrifugación, eliminando la humedad en exceso, y se conserva congelada hasta su posterior uso como inóculo.

Cultivo para obtención de enzima

- 40 Esta etapa del proceso se lleva a cabo en condiciones estériles, y todo el material y disoluciones empleadas deben ser esterilizadas previamente en autoclave.

- Cuando se trata de obtener volúmenes pequeños de enzima el cultivo del microorganismo puede realizarse siguiendo el mismo procedimiento descrito en la preparación del inóculo. Por el contrario, para volúmenes de medio 45 de cultivo superiores a un litro, éste se introduce en un fermentador equipado con sistema de aireación. En todos los casos, es necesario dejar un volumen libre suficiente en los recipientes para facilitar la transferencia de oxígeno. El medio se inocula con una cantidad determinada de biomasa activa de *Thermus*, obtenida como se indica en el apartado anterior. Tras homogeneizar la mezcla, se incuba con agitación constante y temperatura controlada comprendida entre 50 y 90°C durante un tiempo que permita alcanzar un nivel suficiente de crecimiento celular.

- 50 *Recuperación del enzima*

- La suspensión celular obtenida en el cultivo de producción enzimática se congela con el fin de desintegrar estructuras celulares en donde pudiera quedar retenida la enzima y facilitar así su recuperación. Una vez descongelada a 55 temperatura ambiente se separa la biomasa por centrifugación, y se conserva el sobrenadante, en el cual se encuentra la actividad enzimática.

Descripción detallada de las figuras

- 60 Figura 1

- Evolución de la producción de biomasa y de actividad lipolítica extracelular en cultivos de *Thermus thermophilus* HB27 sobre medio preparado con agua ultrapura de calidad Milli-Q (símbolos negros) y agua minero-medicinal termal (símbolos blancos). Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 2 L de capacidad, con 400 mL de medio de 65 cultivo, incubados a 70°C en las condiciones descritas en el Ejemplo 1.

Figura 2

Evolución de la producción de biomasa (símbolos negros) y de actividad lipolítica extracelular (símbolos blancos) en cultivos de *Thermus thermophilus* HB27 llevados a cabo en un reactor de tanque agitado de 5 L de capacidad, con 3 L de medio de cultivo preparado con agua minero-medicinal termal, incubados a 70°C en las condiciones descritas en el Ejemplo 2. Las dos líneas de trazos indican el inicio de operación en modo continuo con un caudal de 1 L/día (tiempo de residencia $\tau = 72$ h), y el cambio a medio de cultivo de alimentación preparado con agua ultrapura de calidad Milli-Q.

Figura 3

Comparación entre la actividad lipolítica extracelular detectada en diversos cultivos de *Thermus thermophilus* HB27 cuando los postincubados se someten sólo a una etapa de centrifugación para separar la biomasa (barras negras) o a sucesivas etapas de congelación, descongelación y centrifugación (barras grises), según lo indicado en el Ejemplo 3.

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

Producción de enzimas con actividad lipolítica por Thermus thermophilus HB27, en pequeño volumen y con medios de cultivo preparados en distintos tipos de agua.

En este primer ejemplo se compara la influencia del tipo de agua utilizada en la preparación del medio de cultivo sobre la evolución de la producción de biomasa y de actividad lipolítica extracelular en cultivos de *Thermus thermophilus* HB27, realizados según el procedimiento descrito.

Los medios de cultivo utilizados consistieron en disoluciones de los siguientes compuestos, en las cantidades indicadas: tripticasa (8 g/L), extracto de levadura (4 g/L) y NaCl (3 g/L). El pH se ajustó inicialmente a un valor de 7,5 $\pm$ 0,2 por adición de NaOH 1 M. Se utilizaron dos medios, el primero preparado en agua ultrapura de calidad Milli-Q y el segundo en un agua minero-medicinal termal de alta mineralización y elevado contenido en residuo seco, cuyas propiedades físico-químicas y composición se indican en la Tabla 1.

El inóculo para el proceso de producción se obtuvo por cultivo del microorganismo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, en los que se introdujeron 50 mL del mismo medio de cultivo. Se taparon con tapones de celulosa, para permitir la aireación pasiva de los cultivos. A cada matraz se añadió 1,5 mg (peso seco) de biomasa activa de *Thermus thermophilus* HB27, previamente preparada, lo cual corresponde a una proporción de inóculo de 30 mg de células (peso seco)/L. Tras homogeneizar la mezcla, se incubó durante 24 horas o hasta un nivel adecuado de crecimiento del microorganismo (concentración celular de aproximadamente 1 g/L) en incubador orbital a una temperatura constante de 70°C y una velocidad de agitación de 100 r.p.m. Para comprobar el nivel de crecimiento celular se tomaron muestras periódicamente y se centrifugaron durante 10 min a 5000 x g y 4°C para separar la biomasa, que se determinó, una vez lavada para eliminar los restos de medio de cultivo, gravimétricamente mediante pesada.

La masa celular producida se recuperó, siempre en condiciones estériles, por centrifugación durante 10 minutos a 5000 x g y 4°C. A continuación, se distribuyó en viales estériles, eliminando la humedad con ayuda de una bomba de vacío, y se conservó a -20°C hasta su posterior uso como inóculo.

Los cultivos de producción enzimática se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 2 L de capacidad, en los que se introdujeron 400 mL de los medios de cultivo descritos. Los matraces se taparon con tapones de celulosa, que permiten la aireación pasiva de los cultivos. A cada matraz se añadió una proporción de inóculo de *Thermus thermophilus* HB27, previamente preparada como se indica, de 30 mg de células (peso seco)/L. Tras mezclar adecuadamente, se incubó durante 32 horas en incubador orbital a una temperatura constante de 70°C y una velocidad de agitación de 100 r.p.m. Periódicamente, se tomaron muestras que se utilizaron para determinar el crecimiento celular y la actividad enzimática en el líquido extracelular. Se separó la biomasa de las muestras y se determinó su concentración de modo idéntico al utilizado en los cultivos de preparación de inóculo. El sobrenadante obtenido en la centrifugación se utilizó para determinar la actividad enzimática, por medida de la hidrólisis de laurato de *p*-nitrofenilo a 65°C y pH 8,0 (Fuciños *et al.*, 2005).

Los resultados de tal proceder se muestran en la Figura 1, expresados en función de la evolución a lo largo del tiempo de la concentración de biomasa y la actividad lipolítica extracelular, en los dos medios de cultivo ensayados. De ellos se deduce la aptitud del procedimiento para la producción de enzimas con actividad lipolítica en el medio descrito, preparando el mismo en un agua minero-medicinal termal con elevado contenido en residuo seco. En este caso, se alcanzan a las 24 h de incubación los niveles máximos de actividad enzimática, con valores cercanos a 130 U/L. Ello supone un nivel interesante de producción, habida cuenta de los bajos niveles de expresión en la producción de enzimas extracelulares encontrados habitualmente en microorganismos termófilos.

Cabe señalar que cuando el medio de cultivo se prepara en agua ultrapura de calidad Milli-Q, los valores máximos de actividad enzimática se obtienen más tarde (a las 28-32 h de cultivo), y son sensiblemente inferiores a los alcanzados en el otro medio (85 U/L a las 32 h, un 33% inferiores a los detectados en agua minero-medicinal a ese mismo tiempo de cultivo). En lo que se refiere a la biomasa, los perfiles son similares en ambos casos, con niveles finales

alrededor de 1,4-1,6 g/L, siendo ligeramente superiores en los cultivos realizados en agua minero-medicinal. Se ilustra por lo tanto la adecuación del medio de cultivo propuesto para la producción de enzimas lipolíticas extracelulares por microorganismos del género *Thermus* a pequeña escala, destacando la conveniencia de utilizar un agua minero-medicinal termal de elevado contenido en residuo seco para la preparación del medio.

Ejemplo 2

*Producción de enzimas con actividad lipolítica por *Thermus thermophilus* HB27 en reactor de tanque agitado, en modo discontinuo y continuo, con medios de cultivo preparados en distintos tipos de agua*

En este ejemplo se muestra la evolución del crecimiento celular y la producción de actividad lipolítica extracelular en cultivos de *Thermus thermophilus* HB27, llevados a cabo según el procedimiento descrito en un fermentador de 5 L de capacidad, equipado con un agitador mecánico de palas y de sistemas de control de temperatura y de entrada de aire estéril. A lo largo del tiempo de cultivo se han utilizado secuencialmente medios preparados de modo análogo a lo indicado en el Ejemplo 1, con dos tipos de agua (minero-medicinal termal descrita en la Tabla 1 y ultrapura de calidad Milli-Q).

Inicialmente, se introdujeron en el reactor 3 L de medio de cultivo preparado en agua minero-medicinal termal, que se inoculó con 90 mg (peso seco) de biomasa de *Thermus thermophilus* HB27 previamente preparada como en el ejemplo 1. El cultivo se incubó a una temperatura constante de 70°C, con una velocidad de agitación de 650 rpm, y un caudal de aire de 1 L/min.

Al cabo de 72 horas de cultivo, se inició el proceso en modo continuo, con introducción de una corriente continua de 1 L/día de medio de cultivo preparado en agua minero-medicinal termal y extracción del mismo caudal del contenido del reactor. Esto corresponde a un tiempo de residencia en el reactor (τ) de 72 horas.

El sistema se mantuvo en estas condiciones hasta las 312 horas de cultivo, momento en el cual se substituyó el medio de alimentación por otro preparado en agua ultrapura de calidad Milli-Q, conservando iguales el resto de condiciones (caudal de entrada y salida, agitación, aireación, temperatura). El proceso se monitorizó hasta las 504 horas de cultivo.

Durante todo el proceso se tomaron muestras periódicas del interior del reactor (periodo en modo discontinuo, entre 0 y 72 horas) o de la corriente de salida del reactor (periodo en modo continuo, a partir de 72 horas), para determinación de la concentración de biomasa y de actividad lipolítica extracelular.

En todos los casos, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 x g y 4°C, para separar la biomasa. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad enzimática, por medida de la hidrólisis de laurato de *p*-nitrofenilo a 65°C y pH 8,0 (Fuciños *et al.*, 2005). El residuo sólido, una vez lavado para eliminar los restos de medio de cultivo, se usó para determinar la biomasa gravimétricamente mediante pesada.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2, expresados en función de la evolución a lo largo del tiempo de la concentración de biomasa y la actividad lipolítica extracelular. Se indica mediante líneas de trazos los momentos de inicio de modo de operación en continuo, y de cambio de medio de cultivo de alimentación (medio preparado en agua minero-medicinal termal o ultrapura de calidad Milli-Q). De ellos se deduce la aptitud del procedimiento para el escalado de la producción de enzimas lipolíticas termofílicas, alcanzándose en modo discontinuo al cabo de 72 h de incubación niveles de actividad enzimática alrededor de 130 U/L y biomasa en torno a 1,2 g/L. Se obtienen, por tanto, valores similares a los detectados en cultivos a pequeña escala según lo descrito en el ejemplo 1, si bien se requieren tiempos más largos de cultivo. Como se indicó anteriormente, esto supone un nivel aceptable de producción, habida cuenta de los bajos niveles de expresión en la producción de enzimas encontrados habitualmente en microorganismos termófilos. Además, se demuestra la viabilidad del modo de operación en continuo para la producción de enzimas lipolíticas según el procedimiento descrito, manteniéndose niveles medios de actividad enzimática y biomasa en la corriente de salida del reactor en torno a 230 U/L y 1,4 g/L, respectivamente.

Por último, destaca el efecto derivado de la sustitución de la alimentación de medio de cultivo preparado en agua minero-medicinal termal por otro formulado en agua ultrapura de calidad Milli-Q. A partir del momento en que se lleva a cabo el cambio se observa una progresiva disminución en la biomasa, y especialmente en la actividad enzimática extracelular detectada en la corriente de salida del reactor. Estos resultados confirman lo indicado en el Ejemplo 1, relativo a la conveniencia de utilizar agua minero-medicinal termal para la preparación del medio de cultivo.

Ejemplo 3

Recuperación de las enzimas en el líquido extracelular

5 En este ejemplo se muestra el efecto de introducir etapas de congelación/descongelación previas a la separación de la biomasa de los cultivos, con objeto de aumentar el porcentaje de recuperación de las enzimas producidas.

10 Los microorganismos del género *Thermus* forman con frecuencia agrupaciones conocidas con el nombre de cuerpos multicelulares, consistentes en un número variable de células rodeadas por una membrana formada por la fusión de las membranas externas de cada célula (Becker y Starzyk, 1984). En el interior de estas estructuras puede acumularse una cierta cantidad de enzima, que no es posible recuperar en el líquido extracelular si la separación de la biomasa se lleva a cabo por simple centrifugación. La incorporación de etapas previas de congelación/descongelación induce la ruptura de las membranas que rodean a estos agregados, y por lo tanto la liberación de las enzimas re-

15 tenidas, manteniéndose prácticamente por completo la integridad de las células individuales. Suspensiones celulares procedentes de cultivos realizados de modo análogo a lo descrito en el Ejemplo 1 se sometieron a dos tipos de tratamiento. Por un lado, las suspensiones se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 x g y 4°C directamente tras la finalización del cultivo para separar la biomasa. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad enzimática extracelular, por medida de la hidrólisis de laurato de *p*-nitrofenilo a 65°C y pH 8,0 (Fuciños *et al.*, 2005).

20 Por otro lado, las suspensiones se congelaron a -40°C durante 24 h, tras lo cual se descongelaron a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 x g y 4°C, para separar la biomasa. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad enzimática, como en el caso anterior.

25 Los resultados obtenidos con muestras procedentes de cultivos de 24 h realizados en medios preparados con agua minero-medicinal termal y agua ultrapura de calidad Milli-Q se muestran en la Figura 3. Se puede observar cómo el proceso de congelación/descongelación conduce a un significativo aumento en la tasa de recuperación de enzima en el líquido extracelular, que se incrementa entre un 60 y un 150% en muestras procedentes de cultivos realizados en agua minero-medicinal termal y ultrapura de calidad Milli-Q, respectivamente.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 1

Características del agua minero-medicinal termal empleada en la preparación del medio de cultivo utilizado en los Ejemplos 1, 2 y 3

AGUA MINERO-MEDICINAL	
PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	
Conductividad, microohmios-cm ⁻¹	766
Residuo seco a 110°C, mg/L	649,20
pH	7,56
COMPOSICIÓN QUÍMICA	Concentración (mg/L)
Litio (Li ⁺)	1,140
Sodio (Na ⁺)	102,200
Potasio (K ⁺)	8,150
Rubidio (Rb ⁺)	0,163
Cesio (Cs ⁺)	107,870
Calcio (Ca ⁺²)	11,200
Magnesio (Mg ⁺²)	0,690
Estroncio (Sr ⁺²)	0,120
Hierro (Fe ⁺²)	0,010
Cobre (Cu ⁺²)	n.d
Cinc (Zn ⁺²)	0,110
Manganeso (Mn ⁺²)	n.d
Plomo (Pb ⁺²)	n.d
Cromo (Cr ⁺⁶)	n.d
Cadmio (Cd ⁺²)	n.d
Boro (B ⁺³)	1,240
Aluminio (Al ⁺³)	17,550
Cloruros (Cl ⁻)	25,000
Nitrógeno amoniacal (NH ₄ ⁺)	0,940
Sulfatos (SO ₄ ⁻²)	3,000
Fluor (F ⁻)	13,490
Sulfuros (S ⁻²)	0,020
Carbonatos (CO ₃ ⁻²)	0,000
Bicarbonatos (HCO ₃ ⁻)	462,000
Nitritos (NO ₂ ⁻)	0,032
Nitratos (NO ₃ ⁻)	0,330
Fosfatos (PO ₄ ⁻³)	0,580
Silice (SiO ₂)	71,800
Detergentes (LAS)	n.d
Oxígeno disuelto	1,900
Sulfuro de hidrogeno	0,000

n.d.: no detectado

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la obtención de enzimas termofílicas con actividad lipolítica procedentes de microorganismos del género *Thermus* consistente en el cultivo del microorganismo en un medio de crecimiento preparado con un agua termal minero-medicinal y la recuperación de la actividad mediante un procedimiento de congelación de los cultivos.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por el cultivo en agua minero-medicinal de microorganismos del género *Thermus* y la recuperación en el líquido extracelular de las enzimas lipolíticas producidas.

3. Un procedimiento según la reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** por la recuperación de las enzimas lipolíticas producidas en cultivo líquido mediante etapas secuenciales de congelación, descongelación y centrifugación.

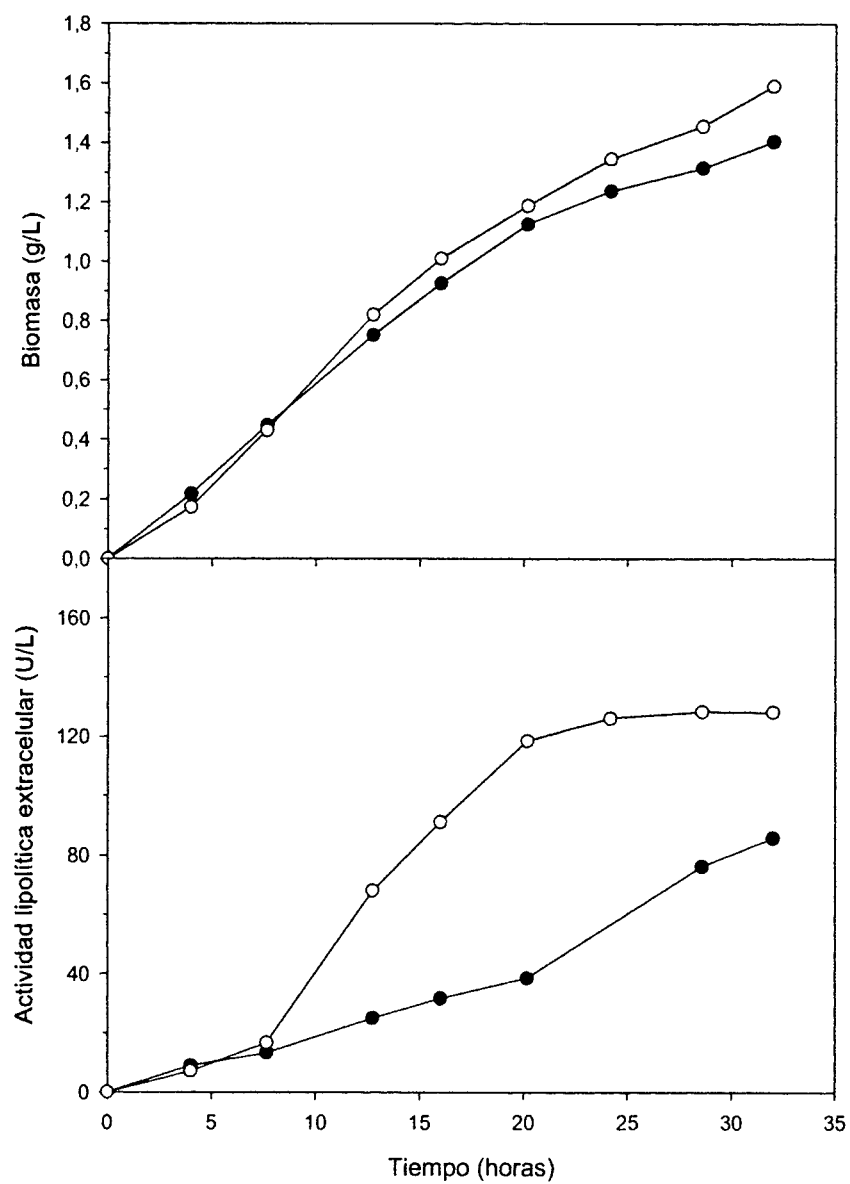


Figura 1

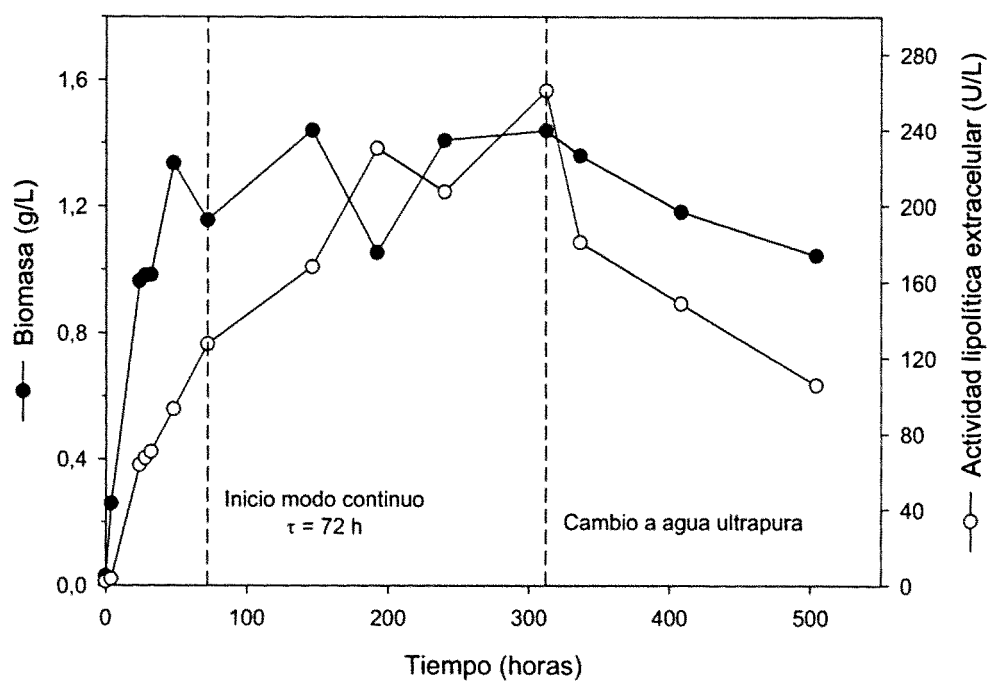


Figura 2

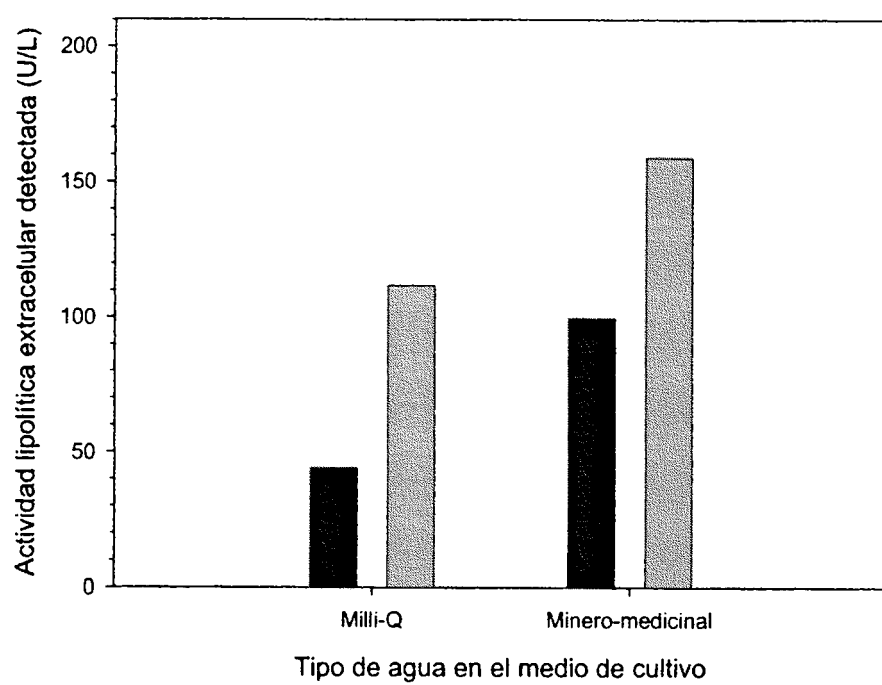


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 288 076

⑫ Nº de solicitud: 200501553

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **24.06.2005**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **C12N 9/20** (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FUCIÑOS, P. et al. Production of thermostable lipolytic activity by <i>Thermus</i> species. <i>Biotechnol. Prog.</i> , 20005, vol. 21, páginas 1198-1205.	1-3
A	GB 2189505 A (CAOLA KOZMETIKAI ES HAZTARTASVEGYIPARI VALLATAT) 28.10.1987, todo el documento.	1
A	US 5861295 A (GOLDSTEIN et al.) 19.01.1999, columna 1, línea 64 - columna 2, línea 50.	2,3
A	ALTINTAS, M.M. y ÜLGEN, K.O. Growth of <i>Thermus aquaticus</i> and its TaqI endonuclease production. <i>Acta Biotechnol.</i> , 1999, vol. 19, páginas 45-56.	
A	KADEMI A. et al. Effect of culture conditions on growth and esterase production by the moderate thermophile <i>Bacillus circulans</i> MAS2. <i>Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology</i> , 1992, vol. 23, páginas 188-193.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.11.2007

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/1