



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

① CH 654 025 A5

⑤ Int. Cl.: C 12 N 9/18
C 12 P 7/64
C 12 P 33/00

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

// C 12 R 1:025

⑫ FASCICOLO DEL BREVETTO A5

⑲ Numero della domanda: 4646/81

⑦ Titolare/Titolari:
ENI - Ente Nazionale Idrocarburi, Roma (IT)

⑳ Data di deposito: 15.07.1981

⑧ Inventore/Inventori:
Sacceddu, Pasquale, Monterotondo/Roma (IT)
Vitobello, Vicenza, Roma (IT)
Branduzzi, Paolo, Roma (IT)
Cimini, Nadia, Roma (IT)
Degen, Ludwig, Roma (IT)

㉑ Priorità: 24.07.1980 IT 23656/80

㉒ Brevetto rilasciato il: 31.01.1986

⑨ Mandatario:
Dr. A. R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

㉓ Fascicolo del
brevetto pubblicato il: 31.01.1986

⑤④ Procedimento per la produzione dell'enzima colesterolo-esterasi e per idrolisi degli esteri con acidi grassi del colesterolo mediante l'impiego dell'enzima stesso.

⑤⑦ L'enzima colesterolo esterasi è prodotto per coltivazione di un ceppo del tipo *Achromobacter delicatulus*, isolato da detriti vegetali ed identificato con la sigla NRRL B-12115. Nelle condizioni di coltura descritte, l'enzima è esocellulare, e non richiede pertanto l'estrazione dalle cellule. Il microorganismo ha inoltre un tempo di duplicazione inferiore a quello delle Muffe e degli Attinomiceti.

L'idrolisi degli esteri del colesterolo con acidi grassi può essere ottenuta aggiungendo gli stessi al terreno di coltura, prima dell'inoculo del ceppo.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione dell'enzima colesterolo-esterasi caratterizzato dal fatto che l'enzima viene prodotto coltivando un microorganismo del genere *Achromobacter delicatulus* contrassegnato col numero NRRL B-12115.

2. Procedimento per la produzione dell'enzima colesterolo-esterasi secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che la coltura del microorganismo è condotta ad un intervallo di pH compreso fra 6 e 8, preferibilmente fra 6,8 e 7,2.

3. Procedimento per la produzione dell'enzima colesterolo-esterasi secondo le rivendicazioni precedenti caratterizzato dal fatto che la coltura del microorganismo è condotta in un intervallo di temperatura compreso fra 20°C e 37°C, preferibilmente tra 28° e 32°C.

4. Procedimento per l'idrolisi di esteri con acidi grassi del colesterolo consistente nel mettere a contatto detti esteri con brodo-culture di un ceppo *Achromobacter delicatulus* NRRL B-12115.

La presente invenzione si riferisce ad un procedimento per la produzione dell'enzima colesterolo-esterasi (E.C.3.1.1.13), attraverso la coltivazione di un microorganismo del genere *Achromobacter*, ed all'idrolisi degli esteri con acidi grassi del colesterolo, mediante l'impiego dell'enzima stesso.

Il colesterolo, un essenziale componente dell'organismo umano, è un composto base nella costituzione delle membrane cellulari di tutti i tessuti e nella fabbricazione di numerosi ormoni.

Come è ben noto, la determinazione del colesterolo totale, presente nel sangue, è di grande importanza nella diagnosi clinica, e, poiché esso è presente nel siero principalmente in forma esterificata con acidi grassi, è necessario l'enzima colesterolo-esterasi per liberarlo e quindi determinarlo.

Solo poche pubblicazioni descrivono procedimenti enzimatici per l'idrolisi degli esteri del colesterolo utilizzando enzimi da microorganismi del genere *Fusarium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Streptomyces*, poiché l'enzima era ricavato da tessuti animali.

Si è ora trovato, ciò che costituisce l'oggetto della presente invenzione, un procedimento per la produzione dell'enzima colesterolo-esterasi da un nuovo microorganismo, da noi selezionato e appartenente al genere *Achromobacter*. Un importante vantaggio del procedimento secondo la presente invenzione è dato dal fatto che l'enzima prodotto da tale microorganismo, nelle condizioni di coltura sotto indicate, è esocellulare e quindi non è necessario estrarlo ma soltanto concentrarlo.

Inoltre tale microorganismo, come batterio, ha un tempo di duplicazione inferiore a quello delle Muffe e degli *Attinomiceti*, e ciò costituisce un significativo vantaggio operativo.

Questo microorganismo, isolato da detriti vegetali dell'argine del Tevere, è stato classificato come *Achromobacter delicatulus* SM-1307 ed è stato depositato il 19. 3. 1980 presso il Northern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture, Peoria (J11, USA) col numero NRRL. B.-12115.

Le sue caratteristiche colturali, morfologiche e fisiologiche sono riportate di seguito.

A - Caratteristiche colturali

1) Terreno solido:

a) Su Nutrient-Agar: colonie di 2 mm di diametro dopo 24 ore di incubazione a 30°C, con margini interi che tendono ad ondularsi dopo 7 gg. di invecchiamento. Colonie convesse, biancastre, di consistenza umido-cremosa, lievemente lucide. Nessuno sciamamento su terreni agarizzati.

b) Su Agar-Gelatina: colonie brillanti, molli, gelatinose.

2) Terreno liquido:

a) Su Brodo salino + Estratto di lievito: torbidità color crema con poco sedimento.

b) Su Acqua peptonata: buona torbidità dopo 24 ore a 30°C.

Non evidenti sedimento e pellicola superficiale.

B - Caratteristiche morfologiche

- 1) Bastoncello Gram-negativo di lunghezza media di 2 µm.
- 2) Mobilità positiva (osservazione a goccia pendente).
- 3) Ciglia peritriche. Non si osservano addensamenti ai poli.

C - Caratteristiche fisiologiche

- 1) Temperatura ottimale di crescita compresa fra 25° e 30°C. Cresce bene a 20°C. Nessuna crescita a 42°C.
- 2) Non attacca l'Agar.
- 3) Non produce acido né gas dal glucosio.
- 4) Non utilizza l'urea.
- 5) Non possiede citocromo-C ossidasi.
- 6) Riduce i nitrati a nitriti.
- 7) È inerte per il test OX/F.
- 8) Non produce indolo dal triptofano.
- 9) Rosso Metile negativo.
- 10) Catalisi positivo.
- 11) Non produce acido né gas dal lattosio.
- 12) Liquefa la gelatina.
- 13) Litmus Milk: Leggera acidificazione dopo 7 giorni.

Per l'identificazione sono state adottate le procedure indicate in «Methods of detection and identification of bacteria» di B.M. MITRUKA e M.J. BONNER, CRC PRESS INC. 1976 e nel «Bergey Manual of Determinative Bacteriology» 7a Edizione.

Le colture del ceppo secondo la presente invenzione, possono essere eseguite in condizioni aerobiche in coltura sommersa usando fermentatori agitati.

Un terreno di coltura liquido contiene una fonte di carbonio assimilabile, una fonte di azoto, nonché sali minerali. Come fonti di carbonio possono essere usati aminoacidi, glucosio, acido oleico, acido linoleico, esteri del colesterolo e acetato di sodio.

Come fonti di azoto possono essere usati composti di azoto organici ed inorganici, come estratto di carne, estratto di lievito, peptone, triptone, aminoacidi, idrolizzati di caseina, farina di soia, nitrati e sali di NH₄⁺.

Un terreno di coltura idoneo ha per esempio la seguente composizione:

Estratto di lievito	1-5 gr/l
Farina di Soia	1-5 gr/l
K ₂ HPO ₄	} Tracce fino a 1 gr/l
NaNO ₃ , MgSO ₄	

L'intervallo di pH per la coltura è compreso fra 6 e 8, preferibilmente tra 6,8 e 7,2; la temperatura tra 20°C e 37°C, preferibilmente tra 28°C e 32°C.

L'enzima viene prodotto con l'aggiunta al terreno di coltura, prima dell'inoculo, di colesteril oleato o di oli vegetali naturali. L'idrolisi di tali esteri nel terreno di coltura, ad opera della colesterolo-esterasi prodotta dal ceppo *Achromobacter delicatulus* SM 1307, costituisce un ulteriore oggetto della presente invenzione. Il tempo di induzione può variare da 24 h a 72 h, preferibilmente tra 40 h e 48 h.

La brodocoltura raccolta durante o alla fine della fermentazione può essere usata come tale.

In alternativa può essere usato il supernatante della brodocoltura filtrata o centrifugata.

Infine un ulteriore miglioramento tecnico ed economico può essere apportato immobilizzando l'enzima attraverso combinazione con composti macromolecolari, mediante formazione di legami chimici con la matrice, oppure legami di tipo ionico.

Gli esempi che seguono evidenziano altre modalità operative concernenti la presente invenzione, ma non sono limitanti di essa.

Esempio 1

Si preparava un brodo di coltura avente la seguente composizione:

NaNO ₃	2 gr/l
K ₂ HPO ₄	2 gr/l
KCl	0,5 gr/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 gr/l
Estratto di lievito	10 gr/l
colesteryl oleato	5 gr/l

aggiungendo i suddetti composti ad acqua deionizzata.

Il pH di tale brodo era portato a 7,0 con HCl diluito. Il terreno così preparato veniva distribuito in beute da 250 ml, aggiungendo 50 ml di brodo per beuta; si sterilizzava a 116°C per 30'.

Esse venivano inoculate con 1 ml di una sospensione del ceppo *Achromobacter delicatulus* SM-1307, ottenuta lavando con 10 ml di soluzione fisiologica la patina di una coltura di 20 ml di Nutrient agar in tubi da 200 × 20 mm, cresciuta per 48 h a 30°C.

Le beute di fermentazione venivano messe ad incubare sotto agitazione orbitale (180-200 r.p.m.) a 30°C.

A 48 h dall'inoculo, le brodoculture venivano raccolte e saggiate tal quali per l'attività enzimatica: 1 ml di brodocultura conteneva 0,2 unità di enzima.

L'attività enzimatica veniva determinata nel seguente modo:

— A 5 ml di una soluzione di colesteryl-oleato contenente 0,3 μmoli/ml in un tampone fosfato 0,1 M pH 6,7, contenente Triton X-100 allo 0,5%, veniva aggiunto 1 ml di brodocultura diluita opportunamente in tampone fosfato 0,1 M pH 6,7. La reazione veniva condotta a 37°C per 10 minuti in bagnomaria agitato e veniva bloccata mediante ebollizione per 3' dei campioni prelevati dalla miscela di reazione.

La concentrazione del colesterolo, prodotto dall'idrolisi del colesteryl oleato, veniva determinata col metodo colorimetrico: il colesterolo libero è ossidato dalla colesterolo ossidasi a colest-4-en-3-one con la produzione simultanea di acqua ossigenata, la quale reagisce ossidativamente con la 4-ammino antipirina e fenolo in presenza di perossidasi per sviluppare un cromogeno che presenta il massimo di assorbimento a 500 mμ.

La densità ottica dei campioni colorati veniva misurata in uno spettrofotometro Beckmann a reticolo tipo DB-GT, cammino ottico della cuvetta = 0,1 dm, alla lunghezza d'onda di 500 mμ.

Se definiamo come Unità quella quantità di enzima che produce 1 μmole di colesterolo al minimo nelle condizioni da saggio sopra citate, le unità di enzima per ml di brodocultura si ottengono con la seguente formula:

$$U = \frac{4 \times 6 \times (E_{10} - E_0)}{5,45 \times 0,1 \times D}$$

ml di brodo

dove:

E_{10} = densità ottica del campione prelevato a 10'.

E_0 = densità ottica del campione prelevato a 0'.

5,45 = densità ottica di una soluzione di colesterolo 1 μmole/ml.

D = diluizione enzima.

Esempio 2

Si preparava un brodo di coltura avente la seguente composizione:

NaNO ₃	2 gr/l
K ₂ HPO ₃	2 gr/l
K Cl	0,5 gr/l
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,5 gr/l
estratto di lievito	10 gr/l
olio di oliva	5 gr/l

aggiungendo i suddetti composti ad acqua deionizzata e portando a pH 6,7 con acido cloridrico.

Culture in tale brodo del ceppo *Achromobacter delicatulus* SM-1307, preparate come nell'esempio 1, venivano incubate sotto agitazione orbitale (180 r.p.m.) a 30°C. A 72 h dall'inoculo le brodoculture venivano raccolte e saggiate tal quali per l'attività colesterolo esterasica: 1 ml di brodocultura conteneva 0,4 unità di enzima.

Esempio 3

Si preparava un brodo di coltura avente la composizione dell'esempio 2.

Culture in tale brodo del ceppo *Achromobacter delicatulus* SM-1307, preparate come nell'esempio 1, venivano incubate sotto agitazione orbitale (180 r.p.m.) a 30°C.

A 72 h dall'inoculo le brodoculture venivano raccolte, centrifugate e la colesterolo esterasi del surnatante veniva utilizzata per dosare il colesterolo totale presente in un campione di siero di sangue umano.

Allo scopo veniva preparato il seguente reattivo:

Sodio colato	6 mM
Triton X-100	15 gr
Fenolo	7,5 mM
4 amino-antipirina	0,5 mM

perossidasi 16.400 U (Boehringer n° 127 361 di catalogo)

Tampone sodio fosfato 0,1M pH 7,0 1000 ml.

Il colesterolo veniva determinato nel seguente modo:

— A 2,5 ml di reattivo venivano aggiunti 50 μl di siero umano e 0,25 ml di brodocultura.

La reazione avveniva direttamente in cuvette di vetro con cammino ottico di 1 cm e lo sviluppo del cromogeno era seguito direttamente in uno spettrofotometro Beckmann a reticolo tipo DB-GT, alla lunghezza d'onda di 500 mμ fino alla trasformazione completa del colesterolo presente nel siero.

In tali condizioni si otteneva una densità ottica finale di 0,500 corrispondente a 164 mq di colesterolo totale per 100 ml di campione di siero umano saggiato.