



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00238**

(22) Data de depozit: **16.03.2010**

(41) Data publicării cererii:
30.12.2011 BOPI nr. **12/2011**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **AMALIA GHEORGHE TATIANA,
STR. VIZANTEA NR.18, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **JECU MARIA LUIZA,
STR. PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RĂUȚ IULIA, STR.BĂRAJUL BISTRIȚA
NR.12, BL.4, AP.54, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VOICU ANCA, STR. GEORGE FOLESCU
NR.26, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **LĂZĂROAIE MIHAELA MARILENA,
STR. CRINULUI NR.2024, BL.A4, SC.A,
ET.1, AP.7, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **ROSEANU-CONSTANTINESCU ANCA
MALINA, SOS PANTELIMON 74, BL. 411,
SC. 1, AP. 34, SECT. 2, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **CHELU FLORICA, DRUMUL TABEREI
NR.90, BL.C8, SC.A, ET.5, AP.19,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **FLORIAN PAULA, STR. VIITORULUI
NR.199, BL.42A, SC.1, ET.9, AP.27,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **STOICA ANCUȚA, STR. BOBÂLNA NR.3,
PLOIEȘTI, PH, RO;**
• **STROESCU MARTA, ȘOS. IANCOLUI
NR.29, BL.105B, SC.B, AP.65, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS BACTERIAN
CU ACTIVITATE ANTIFUNGICĂ**

(57) Rezumat:

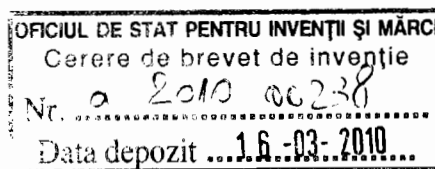
Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui produs bacterian cu activitate antifungică, din cultura de *Bacillus amylolicofaciens*, prin dezvoltarea inoculului cultivând tulpina microbiană pe un mediu conținând glucoză și săruri minerale, timp de 24...36 h, la 28...32°C, sub agitare la 160...200 rpm, obținerea culturii de bioproces prin cultivarea inoculului pe un mediu conținând glucoză și săruri minerale, timp de 72...120 h, la 28...32°C, sub agitare la 160...200 rpm, separarea biomasei bacteriene prin centrifugarea la

4000 rpm și la 4°C, ajustarea pH-ului supernatantului la 2,5...3,5, extragerea de două ori a acestuia cu acetat de etil, la un raport în volume supernatant : solvent de 1 : 2,5, evaporarea solventului la 40°C, timp de 20...30 min, solubilizarea rezidului în apă distilată și condiționarea metaboliților microbieni sub formă de emulsie prin încapsulare în particule de polimer natural.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





Titlul: Procedeu de obtinere a unui produs bacterian cu activitate antifungica

Rezumat: Invenția se refera la un procedeu de obtinere a unui produs bacterian cu activitate antifungica, cu microorganismul *Bacillus amylolichefaciens*. Procedeuul cuprinde fazele: dezvoltarea inoculului prin cultivarea tulpinii microbiene pe mediu ce contine glucoza si saruri minerale, la temperatura de 28-32^o C, timp de 24-36 de ore; cultivarea pe mediu cu saruri minerale si glucoza la temperatura de 28-32^o C, timp de 72-120 de ore, si agitare la 160-200 rpm; centrifugarea si retinerea supernatantului; ajustarea pH-ului la valoarea de 2.5-3.5; extractia repetata cu acetat de etil; reunirea extractelor si evaporarea solventului la 40^oC, timp de 20-30 minute; solubilizarea depozitului in apa distilata sterila; conditionarea metabolitilor microbieni sub forma de emulsie sau prin incapsulare in polimer natural. Produsul bacterian conditionat este eficient in inhibarea cresterii microbiene si producerii de micotoxine la tulpini de fungi filamentosi.

Revendicari: 1

Prezenta inventie se refera la un procedeu de obtinere a unui produs bacterian cu activitate antifungica, utilizabil in prevenirea cresterii si dezvoltarii fungilor toxigenici si implicit in inhibarea producerii de micotoxine.

Micotoxinele sunt metaboliți secundari produși de fungi filamentosi aparținând speciilor de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternariacare* care contamineaza cerealele si plantele de cultura. Datorita efectelor mutagene, cancerigene, imunosupresoare, consumul de alimente infestate cu micotoxine prezinta un risc major pentru sanatatea omului si animalelor domestice (Sweeney, M., J. si Dobson, A. D. W., 1998, Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, Internat. J. Food Microbiol., 43, 141-158; Cary, J. W., Calvo, A. M., 2008, Regulation of *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis, Toxin Rev., 27, 4, 347 – 370). Cele mai importante micotoxine sunt aflatoxinele, ocratoxina A, citrinina, fumonizina. Ochatoxina A este un metabolit produs de speciile de *Aspergillus* si *Penicillium*. Prezenta ei a fost detectata in cereale, cafea, fructe uscate, bere, vin. Citrinina este produsa de numeroase specii de *Penicillium* si contamineaza culturi de grau, orz, ovaz, orez si porumb. Ingerate zilnic prin alimente contaminate ambele micotoxine au efecte nefrotoxice.

Impactul asupra starii de sanatate a populatiei si economiei au condus la elaborarea unor strategii pentru eliminarea si/sau reducerea producerii de micotoxine si implicit a efectelor lor toxice. Dintre acestea controlul biologic bazat pe antagonismul patogen – agent biologic de origine microbiana, reprezinta o alternativa la procedeele care utilizeaza agenti chimici poluanti. Speciile de *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lichenformis*) sunt cunoscute drept cele mai bune producatoare de metaboliți care prin activitatea

lor antifungica au un rol esential in controlul biologic al infectiilor de la plante contaminate cu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* etc (Gheshlaghi, N., si Verdellen, J., Patent USA nr. 424 93, 2009; Patent USA nr. 6960342, Method for inhibiting pathogenic fungi in plants using *Bacillus amyloliquefaciens*, 2005)

In majoritatea cazurilor, metabolitii secretati sunt polipeptide care confera o rezistenta crescuta fata de actiunea hidrolitica a unor enzime proteolitice (aici ar trebui spus de unde provin enzimele) (Haggag, W., M. si Abdel-Latif A. M., H., 2007, Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control, World J. Agric. Sci., 3 (6), 771-776;)

În SUA si Canada se comercializează o serie de produse de origina microbiana ce actioneaza ca agenti de combatere a infectiilor fungice la plante, cereale, fructe si anume SERENADE Max din *Bacillus subtilis* QST713, SONATA din *Bacillus pumilus*, SUBTILEX din *Bacillus subtilis* MBI600.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia este aceea de a obtine un produs bacterian de la *Bacillus amylolichefaciens*, cu actiune eficienta de combatere a efectelor produse de patogeni la plante, cereale etc. Stabilitatea si eficienta produsului microbial sunt asigurate prin conditionarea sa sub forma de emulsie sau prin incapsulare in polimeri naturali, ce ofera o protectie impotriva degradarii compusului activ.

Prezenta inventie ofera urmatoarele avantaje:

- reducerea/inlocuirea produselor chimice, in general toxice
- reducerea poluarii apelor si solului produsa prin utilizarea fungicidelor chimice
- eliberare controlata si stabilitate marita asigurata prin conditionarea produsului microbial
- procedeul de obtinere este fezabil si nu necesita aparatura foarte complexa

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui produs bacterian cu activitate antifungica, cu microorganismul *Bacillus amylolichefaciens*. Procedeul cuprinde fazele: dezvoltare a inoculului prin cultivarea tulpinii microbiene pe mediu ce contine glucoza si saruri minerale, la temperatura de 28-32^o C, timp de 24-36 de ore; cultivare pe mediu cu saruri minerale si glucoza la temperatura de 28-32^o C, timp de 72-120 de ore cu agitare de 160-200 rpm; centrifugare la 4000 rpm si 4^o C si indepartarea depozitului de la centrifugare ; ajustare pH la valoarea de 2.5-3.5 ; extractie repetata cu acetat de etil (supernatant : solvent ; 1:2.5 vol/vol) ; reunire extracte si evaporare solvent la 40^oC, timp de 20-30 minute ; solubilizare depozit in apa distilata sterila ; conditionare metaboliti microbieni sub forma de emulsie sau prin incapsulare in polimeri naturali. Produsul microbial conditionat este eficient in inhibarea cresterii microbiene si producerii de micotoxine de catre tulpinile de fungi filamentosi.

Se prezinta in continuare doua exemple de realizare a inventiei:

Exemplul 1

1. Obținerea inoculului dintr-un mediu compus din următoarele ingrediente: peptona 10 g, glucoza 40 g, apa distilată 1000 ml, pH = 5,6-5,8.

Mediul de cultura se inoculează cu o suspensie de *Bacillus amylolichefaciens* în apa distilată sterilă. Cultura obținută după incubare la temperatura de 28-32^o C, timp de 24-36 de ore, sub agitare de 160-200 rpm. reprezintă cultura inocul.

2. Obținerea culturii de bioproces pe un mediu compus din următoarele ingrediente: peptona 10 g, glucoza 40 g, apa distilată 1000 ml, pH = 5,6-5,8. Inoculul mediului de bioproces a fost de 10%. Cultura se menține la temperatura de 28-32^o C, timp de 72-120 de ore, sub agitare de 160-200 rpm, în baloane Erlenmayer de 300 ml în care s-au repartizat 200 ml de mediu.

3. Separarea biomasei bacteriene prin centrifugare la 4000 rpm și 4^oC și îndepărtarea depozitului.

4. Ajustarea pH-ului supernatantului la valoarea de 2.5-3.5.

5. Extracție cu acetat de etil, în raport supernatant : solvent de 1:2.5 vol/vol. Retinerea stratului organic.

6. Re-extracția stratului apos cu acetat de etil, în raport supernatant apos : solvent de 1:2.5 vol/vol.

7. Reunirea celor două extracte în solvent organic și evaporare solvent la temperatura de 40^oC, timp de 20-30 minute.

8. Solubilizare depozitului de culoare maro-galbuie obținut de la evaporare în apa distilată sterilă.

9. Conditionare sub formă de emulsie în ulei de floarea soarelui și lecitina vegetală drept agent tensioactiv. Soluția de metabolit bacterian a fost sterilizată la 110^oC, timp de 20 min. Emulsia cu activitate biocidă s-a obținut prin amestecarea componentelor cu un agitator mecanic cu turatie de 1000 rpm, timp de 10-20 min. Proporția componentelor în emulsie a fost următoarea: 16 mL de ulei de floarea soarelui, 4 mL supernatant sterilizat și 0.5 g lecitina vegetală.

Produsul astfel condiționat are activitate antifungică manifestată față de tulpini de *Aspergillus niger* și *Penicillium sp.*. Testarea activității antifungice a fost realizată prin urmărirea efectului produsului bacterian asupra unor culturi fungice dezvoltate pe mediu solid și lichid. Testarea activității antifungice pe mediu solid s-a realizat prin metoda difuziei în agar. Zonele de inhibiție ale creșterii fungice au fost măsurate și activitatea antifungică a fost exprimată prin diferența dintre diametrul zonei de inhibiție și diametrul coloniei bacteriene. În culturile lichide, biomasa fungică obținută de la culturile de *Aspergillus niger* și *Penicillium sp* tratate cu soluție de metaboliți bacterieni a fost inhibată în proporție de 75-89%, iar producerea de ochratoxina A și cea de citrinina a fost inhibată în proporție de 65-92%. Determinarea micotoxinelor s-a efectuat prin metoda ELISA, folosind kit-uri specifice RidaScreen (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germania).

Efectul inhibitor al supernatantelor de la cultura bacteriana asupra tulpinilor fungice a fost pus in evidenta prin teste specifice biochimice. Astfel s-a demonstrat la nivel calitativ producerea de enzime din categoria proteazelor (lichefierea gelatinei urmarita prin metoda Frazier, tehnica filmului fotografic si hidroliza gelatinei), celulazelor (metoda cu hartie Whatman), reductazelor (reducerea colorantului albastru de metilen si reducerea nitratilor din mediu la nitriti), oxidazelor (actiunea asupra diclor tetra metil-p-fenilendiamina), catalazelor (actiunea asupra apei oxigenate), producerea unor metaboliți toxici pentru alte microorganisme de tipul H₂S și a amoniacului, producere de pigmenți difuzibili cu rol inhibitor (siderofori). Intensitatea reactiei de raspuns la aceste teste este un indiciu al activitatii antifungice a produsului microbial.

Exemplul 2

1. Obținerea inoculului dintr-un mediu compus din urmatoarele ingrediente: peptona 10 g, glucoza 40 g, apa distilata 1000 ml, pH = 5,6-5,8.

Mediul de cultura se inoculeaza cu o suspensie de *Bacillus amylolichefaciens* in apa distilata sterila. Cultura obtinuta dupa incubare la temperatura de 28-32° C, timp de 24-36 de ore, sub agitare de 160-200 rpm. reprezinta cultura inocul

2. Obținerea culturii de bioproces pe un mediu compus din urmatoarele ingrediente: peptona 10 g, glucoza 40 g, apa distilata 1000 ml, pH = 5,6-5,8. Inoculul mediului de bioproces a fost de 10%. Cultura se mentine la temperatura de 28-32° C, timp de 72-120 de ore, sub agitare de 160-200 rpm, in baloane Erlenmayer de 300 ml in care s-au repartizat 200 ml de mediu.

3. Separarea biomasei bacteriene prin centrifugare la 4000 rpm si 4°C si indepartarea depozitului.

4. Ajustarea pH-ului supernatantului la valoarea de 2.5-3.5.

5. Extractie cu acetat de etil, in raport supernatant : solvent de 1:2.5 vol/vol. Retinerea stratului organic.

6. Re-extractia stratului apos cu acetat de etil, in raport supernatant apos : solvent de 1:2.5 vol/vol.

7. Reunirea celor doua extracte in solvent organic si evaporare solvent la temperatura de 40°C, timp de 20-30 minute.

8. Solubilizare depozitului de culoare maro-galbui obtinut de la evaporare in apa distilata sterila.

9. Conditionarea supernatantului microbial prin incapsulare in polimeri naturali (agar). Concentratia de metaboliți microbieni a fost de 15% in solutia de agar 2%. Capsulele de agar s-au obtinut prin picurarea solutiilor de agar-metaboliți microbieni in ulei vegetal (de floarea soarelui) cu ajutorul unei seringi. Diametrul mediu al capsulelor obtinute a fost de 2.5 mm.

Produsul bacterian astfel conditionat are activitate antifungica manifestata fata de tulpini de *Aspergillus niger* si *Penicillium sp.*. Testarea activitatii antifungice a fost realizata prin urmarirea efectului produsului bacterian asupra unor culturi fungice pe mediu lichid. In prezenta metabolitilor bacterieni cantitatea de biomasa fungica obtinuta de la culturile de *Aspergillus niger* si *Penicillium sp.* a fost redusa in proportie de 60 - 85%, iar producerea de ochratoxina si

cea de citrinina au fost inhibitate in proportie de 53 - 92%. Determinarea micotoxinelor s-a efectuat prin metoda ELISA, folosind kit-uri specifice RedaScreen.

Revendicare

Procedeu de obtinere a unui **produs** bacterian cu activitate antifungica din cultura de *Bacillus amylolichefaciens* conform inventiei constand din urmatoarele etape: dezvoltarea inoculului prin cultivarea tulpinii microbiene pe mediu ce contine glucoza si saruri minerale, la temperatura de 28-32° C, timp de 24-36 de ore; cultivarea pe mediu cu saruri minerale si glucoza la temperatura de 28-32° C, timp de 72-120 de ore, agitare la 160-200 rpm; centrifugare si retinerea supernatantului; ajustarea pH la valoare de 2.5-3.5 ; extractie repetata cu acetat de etil; reunire extracte si evaporare solvent la 40°C, timp de 20-30 minute ; solubilizare depozit in apa distilata sterila ; conditionarea metabolitilor microbieni sub forma de emulsie si prin incapsulare in particule de polimer natural. Produsul bacterian astfel conditionat este eficient in inhibarea cresterii microbiene si producerii de micotoxine la tulpini de fungi filamentosi precum *Aspergillus sp.* si *Penicillium sp.*

Solicitanti:

Analia Gheorghe, Maria-Luiza Jecu, Iuliana Raut, Institutul National de Cercetare Dezvoltare pentru Chimie si Petrochimie – ICECHIM, Spl. Independentei 202, 060021, Bucuresti, tel/fax : 021.316.30.63, jecu.luiza@icechim.ro

Anca Voicu, Mihaela Marilena Lăzăroaie, Institutul de Biologie al Academiei Romane, Spl. Independentei nr. 296, 060031, tel/fax: 021.221.92.02/021.22.19.071, anca.voicu@ibiol.ro, mihaela.lazaroaie@ibiol.ro

Anca Malina Roseanu Constantinescu, Florica Chelú, Paula Florian, Institutul de Biochimie al Academiei Romane, Spl. Independentei nr. 296, 060031, tel/fax 021.223.90.69/68, roseanu@biochim.ro;

Anicuta Stoica, Marta Stroescu, Universitatea Politehnica, Spl. Independentei nr. 313, sector 6, 060042, tel/fax. 021-4029461/021.411.53.65, stoica.anicuta@gmail.com; marta_stroescu@yahoo.com

cea de citrinina au fost inhibitate in proportie de 53 - 92%. Determinarea micotoxinelor s-a efectuat prin metoda ELISA, folosind kit-uri specifice RedaScreen.

Revendicare

Procedeu de obtinere a unui **produs** bacterian cu activitate antifungica din cultura de *Bacillus amylolichefaciens* conform inventiei constand din urmatoarele etape: dezvoltarea inoculului prin cultivarea tulpinii microbiene pe mediu ce contine glucoza si saruri minerale, la temperatura de 28-32^o C, timp de 24-36 de ore; cultivarea pe mediu cu saruri minerale si glucoza la temperatura de 28-32^o C, timp de 72-120 de ore, agitare la 160-200 rpm; centrifugare si retinerea supernatantului; ajustarea pH la valoare de 2.5-3.5 ; extractie repetata cu acetat de etil; reunire extracte si evaporare solvent la 40^oC, timp de 20-30 minute ; solubilizare depozit in apa distilata sterila ; conditionarea metabolitilor microbieni sub forma de emulsie si prin incapsulare in particule de polimer natural. Produsul bacterian astfel conditionat este eficient in inhibarea cresterii microbiene si producerii de micotoxine la tulpini de fungi filamentosi precum *Aspergillus sp.* si *Penicillium sp.*

Solicitanti:

Amalia Gheorghe, Maria-Luiza Jecu, Iuliana Raut, Institutul National de Cercetare Dezvoltare pentru Chimie si Petrochimie – ICECHIM, Spl. Independentei 202, 060021, Bucuresti, tel/fax : 021.316.30.63, jecu.luiza@icechim.ro

Anca Voicu, Mihaela Marilena Lăzăroaie, Institutul de Biologie al Academiei Romane, Spl. Independentei nr. 296, 060031, tel/fax: 021.221.92.02/021.22.19.071, anca.voicu@ibiol.ro, mihaela.lazaroaie@ibiol.ro

Anca Malina Roseanu Constantinescu, Florica Chelu, Paula Florian, Institutul de Biochimie al Academiei Romane, Spl. Independentei nr. 296, 060031, tel/fax 021.223.90.69/68, roseanu@biochim.ro;

Anicuta Stoica, Marta Stroescu, Universitatea Politehnica, Spl. Independentei nr. 313, sector 6, 060042, tel/fax. 021-4029461/021.411.53.65, stoica.anicuta@gmail.com; marta_stroescu@yahoo.com