



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2017 00694**

(22) Data de depozit: **21/09/2017**

(41) Data publicării cererii:  
**29/03/2019** BOPI nr. **3/2019**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL DE CHIMIE  
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI"  
DIN IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ  
NR.41 A, IAȘI, IS, RO**

(72) Inventatori:  
• **PETROVICI ANCA-ROXANA,  
STR.STEJARULUI NR.7, SAT HORPAZ,  
COM.MIROSLAVA, IS, RO;**  
• **CIOLACU DIANA ELENA,  
ALEEA TRANDAFIRILOR NR.11, IAȘI, IS,  
RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A DEXTRANULUI  
PRIN FERMENTAȚIA TULPINII *WEISSELLA CONFUSA*  
*ICMPP29* ȘI COMPOZIȚIA MEDIULUI DE CULTURĂ**

(57) Rezumat:

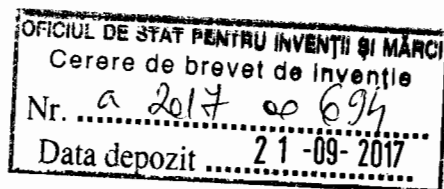
Invenția se referă la un procedeu biotehnologic de obținere a dextranului utilizat în industriile alimentară, farmaceutică și chimică. Procedeu conform invenției constă în aceea că se izolează și se purifică o tulpină de bacterie lactică din iaurt comercial, pe mediul de cultură Man Rogosa Sharpe (MRS), agar suplimentat cu 1% carbonat de calciu, fiind identificată prin analize moleculare ca fiind *Weissella confusa ICMPP29*, care se cultivă în 3 medii de cultură diferite: MRS

suplimentat cu glucoză și fructoză, dizolvate în apă bidistilată; MRS și sucroză dizolvate în apă bidistilată, precum și MRS și sucroză dizolvate în lapte UHT, apoi se inoculează cu 30% inocul proaspăt de 24 h, se incubează 48 h la 33°C, după care se supun inactivării enzimatică, iar la final dextranul se extrage, se purifică și se usucă prin liofilizare.

Revendicări: 5



89  
30



## Procedeu de obținere a dextranului prin fermentația tulpinii *Weissella confusa* ICMPP29 și compoziția mediului de cultură

*Weissella* face parte din genul de bacterii heterofermentative care produc acid lactic, aparținând familiei *Leuconostocaceae*. Genul conține 19 specii (*W. beninensis*, *W. ceti*, *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. diestrammenae*, *W. fabalis*, *W. fabaria*, *W. ghanensis*, *W. halotolerans*, *W. hellinica*, *W. kandleri*, *W. koreensis*, *W. minor*, *W. oryzae*, *W. paramesenteroides*, *W. soli*, *W. thailandensis*, *W. Uvarum*, *W. viridescens*), 5 dintre ele fiind reclasificate din genul *Lactobacillus* și anume, *W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. viridescens*, iar una din genul *Leuconostoc* și anume *W. paramesenteroides*.

Unele specii bacteriene joacă un rol important în industria alimentară, și anume, în fermentația și conservarea alimentelor, în timp ce despre alte specii se presupune că sunt implicate în apariția infecțiilor umane. Anumite specii au fost raportate că produc șase substanțe bacteriocide, dintre care menționăm: **weissellin A** (*W. paramesenteroides*), **weissellicin 110** (*W. cibaria*) și **weissellicin D, L, M, și Y** (*W. hellinica*). Sursele din care se pot izola tulpinile de



*Stico*  
*Ioly*

24

*Weissella* sunt foarte variate (E. Kim, Y. Cho, Y. Lee, S.-K. Han, C.-G. Kim, D.-W. Choo, Y.-R. Kim, H.-Y. Kim, „A proteomic approach for rapid identification of *Weissella* species isolated from Korean fermented foods on MALDI-TOF MS supplemented with an in-house database”, *Int. J. Food Microbiol.*, 243, 9–15, 2017).

Deoarece genul *Weissella* face parte din clasa bacteriilor lactice (LAB), acestea sunt recunoscute ca fiind sigure pentru organismul uman, aducând multe beneficii în sănătatea consumatorilor, având mai ales proprietăți imunostimulatoare și antibacteriene. LAB sunt microorganisme capabile de a transforma, prin biosinteză, zaharurile fermentabile în exopolizaharide (EPZ) funcționale, cu utilizare ulterioară în industria alimentară și farmaceutică (A. Laws, Y. Gu, V. Marshall, „Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria”, *Biotechnol. Adv.*, 19, 597–625, 2001). LAB pot produce o gamă largă de EPZ, în funcție de tipul bacteriei și de substratul utilizat. Un astfel de exemplu este biosinteza dextranului în urma fermentării tulpinii *Weissella confusa* Cab3 în mediu ce conține MRS suplimentat cu 2% sucroză (S. Shukla, Q. Shi, N. H. Maina, M. Juvonen, M. Tenkanen, A. Goyal, „*Weissella confusa* Cab3 dextransucrase: Properties and *in vitro* synthesis of dextran and glucooligosaccharides”, *Carbohydr. Polym.*, 101, 554–564, 2014) și biosinteza galactanului 100% liniar de către tulpina *Weissella confusa* KR780676 în alimentele fermentate (P. B. Devi, D. Kavitate, P. H. Shetty, „Physico-chemical characterization of galactan exopolysaccharide produced by *Weissella confusa* KR780676”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 93, 822–828, 2016).

EPZ de origine microbiană se împart în homopolizaharide (de ex., dextran, pullulan, levan și curdlan) și heteropolizaharide (ca de ex., gellan și xantan). De asemenea, EPZ de origine microbiană pot exista în două forme: (i) sunt aderente la suprafața bacteriană și atunci sunt numite EPZ încapsulate, sau (ii) sunt eliberate în mediul de cultură ca EPZ libere. Factorii care determină cantitatea și tipul de EPZ sintetizată de o bacterie lactică sunt compoziția mediului de cultură (dintre care cele mai importante sunt sursa de carbon, de azot, vitaminele și mineralele), precum și condițiile de fermentație (temperatura, agitarea, timpul de incubare și pH-ul).

Industria alimentară este într-o continuă căutare de noi ingrediente alimentare cu scopul de a îmbunătăți textura și gustul produselor alimentare, într-o aceeași măsură ca și îmbunătățirea stării de sănătate a consumatorilor.

Tuc  
D.G.

Cercetările recente au arătat un interes tot mai crescut pentru obținerea unui nou polizaharid, cu costuri reduse și potențial de aplicare în industria alimentară, în industria farmaceutică și cea chimică.

LAB sunt utilizate de sute de ani în obținerea maielilor folosite în prepararea produselor de panificație cu aluat fermentat. Astfel, invenția **RO 126627 A0** prezintă o tehnologie de obținere a aluatului acid uscat, preparat din făină de secară, utilizând culturi inițiale mixte de bacterii lactice. Invenția **RO 126739 A0** demonstrează faptul că utilizarea aluatului acid conduce la reducerea conținutului de micotoxine din produsele de panificație, astfel fiind mai sigure pentru consumul alimentar. În invenția **RO 126627 B1** s-au folosit amestecuri de bacterii lactice pentru îmbunătățirea calității produselor de panificație.

Polizaharidele obținute în urma fermentației LAB au numeroase aplicații tehnologice dintre care enumerăm:

- utilizarea în prepararea vaccinurilor multivalente antimeningococice, unde sunt folosite sub formă de conjugate polizaharid-proteină, conform invenției **EP 1355673 B1**;
- în produse cu acțiune anti-ulceroasă, conform invenției **RO 12176 B1**;
- utilizarea în componența vitrigelurilor sterilizabile cu aplicații biomedicale, conform patentului **RO 127487 A2**;
- în realizarea materialelor poroase cu scopul de a stimula regenerarea cartilajelor, conform invenției **RO 127486 A0**.

Dintre polizaharidele cu origine bacteriană, dextranul este cea mai importantă formă, produsă la nivel industrial de bacterii lactice din genul *Leuconostoc* ca de exemplu, *L. mesenteroides* și *L. mextranicum*. Conform invenției **US 2.775.540**, dextranul a fost obținut industrial printr-un procedeu îmbunătățit din fermentarea tulpinilor de *L. mesenteroides* și *L. mextranicum* pe substrat ce conține sucroză. Conform invenției **US 2.972.567**, substratul de carbon reprezentat de sucroză este metabolizat în prezența dextran sucrazei și utilizat în biosinteza dextranului.

Dextranul este folosit ca agent antitrombotic (reduce vâscozitatea sângelui), ca agent de mărire a volumului sangvin, ca agent în inducerea stresului osmotic în culturile celulare, ca și component majoritar în confecționarea matricilor cromatografice, în imobilizarea unor biosenzori, ca înveliș de stabilizare a nanoparticulelor împiedicând oxidarea și măbind gradul de



*[Handwritten signature]*  
*[Handwritten signature]*

biocompatibilitate ale acestora, sau în realizarea de microtransportori în industria culturilor celulare, după cum se evidențiază în următoarele brevete:

- în brevetul **RO 126253 A0**, dextranul este folosit în componența unor filme utilizate în obținerea unor semiconductori oxidici magnetici;
- brevetul **RO 108218 B1** prezintă un procedeu de conservare a eritrocitelor stabilizate în care se folosește o soluție 6% dextran 40;
- în brevetul **EP 2874600 B1** dextranul este utilizat în compoziția medicamentelor anti-inflamatoare;
- dextranul funcționalizat este utilizat ca schimbători de ioni în procedeu de obținere și separare a urezei din semințe de *Citrullus vulgaris*, conform brevetului **RO 116210 B**;
- în brevetul **RO 129431 A2**, este prezent un sistem de eliberare controlată de medicamente pe bază de dextran.

În urma studierii datelor de literatură, s-a stabilit că un dezavantaj în biosinteza dextranului este modalitatea de purificare a acestuia, dat fiind faptul că exopolizaharidele pot lega proteine, aminoacizi și minerale aflate în componența mediului de cultură. Un alt dezavantaj este necesitatea utilizării în mediul de cultură al LAB a unui număr mare de componente care să asigure o creștere accentuată, continuă și într-o cantitate rentabilă, din punct de vedere practic, a produsului dorit.

Problema tehnică propusă spre rezolvare de prezenta cerere constă în stabilirea unui procedeu biotehnic de obținere a dextranului prin fermentația tulpinii lactice *Weissella confusa* ICMPP29, izolată și purificată din iaurt comercial în laboratoarele Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, prin utilizarea a trei medii de cultură cu compoziții diferite.

Procedeu biotehnic de obținere a dextranului prin fermentarea tulpinii de *Weissella confusa* ICMPP29, conform invenției, constă în aceea că, se izolează și se purifică o tulpină de bacterie lactică din iaurt comercial pe mediu de cultură Man Rogosa Sharpe (MRS) agar suplimentat cu 1% CaCO<sub>3</sub>, care mai apoi se identifică prin analize moleculare ca fiind *Weissella confusa*, se dizolvă părțile componente ale mediilor de cultură, după care se sterilizează la 110°C, timp de 30 minute și apoi se inoculează cu 30% inocul proaspăt de 24 h, cu o absorbantă de 0,5 la 600 nm, pentru ca să avem în mediile de cultură 4-6x10<sup>8</sup> UFC, la timpul 0, apoi se incubează 48 h la 33°C, fără controlul pH-ului, în condiții statice și dinamice (100 rpm), după



care se supune inactivării enzimatică la 100°C, pentru 15 minute, extracției și purificării de dextran și la final, uscării prin liofilizare.

Pentru a nu dilua mediul de cultură experimental, volumul de inocul pentru 100 mL mediu de cultură experimental se calculează după formula  $V_{100\text{mL}} = X/(A_{\text{inocul}}/0,5)$  unde  $V_{100\text{mL}}$  - volumul de inocul necesar pentru a inocula 100 mL mediu de cultură experimental cu 30% inocul având la final o absorbantă de 0,5 citită la 600 nm; X- procentul inoculului din mediul de cultură experimental ( $X = 30\%$ );  $A_{\text{inocul}}$  - absorbanta inoculului fermentat, citită la 600 nm; 0,5 - absorbanta finală a mediului de cultură experimental.

Procedeeul, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- în componența mediului de cultură se folosesc componente puține și ieftine;
- mediul de cultură experimental nu se diluează cu inocul, deoarece acesta se calculează direct, după formula prezentată mai sus [ $V_{100\text{mL}} = X/(A_{\text{inocul}}/0,5)$ ];
- timpul unei fermentații lactice este de numai 48 de ore, mult mai scurt decât în alte cazuri;
- EPZ-ul (dextran) obținut la finalul fermentației prezintă o puritate ridicată și într-o cantitate însemnată (de 25,2 g dextran liofilizat /L mediu de cultură).

Pentru obținerea dextranului din invenție, s-au testat trei medii de cultură ce prezintă compoziții diferite, precum și două condiții de fermentare: condiții statice și condiții dinamice (100 rpm). Mediile de cultură folosite pentru fermentările experimentale au fost notate MDI, MDII și MDIII.

În continuare se dau trei exemple de realizare a invenției, cu referire la datele prezentate în Tabelul 1:

### Exemplul 1.

Compoziția mediului de cultură notat MDI, constă în 55,3 g/L MRS, 40 g/L fructoză, 40 g/L glucoză, dizolvate în apă bi-distilată.

Mediul de cultură experimental astfel preparat, se sterilizează la 110°C, timp de 30 minute. Separat se prepară un inocul proaspăt de 24 de ore din *Weissella confusa* ICMPP29, în mediul MRS dizolvat în apă bi-distilată, iar din acesta se inoculează mediul de cultură experimental cu 30% inocul cu o absorbantă de 0,5 citită la 600 nm.



Dimensiunea inoculului a fost determinată prin realizarea diluțiilor succesive din mediul de cultură experimental inoculat la timpul 0, urmat de incubarea și numărarea coloniilor formate în plăcile inoculate cu diluția de  $10^{-8}$ . S-a stabilit astfel că mediul experimental final prezintă un număr de celule, unități formatoare de colonii (UFC) de  $4-6 \times 10^8$ . Pentru a nu dilua mediul de cultură experimental, volumul de inocul pentru 100 mL mediu experimental se calculează după formula  $V_{100\text{mL}} = X/(A_{\text{inocul}}/0,5)$  unde:  $V_{100\text{mL}}$  reprezintă volumul de inocul necesar pentru a inocula 100 mL mediu de cultură experimental cu 30% inocul având la final o absorbantă de 0,5 citită la 600 nm; X reprezintă procentul inoculului din mediul de cultură experimental (X = 30%);  $A_{\text{inocul}}$  reprezintă absorbanta inoculului fermentat citită la 600 nm; 0,5 reprezintă absorbanta finală a mediului de cultură experimental.

Fermentația se realizează timp de 48 de ore la  $33^{\circ}\text{C}$ , fără controlul pH-ului, în condiții statice și dinamice (100 rpm). După finalizarea fermentației, mediile se supun inactivării enzimatică la  $100^{\circ}\text{C}$ , pentru 15 minute, pentru a se evita distrugerea polimerului biosintetizat de către echipamentul enzimatic prezent în mediu. După inactivarea și răcirea probelor, acestea se prelucrează în scopul extracției și purificării dextranului. După purificare, dextranul este uscat prin liofilizare și evaluat gravimetric.

Cantitatea de dextran obținută în urma fermentării mediului de cultură notat MDI, în condiții statice și dinamice este prezentată în Tabelul 1. În cazul mediului de cultură MDI, în condiții statice, cantitatea de biopolimer nu a putut fi evaluată, aceasta fiind obținută în cantitate mică și probabil a coprecipitat în timpul procesului de separare a proteinelor din mediul de cultură. În condiții dinamice, la o agitare de 100 rpm, cantitatea de biopolimer obținută este de 2,8 g/L.

### Exemplul 2.

Se procedează ca în Exemplul 1, respectând aceeași parametri de lucru, cu excepția compoziției mediului de cultură, notat MDII, ce constă în 55,3 g/L MRS și 80 g/L sucroză dizolvate în apă bi-distilată.

După cum se poate observa din datele prezentate în Tabelul 1, în mediul de cultură MDII în condiții statice, cantitatea de biopolimer nu a putut fi evaluată, o posibilă explicație fiind prezentată în Exemplul 1. În condiții dinamice, la o agitare de 100 rpm, cantitatea de biopolimer obținută este de 5,18 g/L. De menționat că în urma fermentației, s-a obținut o cantitate mai



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'D. S. G.'.

ridicată față de Exemplul 1, datorită prezenței sucrozei, care activează biosinteza și astfel, se eliberează o cantitate mai ridicată de dextran sucraza în mediu, enzimă care participă activ la biosinteza macromoleculelor de dextran.

### Exemplul 3.

Se procedează ca în Exemplul 1, respectând aceeași parametri de lucru, cu excepția compoziției mediului de cultură, notat MDIII, ce constă în 55,3 g/L MRS și 80 g/L sucroză dizolvate în lapte UHT cu următoarele caracteristici: valoare energetică de 44 kcal/100mL și valori medii nutriționale/100 mL: 3 g proteine, 1,5 g grăsimi (din care 0,9 g acizi grași saturați), 4,5 g zaharuri și 120 mg calciu.

Cantitățile de dextran obținute în urma fermentării mediului de cultură notat MDIII, în condiții statice și dinamice, sunt prezentate în Tabelul 1. Se observă că în cazul mediului de cultură MDIII, în care s-a folosit mediu MRS și sucroză dizolvate în lapte UHT s-au obținut cele mai mari cantități de dextran. În condiții statice de fermentare, s-a obținut o cantitate de 25,2 g/L dextran, în timp ce în condiții dinamice (la o agitare de 100 rpm), s-a obținut o cantitate de 17,4 g/L dextran.

Tabel 1. Analiza gravimetrică a dextranului obținut în urma fermentărilor experimentale.

Condițiile de fermentare	EPZ - MDI, g/L	EPZ- MDII, g/L	EPZ- MDIII, g/L
Fermentație statică	-	-	25,2
Fermentație dinamică	2,8	5,18	17,4



*Alaco*  
*Doly*



### Revendicări

1. Procedeu biotehnologic de obținere a dextranului prin fermentarea tulpinii de *Weissella confusa* ICMPP29, caracterizat prin aceea că, se izolează și se purifică o tulpină de bacterie lactică din iaurt comercial pe mediu de cultură Man Rogosa Sharpe (MRS) agar suplimentat cu 1% CaCO<sub>3</sub>, care mai apoi se identifică prin analize moleculare ca fiind *Weissella confusa*, aceasta se cultivă în mediu de cultură care se sterilizează la 110°C, timp de 30 minute și apoi se inoculează cu 30% inocul proaspăt de 24 h, cu o absorbantă de 0,5 la 600 nm, pentru ca să avem în mediile de cultură experimentale 4-6x10<sup>8</sup> UFC la timpul 0, apoi se incubează 48 h la 33°C, fără controlul pH-ului, în condiții statice și dinamice (100 rpm), după care se supune inactivării enzimatică la 100°C, pentru 15 minute, se supune extracției și purificării de dextran și la final, uscării prin liofilizare.
2. Compoziția mediului de cultură MDI prin dizolvarea a 55,3 g/L MRS, 40 g/L fructoză și 40 g/L glucoză, în apă bi-distilată.
3. Compoziția mediului de cultură MDII prin dizolvarea a 55,3 g/L MRS și 80 g/L sucroză în apă bi-distilată.
4. Compoziția mediului de cultură MDIII prin dizolvarea a 55,3 g/L MRS și 80 g/L sucroză dizolvate în lapte UHT.
5. Pentru a nu dilua mediul de cultură experimental, volumul de inocul pentru 100 mL mediu de cultură experimental se calculează după formula  $V_{100\text{mL}} = X/(A_{\text{inocul}}/0,5)$  unde  $V_{100\text{mL}}$  - volumul de inocul necesar pentru a inocula 100 mL mediu de cultură experimental cu 30% inocul având la final o absorbantă de 0,5 citită la 600 nm; X- procentul inoculului din mediul de cultură experimental (X = 30%);  $A_{\text{inocul}}$  - absorbantă inoculului fermentat, citită la 600 nm; 0,5 - absorbantă finală a mediului de cultură experiment



*Adrian  
Ily*