



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2024** BOPI nr. **5/2024**

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

(73) Titular:  
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**EP 0881283 A1; K. KATINA, N.H. MAINA,  
R. JUVONEAN, L. FLANDER, L.  
JOHANSSON, L. VIRKKI, M. TENKANEN,  
A. LAITILA, "IN SITU PRODUCTION AND  
ANALYSIS OF WEISSELLA CONFUSA  
DEXTRAN IN WHEAT SOURDOUGH", 2009**

(54) **PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE OBTINERE  
A DEXTRANULUI PRIN FERMENTAREA TULPINII  
WEISSELLA CONFUSA ICMPP29**



# RO 133177 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a dextranului prin fermentarea  
tulpinii de *Weissella confusa* și la compoziția mediului de cultură utilizat în procedeu.

3 *Weissella* face parte din genul de bacterii heterofermentative care produc acid lactic,  
aparținând familiei *Leuconostocaceae*. Genul conține 19 specii (*W. beninensis*, *W. ceti*,  
5 *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. diestrammenae*, *W. fabalis*, *W. fabaria*, *W. ghanensis*,  
*W. halotolerans*, *W. hellinica*, *W. kandleri*, *W. koreensis*, *W. minor*, *W. oryzae*,  
7 *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*,  
9 *W. minor*, *W. viridescens*, iar una din genul *Leuconostoc* și anume *W. paramesenteroides*.

11 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  
13 substanțe bactericide, dintre care menționăm: weissellin A (*W. paramesenteroides*),  
weissellicin 110 (*W. cibaria*) și weissellicin D, L, M, și Y (*W. hellinica*). Sursele din care se  
15 pot izola tulpinile de *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  
17 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).

19 Deoarece genul *Weissella* face parte din clasa bacteriilor lactice (LAB), acestea sunt  
recunoscute ca fiind sigure pentru organismul uman, aducând multe beneficii în sănătatea  
21 consumatorilor, având mai ales proprietăți imunostimulatoare și anti bacteriene. LAB sunt  
microorganisme capabile de a transforma, prin biosinteză, zaharurile fermentabile în exopoli-  
23 zaharide (EPZ) funcționale, cu utilizare ulterioară în industria alimentară și farmaceutică (A.  
Laws, Y. Gu, V. Marshall, „**Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial  
25 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.  
27 Un astfel de exemplu este biosinteză dextranului în urma fermentării tulpinii *Weissella  
confusa* Cab3 în mediul ce conține MRS suplimentat cu 2% sucroză (S. Shukla, Q. Shi, N.  
29 H. Maina, M. Juvonen, M. Tenkanen, A. Goyal, „**Weissella confusa Cab3  
dextranuclease: Properties and in vitro synthesis of dextran and  
31 glucooligosaccharides**”, *Carbohydr. Polym.*, **101**, 554- 564, 2014) și biosinteza galactan-  
ului 100% liniar de către tulpina *Weissella confusa* KR780676 în alimentele fermentate (P.  
33 B. Devi, D. Kavitate, P. H. Shetty, „**Physico-chemical characterization of galactan  
exopolysaccharide produced by Weissella confusa KR 780676**”, *Int. J. Biol. Macromol.*,  
35 **93**, 822-828, 2016).

37 EPZ de origine microbiană se împart în homopolizaharide (de exemplu, dextran,  
pullulan, levan și curdlan) și heteropolizaharide (ca de exemplu, gellan și xantan). De  
asemenea, EPZ de origine microbiană pot exista în două forme: (i) sunt aderate la suprafața  
39 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  
41 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,  
43 agitarea, timpul de incubare și pH-ul).

45 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.

# RO 133177 B1

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.	1 3
LAB sunt utilizate de sute de ani în obținerea maielilor folosite în prepararea produselor de panificație cu aluat fermentat. Astfel, cererea de brevet <b>RO 126627 A0</b> prezintă o tehnologie de obținere a aluatului acid uscat, preparat din făină de seară, utilizând culturi inițiale mixte de bacterii lactice. Cererea de brevet <b>RO 126739 A0</b> 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 <b>RO 126627 B1</b> s-au folosit amestecuri de bacterii lactice pentru îmbunătățirea calității produselor de panificație.	5 7 9 11
Polizaharidele obținute în urma fermentației LAB au numeroase aplicații tehnologice dintre care enumerăm:	13
- utilizarea în prepararea vaccinurilor multivalente antimeningococice, unde sunt folosite sub formă de conjugate polizaharid-proteină, conform invenției <b>EP 1355673 B1</b> ; în produse cu acțiune anti-ulceroasă, conform invenției <b>RO 12176 B1</b> ;	15
- utilizarea în componența vitrigelurilor sterilizabile cu aplicații biomedicale, conform cererii de brevet <b>RO 127487 A2</b> ;	17
- în realizarea materialelor poroase cu scopul de a stimula regenerarea cartilajelor, conform cererii de brevet <b>RO 127486 A0</b> .	19
Dintre polizaharidele cu origine bacteriană, dextranul este cea mai importantă formă, produsă la nivel industrial de bacterii lactice din genul <i>Leuconostoc</i> ca de exemplu, <i>L. mesenteroides</i> și <i>L. mextranicum</i> . Conform invenției <b>US 2775540</b> , dextranul a fost obținut industrial printr-un procedeu îmbunătățit din fermentarea tulpinilor de <i>L. mesenteroides</i> și <i>L. mextranicum</i> pe substrat ce conține sucroză. Conform invenției <b>US 2972567</b> , substratul de carbon reprezentat de sucroză este metabolizat în prezența dextran sucrazei și utilizat în biosinteza dextranului.	21 23 25 27
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 nanoparticolelor împiedicând oxidarea și măbind gradul de biocompatibilitate ale acestora, sau în realizarea de microtransportori în industria culturilor celulare, după cum se evidențiază în următoarele brevete:	29 31 33
- în cererea de brevet <b>RO 126253 A0</b> , dextranul este folosit în componența unor filme utilizate în obținerea unor semiconductori oxidici magnetici;	35
- brevetul <b>RO 108218 B1</b> prezintă un procedeu de conservare a eritrocitelor stabilizate în care se folosește o soluție 6% dextran 40;	37
- în brevetul <b>EP 2874600 B1</b> dextranul este utilizat în compoziția medicamentelor antiinflamatoare;	39
- dextranul funcționalizat este utilizat ca schimbători de ioni în procedeu de obținere și separare a ureazei din semințe de <i>Citrullus vulgaris</i> , conform brevetului <b>RO 116210 B</b> ;	41
- în cererea de brevet <b>RO 129431 A2</b> , este prezent un sistem de eliberare controlată de medicamente pe bază de dextran.	43
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.	45 47 49

# RO 133177 B1

1           **EP 0881283 A1** se referă la o tulpină bacteriană care produce dextran, la un pro-  
cedeu de obținere a dextranului, la un procedeu derealizare a unui aditiv care conține o  
3           enzimă implicată în biosinteza dextranului și la utilizarea acestui dextran. Tulpina bacteriană  
utilizată în procedeu este *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* și este depusă la CNCM  
5           sub numerele CNMCI-1692 sau CNCM I-1693. În procedeu de producere a dextranului,  
mediul de cultură care conține zaharoză este inoculat cu o precultură a unei tulpini  
7           *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* și CNCM I-1692 sau CNCM I-1693, este lăsat să  
fermenteze la 25-35°C timp de 10-20 ore, pH-ul culturii rezultate este apoi scăzut la 5-5,5  
9           înainte de depozitare la 0-10°C timp de 16-48.

În articolul "***In situ production and analysis of Weissella confusa dextran in***  
11           ***wheat sourdough***", **K. Katina, N. H. Maina, R. Juvonen, L. Flander, L. Johansson, L.**  
**Virkki, M. Tenkanen, A. Laitila**, se prezintă un studiu în care au fost investigate creșterea,  
13           activitatea și producția *in situ* de dextran de către *Weissella confusa* VTT E-90392 în  
aluaturile de grâu. Mai multe bacterii lactice aparținând genurilor *Leuconostoc*, *Lactobacillus*  
15           și *Weissella* au fost introduse în coacerea grâului pentru producerea *in situ* de exopoli-  
zaharide. Producția *in situ* de exopolizaharide în timpul fermentației aluatului este provocată  
17           de acidificarea simultană din cauza activităților metabolice ale bacteriilor, care poate diminua  
semnificativ impactul tehnologic pozitiv al exopolizaharidelor. Mai mult, s-a stabilit influența  
19           aluaturilor îmbogățite cu dextran, la nivelul de adaos de 43%, asupra calității ulterioare a  
pâinii. *W. confusa* a produs eficient dextran din zaharoza adăugată în aluatul de grâu, fără  
21           producție puternică de acid. A fost dezvoltată o nouă metodă specifică asistată de enzime  
pentru analiza *in situ* a dextranului din aluat. Cu această metodă, s-a putut demonstra pentru  
23           prima dată producția semnificativă (11-16 g/kg DW) de dextran polimeric în aluat. De  
asemenea, a fost detectată formarea concomitentă de izomaltooligozaharide mai scurte de  
25           către *W. confusa*. Dextranul produs a crescut semnificativ vâscozitatea aluaturilor. Aplicarea  
aluaturilor îmbogățite cu dextran în coacerea pâinii a oferit pâine de grâu ușor acidă, cu  
27           volum îmbunătățit (până la 10%) și moliciune (25-40%) pe durata a 6 zile de depozitare. Prin  
urmare, *W. confusa* este o nouă tulpină promițătoare pentru producția eficientă *in situ* de  
29           dextrani și izomaltooligozaharide în aluaturi fără acidificare puternică.

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

35           Procedeu biotehnologic de obținere a dextranului prin fermentarea tulpinii de  
*Weissella confusa* ICMPP29, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea  
37           că, se izolează și se purifică o tulpină de bacterie lactică din iaurt comercial pe mediu de  
cultură Man Rogosa Sharpe agar suplimentat cu CaCO<sub>3</sub> 1%, se identifică prin analize  
39           moleculare ca fiind *Weissella confusa*, aceasta se cultivă în mediul de cultură care se  
sterilizează la 110°C, timp de 30 min și apoi se inoculează cu 30% inocul proaspăt de 24 h,  
41           cu o absorbantă de 0,5 la 600 nm, pentru a avea în mediile de cultură experimentale 4-6 x  
10<sup>8</sup> UFC la timpul 0, apoi se incubează 48 h la 33°C, fără controlul pH-ului, în condiții statice  
43           și dinamice la 100 rpm, după care se supune inactivării enzimatică la 100°C, pentru 15 min,  
se supune extracției și purificării dextranului și la final, uscării prin liofilizare.

45           Procedeu, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:  
- în componența mediului de cultură se folosesc componente puține și ieftine;  
47           - mediul de cultură experimental nu se diluează cu inocul, deoarece acesta se  
calculează direct, după formula prezentată mai sus  $[V_{100\text{mL}} = X/(A_{\text{inocul}}/0,5)]$ ;

# RO 133177 B1

- timpul unei fermentații lactice este de numai 48 h, mult mai scurt decât în alte cazuri;	1
- 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).	3
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.	5
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.	7
În continuare se dau trei exemple de realizare a invenției, cu referire la datele prezentate în tabelul 1:	9
<b>Exemplul 1</b>	11
Compoziția mediului de cultură notat MDI, constă în 55,3 g/L MRS, 40 g/L fructoză, 40 g/L glucoza, dizolvate în apă bi-distilată.	13
Mediul de cultură experimental astfel preparat, se sterilizează la 110°C, timp de 30 min. Separat se prepară un inocul proaspăt de 24 h din <i>Weissella confusa</i> 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.	15
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.	17
Fermentația se realizează timp de 48 h la 33°C, fără controlul pH-ului, în condiții statice și dinamice (100 rpm). După finalizarea fermentației, mediile se supun inactivării enzimatică la 100°C, pentru 15 min, 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.	19
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.	21
<b>Exemplul 2</b>	23
Se procedează ca în exemplul 1, respectând aceiași 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.	25

# RO 133177 B1

1 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  
3 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  
5 cantitate mai ridicată față de exemplul 1, datorită prezenței sucrozei, care activează biosin-  
teza și astfel, se eliberează o cantitate mai ridicată de dextran sucraza în mediu, enzimă care  
7 participă activ la biosinteza macromoleculilor de dextran.

### Exemplul 3

9 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  
11 dizolvate în lapte UHT cu următoarele caracteristici: valoare energetică de 44 kcal/100 mL  
și valori medii nutriționale/100 mL: 3 g proteine, 1,5 g grăsimi (din care 0,9 g acizi grași  
13 saturați), 4,5 g zaharuri și 120 mg calciu.

Cantitățile de dextran obținute în urma fermentării mediului de cultură notat MDIII, în  
15 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  
17 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  
19 cantitate de 17,4 g/L dextran.

21 *Analiza gravimetrică a dextranului obținut în urma fermentărilor experimentale*

*Tabelul 1*

Condițiile de fermentare	EPZ - MDI, g/L	EPZ- MDI1, g/L	EPZ- MDIII, g/L
Fermentație statică	-	-	25,2
Fermentație dinamică	2,8	5,18	17,4

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 agar suplimentat cu CaCO<sub>3</sub> 1%, se identifică prin analize moleculare ca fiind *Weissella confusa*, aceasta se cultivă în mediul de cultură care se sterilizează la 110°C, timp de 30 min și apoi se inoculează cu 30% inocul proaspăt de 24 h, cu o absorbantă de 0,5 la 600 nm, pentru a avea în mediile de cultură experimentale 4-6 x 10<sup>8</sup> UFC la timpul 0, apoi se incubează 48 h la 33°C, fără controlul pH-ului, în condiții statice și dinamice la 100 rpm, după care se supune inactivării enzimatică la 100°C, pentru 15 min, se supune extracției și purificării dextranului și la final, uscării prin liofilizare. 1
2. Procedeu biotehnologic de obținere a dextranului conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, mediul de cultură utilizat este MDI care se obține prin dizolvarea a 55,3 g/L mediul de cultură Man Rogosa Sharpe, 40 g/L fructoză și 40 g/L glucoză, în apă bi-distilată. 3
3. Procedeu biotehnologic de obținere a dextranului conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, mediul de cultură utilizat este MDII care se obține prin dizolvarea a 55,3 g/L MRS și 80 g/L sucroză în apă bi-distilată. 5
4. Procedeu biotehnologic de obținere a dextranului conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, mediul de cultură utilizat este MDIII care se obține prin dizolvarea a 55,3 g/L MRS și 80 g/L sucroză dizolvate în lapte UHT. 7
5. Procedeu biotehnologic de obținere a dextranului conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, volumul de inocul pentru 100 mL mediul 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 experiment. 9

