



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00451**

(22) Data de depozit: **30/07/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2022 BOPI nr. **6/2022**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
- DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI"(IFIN-HH), STR.REACTORULUI,
NR.30, MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **ENE MIHAELA, STR.CUPOLEI 2, BL.105,
SC.C, ET.8, AP.102, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PETRE ALEXANDRU,
STR. GRIGORE MOISIL, BL. PK5, SC. 3,
AP. 26, SAT 1 DECEMBRIE,
COMUNA 1 DECEMBRIE, IF, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A MELANINEI HIDROSOLUBLE
PRIN BIOSINTEZA, FOLOSIND MICELIUL CIUPERCII *FOMES
FOMENTARIUS***

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu biotehnologic de obținere a pigmentului melanina într-o formă hidrosolubilă. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de preparare a unei culturi submerse în mediu de tip Bulion Cartof Dextroză-PDB, pH 5...7, prin incubarea unei culturi pure de micelii vegetativ a speciei *Fomes fomentarius* timp de 10...20 zile la temperatura de 19...25°C, triturarea și omogenizarea coloniilor submerse dezvoltate, obținerea unui inocul pe suport prin transferul a 0,1...1 ml din suspensia hifală pe mediu de tip Agar Cartof Dextroză-PDA în care s-a încorporat

un fragment de plasă cu densitate mai mică decât a apei și ochiuri de 0,01...25 mmp, cu incubare timp de 5...15 zile, la 19...25°C, decuparea sterilă a inoculului pe suport obținut și transferul în mediul de cultură lichid cu generarea unei culturi statice la suprafața mediului, producătoare de melanină, incubarea acesteia timp de 30...100 zile la 19...26°C și extragerea pigmentului melanina într-o formă hidrosolubilă.

Revendicări: 3

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).



Procedeu de obtinere a melaninei hidrosolubile prin biosinteza,
folosind miceliul ciupercii *Fomes fomentarius*

Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
Informații Clasificate
INTRARE
Nr. 8/15 din 30.07.2021

Descrierea invenției

Prezenta invenție se refera la un **procedeu biotehologic** de obtinere a unui biopolimer ce contine pigmentul melanină legat covalent de β -glucani, prin cultivarea in vitro a ciupercii *Fomes fomentarius*. Fractia poliglucanica este minoritara si confera moleculei de melanina solubilitate in solutii apoase. In prezenta invenție, acest biopolimer complex, abundent in melanina, va fi denumit *melanina hidrosolubila*.

Fomes fomentarius (Carl von Linné, 1753 ex Elias Magnus Fries, 1849) (fam. Polyporaceae), denumita popular "copita de iasca", este o macromiceta xilofaga lent crescatoare, parazita, uneori saprofita, producand un putregai albicios pe lemnul de foiașe. Bazidiocarpul, in forma de copita, este medicinal, necomestibil, fiind folosit sub forma de extracte pentru proprietatile sale antiinflamatoare, antioxidante, antitumorale, antivirale, antibacteriene, imunostimulatoare.

Melanina este un pigment polimeric heterogen, obtinut prin oxidarea compusilor fenolici sau indolici, urmata de polimerizarea fenolilor intermediari si a chinonelor rezultate din acestia (Solano, 2014). Melanina standard este o macromolecula hidrofoba, incarcata negativ. Pigmentii melanotici pot fi clasificati pe baza structurii lor chimice, in: eumelanina, feomelanina, neuromelanina si alomelanina (d'Ischia et al. 2013). Eumelanina este subgrupul negru-marونیu de melanina si este cea mai comuna melanina intalnita la animale, inclusiv la om (Solano, 2014).

Melanina are numeroase **utilizari**: in cosmetice, in creme foto-protectoare, in sticla de ochelari, in filme de plastic, vopsele, lacuri si alte formulari pentru protectia suprafetelor rafetelor impotriva razelor ultraviolete, in imobilizarea unor radionuclizi precum uraniu din deseuri radioactive, in generarea de energie fotovoltaica, ca semiconductor organic in dispozitive medicale (Bothma si colab., 2008) precum si in studii de fluorescenta. Are de asemenea proprietati anti-HIV si este folosita pentru a genera anticorpi monoclonali pentru tratamentul melanomului metastatic (Plonka & Grabacka, 2006; Surwase si colab., 2013).

Melanina secretata in mediul de cultura de ciuperca *Fomes fomentarius* este un biopolimer hidrosolubil, complex format din ~80% melanine si ~20% beta-glucani, beta-glucanii conferindu-i solubilitatea in solutii apoase. Acest complex se regaseste si in miceliu, alaturi de complexul insolubil chitina-glucani-melanina, in care predomina chitina (Seniuk si colab., 2011). Potrivit acestui autor, complexul melanina-glucani de la *Fomes fomentarius* are asupra

ENCADRAREA
DIPLOMA
Luci duhael
R

lui *H. pylori* identice cu ale eritromicinei la toate concentratiile testate si mai puternice decat ale altor antibiotice. Are, de asemenea, o activitate antivirala mai mare decat *zidovudine* (Retrovir) fata de virusul HIV-1, la o toxicitate mai redusa decat a acestui medicament. Complexul hidrosolubil melanina-gluconi de la ciuperca *Inonotus obliquus* are activitate hipoglicemianta si efecte benefice asupra metabolismului lipidelor (Lee J.H. & Hyun C.K., 2014).

Se cunoaste din literatura ca β -glucanii (cele mai abundente polizaharide din peretele celulei fungice) au activitate imunostimulatoare, antitumorală (Akramiene si colab., 2007) si antimicrobiana (Camilli si colab., 2018).

Se cunosc, de asemenea, o serie de alte microorganisme producatoare de melanine: specii bacteriene - ex. *Vibrio cholerae*, *Shewanella colwelliana*, *Alteromonas nigrifaciens* (Soliev si colab., 2011) precum si specii de fungi inferiori (drojdii si mucegaiuri) - ex. *Colletotrichum lagenarium*, *Magnaporthe grisea*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigatus* (Langfelder si colab., 2003), insa natura lor patogena, precum si toxicitatea asociata biopolimerului secretat, restrange aria de utilizare si comercializare a acestor melanine (Lagashetti si colab., 2019).

Problema tehnica pe care o rezolva inventia este furnizarea unui procedeu biotehnologic cu costuri reduse, de obtinere a unei melanine de origine naturala, produsa de o ciuperca medicinala, intr-o forma solubila in solutii apoase, cu aplicatii potentiale in domeniul medico-farmaceutic.

Procedeul conform inventiei consta in **4 etape**, E1-E4:

- (E1) Pornind de la o cultura pura a ciupercii bazidiomicete *Fomes fomentarius*, se obtine intai o cultura submersa, de miceliu propagat vegetativ, in mediu Bulion Cartof Dextroza (Potato Dextrose Broth – PDB) pH=5.0...7.0, in vase cu dop de vata sau capac permisiv la aer (cu membrana cu pori de 0.22 μ m). Cultura se obtine prin incubare timp de 10...20 de zile, la 19...25° C, cu agitare 50...200 rpm. Se vor dezvolta colonii submerse, de culoare alb - bej deschis, de consistenta gelatinoasa, foarte fin fibroasa, de diferite marimi (in general 1-5 cm) si diferite forme (preponderent sferoidale).
- (E2) Coloniile dezvoltate submers se tritureaza in mod steril, prin agitare energica a vasului, dupa ce s-au adaugat bile de sticla sterile. Alternativ, se poate folosi un blender special, cu conditia sa fie asigurata sterilitatea intregii operatii. Se obtine astfel o suspensie de hife.
- (E3) In continuare se prepara *inoculul pe suport*, transferand un volum de 0,1...1 mL din suspensia de hife, omogenizata, la suprafata mediului solid Agar Cartof Dextroza (PDA), pH=5.00...7.00, in care s-au incorporat fragmente de plasa dintr-un material solid cu

Ene Mihail
R

densitatea mai mica decat a apei, denumit in continuare *suport*. Suportul va servi ulterior pentru mentinerea inoculului la suprafata culturii lichide. Suportul poate fi reprezentat (dar nu se limiteaza la acest exemplu) de o plasa cu ochiuri de 0.01...25 mm² (putea fi stabilita de hifele ciupercii), din polietilena de inalta densitate sau polipropilena. Suportul poate avea orice forma si dimensiune avantajeaza utilizatorul, trebuie sa fie mai mic decat gura vasului cu bulion in care se va face inocularea pentru cultura producatoare de melanina si trebuie sa fie steril. Suportul se incorporeaza la suprafata mediului agarizat la momentul repartizarii in placi de cultura. Cultura pentru obtinerea inoculului pe suport dureaza 5...15 zile, la temperatura de 19...25° C. Coloniile dezvoltate trebuie sa fie albe, pâsloase, pot prezenta pe alocuri zone bej sau chiar maronii; aparitia de picaturi de gutatie transparente pana la maronii este, de asemenea, normala.

Fenotipul de colonie albicioasa, cremoasa, lucioasa, cu aspect de drojdie, nu este potrivit producerii de melanina. Aparitia de colonii sporulate, pigmentate in alte culori decat bej sau maron indica contaminare cu mucegaiuri. Ambele situatii impun abandonarea culturii.

- (E4) Folosind acest inocul pe suport, se initiaza *cultura producatoare de melanina*, in mediu Bulion Cartof Dextroza - pH=5.00...7.00, prin decuparea, cu un bisturiu steril, a fragmentului de inocul pe suport si transferul acestuia in cultura lichida, mentinand orientarea coloniei. Pentru a secreta melanina, colonia de ciuperca trebuie sa se dezvolte in continuare la suprafata mediului (emers), cu fata superioara avand acces la aerul atmosferic, respectiv, fata inferioara in mediu. Cultura va fi efectuata in vase cu dop de vata sau capac cu membrana filtranta, avand pori de 0.22 um, ce permit accesul aerului atmosferic in mod steril.

Doar colonia formata la interfata cu aerul, din miceliu hidrofob, filamentos, va produce si va secreta in mediul de cultura melanina hidrosolubila; aceste colonii sunt albe, cu varsta devin bej-maronii si pot prezenta mici picaturi de gutatie pe suprafata. Coloniile albicioase, cremoase sau mucoase, cu aspect de drojdie, nu vor produce melanina.

In timpul dezvoltarii (extinderii) coloniei la suprafata, aceasta va secreta in mediul de cultura (pe fata inferioara, hidrofila, a coloniei), pigmentul melanina, intr-o forma solubila in mediu. Colonia se va extinde pana va ocupa intreaga suprafata a vasului de cultura, apoi va creste usor in grosime, devenind rigida, fibroasa. Vasul de cultura se va mentine static (evitand mutarea, examinarea frecventa), se va manevra cu atentie, astfel incat colonia sa fie mentinuta permanent la suprafata.

Melanina hidrosolubila produsa are densitate usor mai mica decat a mediului de cultura, astfel incat, in lipsa agitarii, ea ramane concentrata imediat sub colonie, formand un inel rosiatic-mariniu, in gradient de concentratie.

Cultura producatoare de melanina dureaza 30...100 de zile si se efectueaza la 19...26° C. La sfarsitul culturii, mediul de cultura devine rosiatic pana la maroniu si capata miros caracteristic de samburi de migdale, de intensitate proportionala cu pigmentatia. Dintr-o astfel de cultura, se pot obtine pana la 1.5 g/L melanina hidrosolubila [biopolimer total - substanta uscata, la litrul de bulion de cultura].

Fiind legata de β -glucani, pentru purificare, aceasta melanina hidrosolubila poate fi concentrata prin precipitare la rece, cu acetona, sau etanol, sau sulfat de amoniu, pastrandu-si solubilitatea dupa redizolvare in solutii apoase.

Avantajele majore ale procedului deriva din obtinerea unei melanine hidrosolubile, cu multiple aplicabilitati si din costul redus al biotehnologiei per ansamblu. Astfel:

- melanina conventionala este un pigment insolubil in majoritatea solventilor uzuali; solventii care o dizolva (DMSO, solutii bazice concentrate), la concentratiile eficiente, sunt putini si incompatibili cu aplicatiile medico-farmaceutice. Melanina hidrosolubila are potential comercial mult mai mare decat cea insolubila.
- procedeul de obtinere a melaninei hidrosolubile conform inventiei este practicabil intr-un laborator cu dotari modeste (o hota sau nisa care asigura lucrul in conditii sterile si un sterilizator sub presiune tip autoclav pentru mediile de cultura). De asemenea, tehnologia nu necesita personal cu calificare inalta, fiind suficienta specializarea in lucrul steril.
- in plus, microorganismul propus pentru biosinteza, conform inventiei, este o ciuperca bazidiomiceta xilofaga, nepatogena la om sau animale, deci fara risc infectios pentru personal; in cultura in vitro, miceliul se propaga vegetativ, fara a sporula, deci nu exista riscul contaminarii laboratorului cu spori.
- melanina de biosinteza este o macromolecula naturala, iar producerea ei in vitro de catre un microorganism are de asemenea avantajul de a fi independenta de variatiile sezoniere si prietenoasa cu mediul.

Caracterul de nouitate si originalitate al procedului deriva in primul rand din combinarea speciei de ciuperca (*Fomes fomentarius*) cu potential de sinteza a melaninei hidrosolubile, cu un mediu de cultura adecvat (Bulion Cartof Dextroza) - care contine aminoacizii necesari sintezei melaninei si cu tehnica de cultura *in vitro* la suprafata, a coloniei, in conditii care permit aerarea in mod steril. In al doilea rand, originala este si solutia tehnica propusa pentru a asigura caracterul emers al coloniei si anume cresterea inocului pe un suport solid, incorporat in mediul agarizat, dintr-un material cu densitate mai mica decat a apei, care ajuta la plutire – ex. plasa sau tesatura din polietilena de inalta densitate sau din polipropilena.

Taru Daniela
D

Bibliografie:

Bothma JP, De Boor J, Divakar U et al. Device-quality electrically conducting melanin thin films. *Adv Mater* (2008) 20:3539–3542. <https://doi.org/10.1002/adma.200703141>

Lee JH, Hyun CK. Insulin-sensitizing and beneficial lipid-metabolic effects of the water-soluble melanin complex extracted from *Inonotus obliquus*. *Phytother Res*. 2014; 28:1320-1328. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5131>

Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*. 2007; 43(8):597-606.PMID: 17895634

Camilli G, Tabouret G, Quintin J. The Complexity of Fungal β -Glucan in Health and Disease: Effects on the Mononuclear Phagocyte System. (2018) 9, p. 673. DOI 10.3389/fimmu.2018.00673.

Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*. 2003 Mar; 38(2):143-58.

Soliev AB, Hosokawa K, Enomoto K. Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011: 670349.

Seniuk O.F., Gorovoj L.F., Beketova G.V. si colab. *Anti-infective properties of the melanin-glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom, Fomes fomentarius (L.: Fr.) Fr. (Aphyllphoromycetidae)*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2011; 13(1):7-18. DOI: 10.1615/intjmedmushr.v13.i1.20.

Lagashetti AC, Dufossé L, Singh SK & Singh PN. Fungal Pigments and Their Prospects in Different Industries. *Microorganisms*. 2019, 7, 604; doi:10.3390/microorganisms7120604.

Plonka PM, Grabacka M. *Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects*. *Acta Biochim Pol*. 2006; 53(3): 429-43.

d'Ischia M, Wakamatsu K, Napolitano A et al. Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. *Pigment Cell Melanoma Res*. (2013) 26:616–633. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12121>

Surwase SN, Jadhav SB, Phugare SS, Jadhav JP. Optimization of melanin production by *Brevundimonas* sp. SGJ using response surface methodology. *3 Biotech*. 2013 Jun; 3(3): 187-194.

Solano F. Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New J Sci*. 2014: 498276. <https://doi.org/10.1155/2014/498276>

Luci Gabriela
R

Procedeu de obtinere a melaninei hidrosolubile prin biosinteza,

folosind miceliul ciupercii *Fomes fomentarius*

Revendicari:

Comisiunea de Stat pentru Invenții și Mărci
Informații Clasificate
INTRARE
Nr. 5/15 din 30.07.2021

1. Procedeu de obtinere a melaninei hidrosolubile prin biosinteza, folosind miceliul ciupercii *Fomes fomentarius*, **caracterizat prin aceea ca:** pornind de la o cultura pura de miceliu vegetativ a speciei *Fomes fomentarius*, se obtine intai o cultura submersa, in mediu Bulion Cartof Dextroza (Potato Dextrose Broth - PDB) pH = 5.0...7.0, prin incubare timp de 10...20 de zile, la temperatura de 19...25 °C, cu agitare 50...200 RPM, in vase cu dop de vata sau capac cu membrana filtranta cu pori de 0.22 μm, cultura submersa care mai apoi se tritureaza in mod steril, obtinandu-se o suspensie de hife, din care se prepara in continuare un inocul pe un suport solid, in mediu agarizat, din care mai departe se genereaza o colonie emersa, prin cultivare in mediu lichid.
2. Procedeu de obtinere a melaninei hidrosolubile prin biosinteza, folosind miceliul ciupercii *Fomes fomentarius*, conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca:** obtinerea melaninei hidrosolubile are loc in mediu de cultura Bulion Cartof Dextroza (Potato Dextrose Broth - PDB), la pH = 5.0...7.0, prin cultivarea statica, la suprafata, a miceliului vegetativ al ciupercii *Fomes fomentarius*, timp de 30...100 de zile, la temperatura de 19...26 °C, in vase cu capac sau dop permisiv in mod steril la aer atmosferic, fata superioara a coloniei avand acces la aer.
3. Solutie tehnica pentru generarea coloniei emerse producatoare de melanina – conform revendicarii 1, prin obtinerea unui inocul pe un suport solid, constand intr-o cultura pe mediu Agar Cartof Dextroza (Potato dextrose Agar – PDA), pH = 5.0...7.0, in care s-a incorporat la turnare un fragment steril de plasa cu densitate mai mica decat a apei, cu ochiuri de 0.01...25 mm²; cultura inoculului pe suport se incubeaza la 19...25 °C, timp de 5...15 zile, timp in care se formeaza colonii pasloase, rigide, hidrofobe, de culoare alb-bej, cu puncte maronii.

~~NESECRET~~
SECRET DE SERVICIU

SECRET DE SERVICIU
Dr. Ing. Anghel
Lau Mihaila
R