



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00415

(22) Data de depozit: 16/07/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/01/2023 BOPI nr. 1/2023

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE  
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF  
BUCUREȘTI, CALEA VITAN NR.112,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• STOICA ROXANA-MĂDĂLINA,  
STR.AZURULUI, NR.25, SC.1, ET.1, AP.8,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, RO;

• MOSCOVICI MIȘU, STR. JEAN STERIADI,  
NR.7, BL.I-22, SC.B, ET.2, AP.16,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• SEVCENCO MIHAELA-CLAUDIA,  
STR.BRAȘOV, NR.25L, BL.A3, ET.4, AP.24,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• NEAGU GEORGETA,  
STR.MUNȚII MEHEDIŢI NR.4, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) MICROORGANISM ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI  
POLIZAHARID MICROBIAN PRIN SINTEZĂ BIOLOGICĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biopolimer de tip polizaharidă microbială cu aplicabilitate în industria farmaceutică și medicină. Procedeu, conform invenției, constă în: faza de preinocul prin procesul de creștere celulară a tulpinii *Rhizobium radiobacter* ICCF 410 pe un mediu nutritiv agarizat, faza de inocul (vegetativă) prin cultivarea tulpinii pe un mediu lichid care conține glicerină ca sursă de carbon

și extract de porumb ca sursă de azot, faza de biosinteză pe un mediu submers conținând glicerină, extract de porumb, acid citric și săruri minerale, urmată de procesarea post-biosinteză, din care se izolează polizaharida purificată (rizoban), având un conținut de 40...45% acid glucuronic, 30...35% glucoză și ramnoză.

Revendicări: 2



## MICROORGANISM ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI POLIZAHARID MICROBIAN PRIN SINTEZĂ BIOLOGICĂ

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui polizaharid microbial, prin fermentație, utilizând microorganismul *Rhizobium radiobacter* ICCF 410, izolat din natură.

În prezent, dintre polizaharidele bacteriene studiate pe larg și exploatate comercial, fac parte: celuloza bacteriană, produsă de *Acetobacter xylinum*, dextranul, produs de bacterii din genul *Leuconostoc*, levanul, produs de bacterii din genurile *Bacillus*, *Zymomonas* și *Lactobacillus* și xantanul, produs de bacterii din genul *Xanthomonas* [1].

Biosinteza de polizaharide rizobiene a fost studiată la diverse specii ale genului *Rhizobium*, precum *Rhizobium tropici*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium radiobacter* CAS, *Rhizobium sp.* PRIM-18, *Rhizobium sp.* M2 [2], *Rhizobium meliloti* [3], *Rhizobium mongolense* [4].

Din literatura de specialitate se remarcă faptul că polizaharidele obținute cu speciile *Rhizobium* conțin în general, ca monozaharide principale, galactoză și glucoză [5].

S-a menționat capacitatea unor tulpini de *Rhizobium radiobacter* de a produce succinoglican, polizaharid compus în principal, din unități de galactoză și glucoză, unite prin legături glicozidice  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 și  $\beta$ -1,6 [6], cât și glucomanan produs de *Rhizobium leguminosarum*, polizaharid constituit majoritar din glucoză, manoză și cantități mici de galactoză și ramnoză [7].

De asemenea, s-a remarcat obținerea de curdlan produs de *Rhizobium radiobacter*, cu un conținut de glucoză, galactoză și piruvat în raport de 1:1:1, în contrast cu polizaharidul curdlan produs de *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466, compus doar din glucoză [8].

Tulpinile de *Rhizobium* metabolizează diferite surse de carbon pentru producerea de polizaharide, predominant fiind folosite glucoza și sucroza [2].

WO2019082906 (A1) prezintă o gamă largă de substanțe utilizate ca posibile surse de carbon pentru obținerea de polizaharide rizobiene, printre care maltoză, glucoză, fructoză, manitol, trehaloză, lactoză, zaharoză și amidon, alături de extract de drojdie și peptonă, ca surse de azot.

Polizaharidele rizobiene au câștigat o atenție deosebită în diferite domenii, în special, în medicină, industria farmaceutică și cosmetică datorită proprietăților importante pe care le posedă: activitate anti-tumorală, antioxidantă, antibacteriană și imunostimulatoare.

Mai mult, pot fi utilizate ca agenți de gelifiere, îngroșare și stabilizare a produselor alimentare, cât și în industria chimică datorită vâscozității lor ridicate la concentrații scăzute, compatibilității cu sărurile minerale și stabilității bune pe o gamă largă de pH, temperatură și rezistență ionică [9].

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă într-un procedeu de obținere a unui polizaharid numit rhizoban, prin biosinteză, cu o tulpină nou-izolată de *Rhizobium radiobacter*, utilizând ca sursă de carbon glicerina, subprodus din industria biodieselului, cu un conținut nou în monomeri, constituit majoritar din acid glucuronic, glucoză și ramnoză.

Procedeu de biosinteză a rhizobanului, conform invenției, înlătură dezavantajul unei surse de carbon zaharidice, mai scumpă decât glicerina, utilizând un microorganism nou-izolat din natură și obținerea unui polizaharid nou, ce prezintă o compoziție originală, constituită din acid glucuronic 40-45%, glucoză 30-35% și ramnoză.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- izolarea din natură a unui nou microorganism producător de polizaharid, identificat prin secvențierea genei ARNr 16S ca fiind specia bacteriană *Rhizobium radiobacter*, inclus în Colecția de Microorganisme de Importanță Industrială CMII-ICCF-WFCC 232, cu numărul de identificare ICCF 410, cât și în cadrul Autorității de Depozit Internaționale NCAIM din Budapesta, Ungaria (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Institute of Food Science and Technology), cu numărul de înregistrare NCAIM P (B) 001493.

- obținerea prin biosinteză, cu microorganismul *Rhizobium radiobacter* ICCF 410, a unui polizaharid original, cu structură diferită de a altor polizaharide microbiene cunoscute, conținând acid glucuronic (40-45%), glucoză (30-35%) și ramnoză.

- valorificarea glicerinei rezultată din industria biodieselului.

Prezenta invenție descrie obținerea polizaharidului numit rhizoban, prin valorificarea glicerinei rezultată din fabricația biodieselului. Microorganismul utilizat în acest procedeu este *Rhizobium radiobacter* ICCF 410.

*Rhizobium radiobacter* este o tulpină bacteriană ce prezintă un metabolism de tip aerob. Cultura are un aspect de tip "smooth", coloniile sunt sferice, convexe, de culoare alb-gălbui, iar celulele se prezintă sub formă de bacili, gram-negativi.

Caracteristicile biochimice sunt următoarele:

- sinteza de catalază +;
- sinteza de oxidază +;
- hidrolizează esculina;
- temperatura optimă de cultivare: 25-30°C;
- pH-ul optim de creștere: 6-7;

Procedeul conform invenției constă în aceea că tulpina *Rhizobium radiobacter* ICCF 410 se supune unui proces de creștere celulară și producere de polizaharid, constând în: faza de preinocul pe un mediu nutritiv agarizat, faza de inocul pe un mediu lichid ce conține glicerină ca sursă de carbon și extract de porumb ca sursă de azot, și faza de biosinteză a rhizobanului pe un mediu submers, ce are o compoziție similară cu cea a inoculului, însă în proporții diferite.

După biosinteză, prelucrarea mediului de fermentație a constat în separarea biomasei prin filtrare, concentrarea sub vid a filtratului, precipitarea cu etanol, separarea și uscarea produsului brut (la vid, 85°C), până la greutate constantă, umată de redizolvare, purificarea și concentrarea soluției obținute prin filtrare, purificare prin ultrafiltrare - diafiltrare și izolarea polizaharidului purificat.

Prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) s-a evidențiat faptul că polizaharidul purificat prezintă o compoziție diferită, spre deosebire de cea a altor polizaharide, fiind compusă din monomeri de acid glucuronic, glucoză și ramnoză.

De asemenea, în urma studiilor realizate în vederea evaluării potențialului citotoxic al polizaharidului numit rhizoban asupra liniei de fibroblaste umane (ATCC- PCS-201-012) nu s-au observat efecte citotoxice, ci din contră, o ușoară creștere a viabilității celulare.

Biopolimerul obținut prezintă aplicații potențiale în industria farmaceutică și medicină, ca "sistem inteligent de administrare a medicamentelor" în terapia cancerului și ca matrice pentru ingineria tisulară, în industria cosmetică pentru dezvoltarea formulărilor cosmetice cu potențial de hidratare ridicat, cât și în industria alimentară, ca agent de gelifiere, îngroșare și stabilizare în timpul prelucrării produselor alimentare [2].

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenției:

Biosinteza cuprinde cele trei faze caracteristice unui proces microbial, și anume: preinocul, faza de inocul (faza vegetativă) și faza de bioproces, în care are loc biosinteza propriu-zisă.

Faza de preinocul se obține prin creșterea microorganismului pe un mediu nutritiv agarizat ce conține (% g/v): extract de drojdie 1; peptonă 1; glicerol 5; agar 2. Se corectează pH-ul la valoarea inițială de 6,5-7, sterilizare la temperatura de 115°C, timp de 30 minute. Incubarea are loc la temperatura de 30°C, timp de 48-72 h.

Cultura de *Rhizobium radiobacter* se preia ușor în apă distilată sterilă.

Faza de inocul se realizează în flacoane Erlenmeyer de 500 mL cu 100 mL mediu, compoziția acestuia fiind următoarea (% g/v): glicerină 1; extract de porumb 1,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2; NaCl 0,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05. Se corectează pH-ul la valoarea inițială de 6,5-6,7, sterilizare la temperatura de 115°C, timp de 30 minute. Cultivarea durează 24 de ore, prin incubare la 30°C, cu agitare rotativă (200-220 rot./minut).

Mediul de bioproces prezintă următoarea compoziție (% g/v): glicerină 3,5; extract de porumb 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,07;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,4; acid citric 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05;  $\text{MnSO}_4$  0,03. Se corectează pH-ul la valoarea inițială de 6,5-6,7, sterilizare la temperatura de 115°C, timp de 30 minute. Incubarea fazei de bioproces se realizează cu 10% din suspensia microbiană de inocul. Fermentația se realizează în flacoane Erlenmeyer de 500 mL cu 100 mL mediu, la o temperatură de 30°C, timp de 72 h, cu un regim de agitare variabilă de 200-220 rot./minut.

#### **Procesarea post-biosinteză**

Mediul de fermentație (1,3 L) rezultat în urma procesului de biosinteză, se diluează cu apă distilată în raport de 1:1 (v/v) și se filtrează, sub vid, pe strat adjuvant de celită. După filtrare, filtratul liber de celule se concentrează la rotaevaporator, sub vid, la maximum 60°C, până la 1/2 din volum, după care se adaugă clorură de potasiu 5%.

Izolarea produsului brut se realizează prin precipitare cu alcool etilic, în raport de 1:3, urmată de uscarea acestuia într-o etuvă sub vid, în trepte de temperatură, la maximum 85°C.

Polizaharidul brut obținut (7,4 g) se supune apoi procesului de purificare. Acesta se dizolvă în 1,5 L apă distilată, după care se filtrează de impuritățile insolubile pe strat adjuvant de celită.

Filtratul obținut este supus ultrafiltrării-diafiltrării prin membrane polisulfonice cu limita de excludere de 10KDa, obținându-se 1,3 L retentat.

Acesta se concentrează la rotaevaporator, de unde se obțin 0,9 L concentrat. Din concentrat, se izolează polizaharidul purificat prin precipitare cu etanol în raport de 1:3, după adăugarea de clorură de potasiu 5%.

Produsul precipitat se filtrează pe hârtie de filtru și se usucă într-o etuvă sub vid, în trepte de temperatură, la maximum 85°C.

Se obțin 4,1 g produs purificat, conținând ca monomeri acid glucuronic 43,2%, glucoză 32,1% și ramnoză 1,5%.

## REVENDICĂRI

1. Procedeu de biosinteză a rhizobanului **caracterizat prin aceea că** o tulpină de *Rhizobium radiobacter* ICCF 410, nou-izolată din natură, se supune unei fermentații submerse, pe un mediu de cultură ce utilizează ca sursă de carbon glicerina, subprodus al industriei biodieselului, extract de porumb, săruri minerale și acid citric, umată de separarea și purificarea polizaharidului obținut.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se obține un polizaharid original, numit rhizoban, ce prezintă o compoziție diferită de cea a altor polizaharide microbiene cunoscute, constituită din monomeri de acid glucuronic 40-45%, glucoză 30-35% și ramnoză.