



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **96-01322**

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **28.06.1996**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate:

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(41) Data publicării cererii:
30.12.1997 BOPI nr. **12/1997**

(87) Publicare internațională:
Nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.11.2000 BOPI nr. **11/2000**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 90438

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(71) Solicitant: **INSTITUTUL DE CERCETĂRI CHIMICO-FARMACEUTICE, BUCUREȘTI, RO;**

(73) Titular: **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-FARMACEUTICĂ,
BUCUREȘTI, RO;**

(72) Inventatori: **IONESCU CORINA, BUCUREȘTI, RO; MOSCOVICI MIȘU, BUCUREȘTI, RO; ONISCU
CORNELIU, IAȘI, RO; FOTEA ORTANSA, BUCUREȘTI, RO; PĂRVULESCU PAULINA
MARIA, BUCUREȘTI, RO; HANGANU LUCIAN DORIN, BUCUREȘTI, RO; PEDA SILVIA,
BUCUREȘTI, RO;**

(74) Mandatar:

(54) **MICROORGANISM PRODUCĂTOR DE POLIZAHARIDE**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la un microorganism producător de polizaharide de tip pullulan, care este o tulpină de *Aureobasidium pullulans ICCF-83*, înregistrată în colecția Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice sub nr. 211, ce se prezintă sub formă de celule alungite, perlate, hialine, cu

potențial de pigmentare absent, cu colonii de tip smooth, care fermentează total fructoza, glucoza, xiloza, capabil să consume rapid sursa de carbon în concentrații inițiale de până la 10% și cu o capacitate superioară de a sintetiza pullulan.

Revendicări: 1

RO 116203 B



Invenția se referă la un microorganism producător de polizaharide ce sintetizează prin fermentație pe un mediu adecvat și în condiții optime, un polizaharid de tip pullulan, cu largi utilizări în special în industria alimentară, chimică și farmaceutică.

Se cunosc diferite tulpini de *Aureobasidium pullulans* cu caractere superioare de biosinteză a pullulanului. Astfel, în scopul creșterii potențialului productiv al unei tulpini parentale, s-a aplicat mutageneza cu radiații gamma (RO 90 438/1989) sau chimică (FEMS Micro biology Letters 124, 167-172, 1994). În același scop și pentru a reduce gradul de pigmentare în timp a mediului de fermentație, cu consecințe negative atât asupra procesului de separare și purificare, cât și a calității polizaharidului obținut, se izolează din natură noi tulpini de *Aureobasidium* (Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21, 494-503 (1993).

Deși s-au obținut rezultate superioare, tulpinile producătoare obținute până acum cu un volum mare de muncă și costuri, prezintă unele dezavantaje cum ar fi:

- concentrație inițială a sursei de carbon ce atinge max. 8%, limitând astfel concentrația finală a polizaharidului sintetizat;

- capacitate lentă de consum a sursei de carbon și, ca urmare, de sinteză a polizaharidului, necesitând o durată mare a procesului de fermentație (5...7 zile);

- imposibilitatea, în majoritatea cazurilor, de a împiedica formarea pigmentului brun (de tip melanină), creând dificultăți în izolarea unui produs de calitate superioară.

Microorganismul conform invenției este o tulpină de *Aureobasidium pullulans* ICCF-83, înregistrată în colecția Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice sub nr. 211, ce se prezintă sub formă de celule alungite, perlate, hialine, cu potențial de pigmentare absent, cu colonii de tip smooth care fermentează total fructoza, glucoza, xiloza, capabilă să consume rapid sursa de carbon în concentrații inițiale de până la 10% și cu o capacitate superioară de a sintetiza pullulan.

Invenția prezintă avantajul realizării unui microorganism capabil de a sintetiza polizaharide cu un randament ridicat.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

Exemplul 1. Din tulpina *Aureobasidium pullulans* ICCF-68, stocată în condiții de laborator (+4°C) pe un mediu static lichid, se preia 0,1 ml și se dispersează în diluții seriate pe mediu nutritiv agarizat, repartizat în plăci Petri.

Mediul nutritiv agarizat conține (%): glucoză 5; sulfat de amoniu 0,2; azotat de sodiu 0,2; fosfat monopotasic 0,5; clorură de sodiu 0,2 și sulfat de magneziu 0,05.

Incubarea se face la 28°C, 48 h.

Se face o selecție a coloniilor izolate conform criteriilor: colonii tip smooth, culoare alb-crem, suprafață bombată, lucioasă, netedă.

Colonia selecționată se picură din nou pe mediul nutritiv agarizat, cu incubare la 28°C, static, 48 h, care constituie preinoculul.

Cultura dezvoltată în plajă provenită din colonia selecționată se suspendă în apă distilată, sterilă, câte 5 ml/tub, și se inoculează un flacon Erlenmayer cu mediu inocul în raport de 2% (v/v).

Mediul de inocul se obține conform descrierii din exemplul 1, conținând (%): glucoză 2; bactopectonă 0,2; KH_2PO_4 0,2; NaCl 0,2.

Cultura optimă, conform descrierii de mai sus, se inoculează în raport de 1 - 5 % (v/v) în mediul de biosinteză descris.

Schema de lucru este următoarea:

Mediu static lichid +4°C <i>Aureobasidium pullulans ICCF -68</i>	0,1 ml în → diluții seriate	Mediu nutritiv agarizat în plăci Petri	inoculare statică 28°C →	colonii izolate tipice →	50
Repicare de colonie pe mediu nutritiv agarizat în eprubete, cultură în plajă 7-14 zile	→ Preinocul 5 ml apă distilată/tub suspensionare 2 ml	inocul lichid →	inoculare 28°C, agitare 48 h	biosinteză 28°C Agitare 48	55 60
Preinoculii care au avut caracteristicile: depigmentare constantă și absolută în timp de 7 - 14 zile; consum rapid al masei de carbon în faza de biosinteză (48 h); productibilitate sporită în pullulan - au fost trecuți în mediu lichid de stocare, pentru conservarea acestor caracteristici și reluarea ciclului de selecție/productie. În decursul timpului (cca. 5 ani) din tulpina ICCF-68 s-a selecționat tulpina ICCF-83 având caracteristicile biochimice superioare.					65
Tulpina <i>Aureobasidium pullulans ICCF-83</i> , înregistrată în colecția ICCF sub nr.211, prezintă următoarele caracteristici:					70
a) <i>Morfologice</i> : celule rotunde, hialine, perlate cu pereți subțiri care devin îngroșați, cu aspect de drojdie cu balastospori care, prin diviziune, dezvoltă un miceliu adevărat, ce formează chlamidospori.					75
b) <i>Culturale</i> : pe medii lichide statice prezintă un depozit translucid, care, cu timpul, se pigmentează cu melanină; lichidul este clar, vâscos și devine opalescent prin agitare; pe medii lichide agitate, cultura se prezintă cu aspect opalescent cu turbiditate uniformă ce devine verde-închis-negru, după 80 h de agitare.					80
Coloniile pe medii agarizate peptonate, cu un ciclu de 48 h, sunt de tip smooth de culoare alb-crem. Suprafața lor este bombată, lucioasă, netedă.					80
Prin îmbătrânire, coloniile nu își modifică aspectul morfologic tip smooth, sunt lucioase, mucoidale și rămân total depigmentate indiferent de vârstă.					
Pe gelatină, microorganismul crește la suprafață, cu aspect opac.					
c) <i>Fiziologice</i> : tulpină aerobă, pH optim pentru multiplicare 5,5...7; pentru biosinteză 5...7,5 cu limită de 4,5...8. Temperatura optimă de dezvoltare 25...28°C. Nu reduce nitratii și nitritii; nu hidrolizează amidonul; reacțiile la roșu-metil, Voges-Proscauer, indol, urează și hidrogen sulfurat sunt pozitive; fermentează total glucoza, fermentează moderat la pH neutru maltoza, celobioza, lactoza, xiloza, arabinoza și fructoza; nu fermentează galactoză, zaharoza, rafinoza, melibioza, dulcitolul inositolul, salicina, adonitul și inulina.					85 90

Ca mod de lucru pentru selecția microorganismului se procedează astfel:

O fiolă de liofilizat (al unei suspensii total depigmentate, cu productivitate maximă în pullulan sau o fiolă crioconservată în azot lichid (cu aceeași suspensie) se suspendă în 5 ml ser fiziologic steril și se inoculează pe un mediu de agarizat nutritiv, ce conține glucoză, extract de drojdie, extract de malt și bactopectonă. Incubarea se face la 25...28°C timp de 48 h.

Cultura cu aspect corespunzător, conform descrierii coloniilor smooth mucoide de pe mediul nutritiv, este suspendată cu 5 ml apă distilată sterilă și, în mod simultan, se inoculează un tub cu mediu static de conservare, precum și un tub cu mediu agarizat nutritiv - conform descrierii de mai sus, care constituie preinoculul pentru a testa capacitatea productivității de pullulan pe un mediu specific de biosinteză.

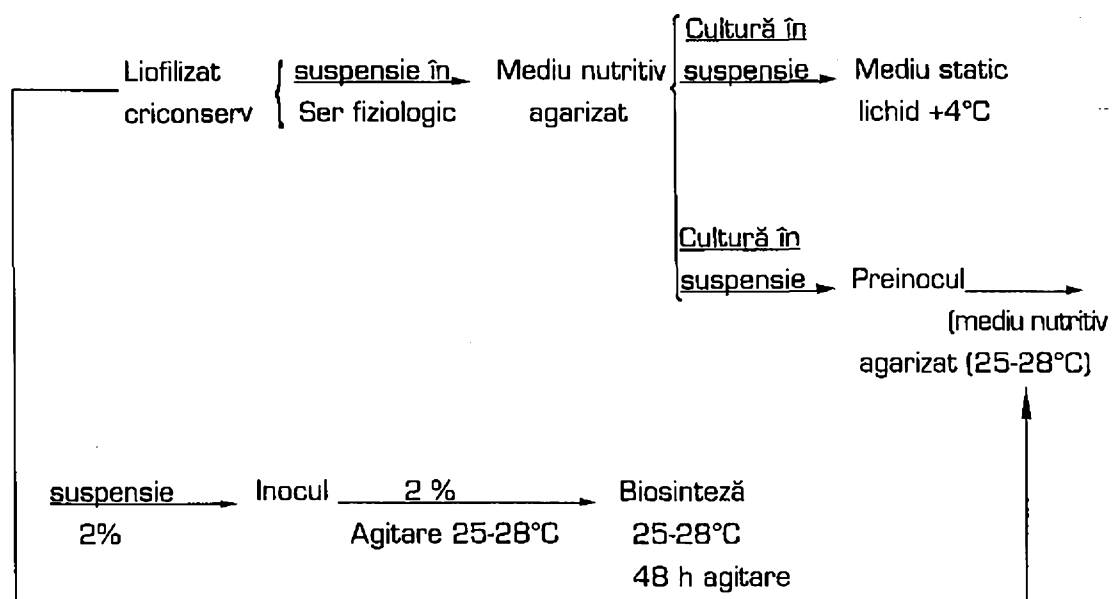
Mediul static lichid (RO 88881/1985) conservă microorganismul pe o perioadă medie de timp (6 - 12 luni) la o temperatură de +4°C, cu inhibarea proceselor metabolice ce formează pigmentarea lentă a celulelor microorganismului, care, odată repuse în condiții de dezvoltare pe medii nutritive și pe medii de biosinteză, au capacitatea de a relua ciclul evolutiv și de sinteză a pullulanului, fără a produce melanină.

Ca mod de lucru pentru testarea capacității productive se procedează astfel: Preinoculul obținut conform descrierii de mai sus (mediu nutritiv inoculat cu 0,1 ml cultură din mediul static lichid) se suspendă cu 5 ml apă distilată și, din acesta, se inoculează, în raport de 2%, un mediu de inocul la flacoane tip Erlenmayer.

Mediul de inocul conține glucoză, bacto peptonă și săruri minerale la un pH în limite de 4,5...7; este incubat la 25...28°C cu agitare rotativă de 200...300 rpm timp de 18...24 h.

Cultura optimă, conform descrierii de mai sus, se inoculează în raport de 1...5 % în mediul de biosinteză ce conține (%): glucoză 5 - 10 (s.r.); KH_2PO_4 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2; NaNO_3 0,2; NaCl 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,08, pH inițial ajustat la 5 - 6,5 cu soluție NaOH 10 N.

Culturile care au prezentat cele mai mari productivități în pullulan au fost în continuare selecționate conform procedeului descris schematizat astfel:



În tabelul 1 se dau, comparativ, caracteristicile de asemănare și diferențiere între tulpina parentală și cea nou obținută prin selecție.

140

Tabelul 1

Caracteristici	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
	ICCF-68 (M ₅₋₈)	ICCF - 83
O	1	2
I. Caractere morfologice		
1. Dimensiuni		
- radulaspori	3 -3,5/1,5-2 u	3,5/1,5 - 2 u
- miceliu	10-20/1,5 - 2,5 u	10 - 20/2,5 u
2. Mobilitate	nu prezintă	nu prezintă
3. Sporulare	3 - 3,5/1,5 -2 u	3,5/2 - 2,5 u
4. Formă morfologică	Celule rotunde hialine perlate cu pereții subțiri care devin îngroșați cu aspect de drojdie; blastospori prin diviziune fac un micel adevărat	Celule alungite perlate cu pereți hialini subțiri care au pierdut capacitatea de a forma miceliu și blastospori pigmentați cu melanină
II. Aspecte culturale		
1. Aspect pe medii lichide		
- statice	depozit translucid cu creștere pe pereții eprubetei în formă de inel ce devine pigmentat cu vârsta; lichidul este clar și devine opalescent la agitare.	depozit translucid cu creștere pe pereții eprubetei în formă de inel care rămâne depigmentat total cu vârsta; lichidul este clar și devine opalescent la agitare.
- agitate	opalescent cu turbiditate uniformă ușor vâscos de culoare alb-gălbuie ce devine verde închis-negru după 48 h prin eliberare de pigment (melanină).	opalescent cu turbiditate uniformă, ușor vâscos, de culoare alb-gălbui ce nu se modifică după 48 h.

145

150

155

160

165

170

Tabelul 1 (continuare)

Caracteristici	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
	ICCF-68 (M _{5.8})	ICCF - 83
O	1	2
2. Aspectul coloniilor	pe medii agarizate peptonate prezintă creștere la 48 h; colonii tip smooth și rough de culoare alb-crem:suprafața bombată, lucioasă, netedă prin îmbătrânire devin rough cu aspect aderent la mediu și cu eliberare de melanină.	pe medii agarizate peptonate prezintă creștere la 48h; colonii de tip smooth lucioase, cu aspect mucoid de culoare albă; suprafață bombată, netedă; prin îmbătrânire nu se modifică aspectul macroscopic descris: se prelevează ușor de pe mediu; nu se formează melanină.
	ICCF-68 (M _{5.8})	ICCF - 83
O	1	2
3. Dezvoltare pe gelatină	creștere la suprafață cu aspect lucios	creștere la suprafață cu aspect lucios mucoid.
III. Caractere morfologice		
1. Necrsități de O ₂	aerob	aerob
2. PH optim - multiplicare - biosinteză - pH limită	5,5 - 7 5 - 7,5 4,5 - 8	5,5 - 7 4,5 - 7,5 4 - 8
3. Temperatură optimă de dezvoltare	25 - 28°C	25 - 28°C
4. Reducerea nitrăților	-	-
5. Hidroliza amidonului	-	-
6. Reacția la roșu-metil	-	-
7. Reacția Voges Proscauer	-	-
8. Reacția la indol (Kovacs)	-	-
9. Reacția la urează	-	-
10. Hidrogen sulfurat	-	-

Tabelul 1 (continuare)

Caracteristici	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
	ICCF-68 (M ₅₈)	ICCF - 83
O	1	2
11. Fermentație de zaharuri		
A) totală cu producere de acid	fructoză, xiloză	fructoză, xiloză, glucoză
B) moderată (pH neutru)	maltoză, celobioză, lactoză, arabinoză, glucoză	maltoză, celobioză, lactoză, arabinoză, zaharoză
C) nu fermentează	galactoză, zaharoza, rafinoza, melibioza, dulcit, inosit, salicin, adonit, inulin	galactoză, rafinoza, melibioza, dulcit, inosit, salicin, adonit, inulin
IV. Necesități nutriționale	tulpină prototrofă crește pe mediu minimal	tulpină prototrofă crește pe mediu minimal
V. Capacitate de consum a sursei de carbon (glucoză(% (sr)		
- fermentație tip batch	5-8 (48-60 h)	5-10 (48-60 h)
- fermentație tip fed-batch	14 (82 h)	19 (90 h)
VI. Capacitate de a produce pullulan - conc. Finală g/l		
- fermentație tip batch în bioreactor metalic (150 l)	25 - 50	30 - 60
- fermentație tip fed-bach (90 h) în microfermentator (14 l)	65	103
Caracteristici ale polizaharidului (pullulan) produs:		
- masă moleculară Kda	200 - 300	150 - 300
- vâscozitate aparentă a sol. Apoase 2% (vâscozimetru rotativ 1300 s ⁻¹ , 23°C)	3 - 6	2,5 - 6

220

225

230

235

240

245

250

255

Revendicare

Microorganism producător de polizaharide de tip pullulan, **caracterizat prin aceea că** este o tulpină de *Aureobasidium pullulans ICCF-83*, înregistrată în colecția Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice sub nr.211, ce se prezintă sub formă de celule alungite, perlate, hialine, cu potențial de pigmentare absent, cu colonii de tip smooth care fermentează total fructoza, glucoza, xiloza, capabilă să consume rapid sursa de carbon în concentrații inițiale de până la 10% și cu o capacitate superioară de a sintetiza pullulan.

Președintele comisiei de examinare: **chim. Hăulică Mariela**

Examinator: **biochim. Crețu Adina**

