MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	**101999900771345**
Data Deposito	**02/07/1999**
Data Pubblicazione	**02/01/2001**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		

Titolo

PROCESSO PER LA PREPARAZIONE DEI POLISACCARIDI K4 E K5 DA ESCHERICHIA COLI.

Descrizione del Brevetto per Invenzione Industriale dal titolo:

"Processo per la preparazione dei polisaccaridi K4 e K5 da *Escherichia coli*"

a nome di: INALCO S.p.A.

con sede in: MILANO

inventori designati: Petrucci Franco, Zoppetti Giorgio, Oreste Pasqua

MI 99 A 001465

depositata il con n.

UFFICIO BREVETTI 02 LUG. 1999 MILANO

*** *** ***

Tecnica anteriore

Sono noti i polisaccaridi K4 e K5 ottenibili da ceppi di *Escherichia coli* responsabili di infezioni extraintestinali.

Il polisaccaride K4 è costituito da quantità equimolecolari di acido glucuronico ed N-acetilgalattosammina in catena lineare legati con legami β-1,3 e fruttosio legato in catena laterale al carbonio 3 dell'acido glucuronico.

Il polisaccaride K5 è costituito da quantità equimolecolari di acido glucuronico ed N-acetilglucosammina, che compongono l'unità ripetitiva lineare alternata 4-β-glucuronil-1,4 α-N-acetilglucosammina. Tale unità ripetitiva presenta un'anologia strutturale con l'eparina completamente desolfatata ed N-acetilata, per cui si può ipotizzare l'impiego dei K5 in processi di semisintesi per ottenere polisaccaridi solfatati eparino-simili. La possibilità di produrre i polisaccaridi K4 e K5 mediante un processo per via fermentativa apre quindi nuove prospettive per l'ottenimento di molecole biologicamente attive per via semisintetica in alternativa all'estrazione da organi animali.

Il polisaccaride K5 è stato inizialmente ottenuto nella forma capsulare dalla brodocoltura *in toto* con rese di circa 40-50 mg/L di brodocoltura [Eur. J. Biochem. **116**, 359-369, 1981].

Successivamente è stata descritta la produzione del polisaccaride K5 in forma extracellulare, che prevede l'isolamento del K5 dal filtrato colturale con rese variabili da 200 a 700 mg/L di brodocoltura [J. Bioact. Comp. Polym. **11**, 301-311, 1996; Brevetto Europeo EP 0489 647 A2, 1991].

Anche il polisaccaride K4 è stato inizialmente ottenuto nella forma capsulare dalla brodocoltura *in toto,* con rese di circa 80-90 mg/L di brodocoltura [Eur. J. Biochem. **177**, 112-124, 1988].

Successivamente è stata descritta la produzione del polisaccaride K4 in forma extracellulare che prevede l'isolamento del K4 dal solo filtrato colturale con rese di circa 200 mg/L di brodocoltura [Biotechnol. Letters **18**, 383-386, 1996].

Le rese sopra riportate non consentono risultati economicamente vantaggiosi.

Sommario

Noi abbiamo ora trovato un nuovo processo che consente di ottenere i polisaccaridi K4 e K5 per via fermentativa operando l'isolamento da brodocolture di *Escherichia coli*.

Il processo per la produzione, isolamento e purificazione dei polisaccaridi K4 e K5 secondo la presente invenzione, consente di ottenere detti polisaccaridi con elevata purezza e con rese più elevate rispetto ai processi noti .

Il processo dell'invenzione comprende i seguenti stadi:

a) fermentazione in coltura sommersa di un ceppo di *Escherichia coli* produttore del polisaccaride K4 oppure di un ceppo di *Escherichia coli* produttore del polisaccaride K5;

b) centrifugazione della brodocoltura, concentrazione del filtrato colturale tramite ultrafiltrazione e precipitazione del polisaccaride mediante trattamento con un solvente organico;

c) dissoluzione del precipitato in opportuna soluzione tampone e trattamento con proteasi;

d) passaggio attraverso colonna a scambio ionico seguito da uno o più stadi di dialisi e riprecipitazioni con etanolo.

L'innovazione del processo è caratterizzata dal fatto che il mezzo colturale per detta fermentazione è un mezzo acquoso comprendente: farina di soia degrassata, sali minerali e glucosio oppure la porzione dializzata di autolisato di lievito, sali minerali e glucosio.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Le caratteristiche ed i vantaggi del processo per la preparazione dei polisaccaridi K4 e K5 per via fermentativa operando l'isolamento da brodocolture di *Escherichia coli* secondo la presente invenzione, saranno maggiormente illustrati nel corso della seguente descrizione. I ceppi di *Escherichia coli* atti alla produzione del K4 o del K5 possono essere reperiti presso collezioni pubbliche quali International *Escherichia* Centre [Danimarca], ATCC [American Type Culture Collection - USA], DSM [Deutsche Sammiung von Mikroorganismen, Federal Republic of Germany] e altre. Alternativamente ceppi di *E. coli* produttori di K4 o di K5 possono essere ottenuti tramite isolamento da reperti clinici e

successiva caratterizzazione come riportato in letteratura [Eur. J. Biochem. **177**, 112-124, 1988].

Nella sperimentazione della presente invenzione sono stati impiegati i seguenti ceppi:

E. coli O5:K4:H4 reperibile presso l'ATCC numero 23502, per la preparazione del K4;

E. coli O10:K5:H4 reperibile presso l'ATCC numero 23506, per la preparazione del K5.

Questi ceppi presentano le seguenti caratteristiche (+ = positivo e - = negativo):

Reazione/Enzima	**Substrato**	**E. coli O10:K5:H4**	**E. coli O5:K4:H4**
β-galattosidasi	O-nitrofenil-galattoside	+	+
arginina deidrolasi	arginina	-	-
lisina decarbossilasi	lisina	+	+
***ornitina* decarbossilasi**	ornitina	-	-
utilizzazione citrato	sodio citrato	-	-
produzione H_2S	sodio tiosolfato	-	-
ureasi	urea	-	-
triptofano deaminasi	triptofano	-	-
produzione di indolo	triptofano	+	+
produzione di acetoina	sodio piruvato	-	-
gelatinasi	gelatina	-	-
fermentazione glucosio	glucosio	+	+
fermentazione-ossidazione (altri S)	mannitolo	+	+
fermentazione-ossidazione	inositolo	-	-
fermentazione-ossidazione	sorbitolo	+	+
fermentazione-ossidazione	ramnosio	+	+
fermentazione-ossidazione	saccarosio	-	-
fermentazione-ossidazione	melibiosio	+	+
fermentazione-ossidazione	amigdalina	-	-
fermentazione-ossidazione	arabinosio	+	+
citocromo-ossidasi	tetrametilparafenildiamina	-	-
produzione di NO_2	glucosio	+	+
riduzione da NO_2ad N_2	glucosio	+	+

Le condizioni di fermentazione in coltura sommersa possono variare in funzione delle caratteristiche dei ceppo impiegato. Operando secondo la presente invenzione, la temperatura di fermentazione è compresa fra 30 e 40°C, e preferibilmente è 37°C, mentre il tempo è compreso fra 2 e 24 ore. Per quanto riguarda il mezzo colturale noi abbiamo trovato che la resa di fermentazione del K4 e del K5 nella forma extracellulare risulta particolarmente elevata impiegando come mezzo di coltura un mezzo acquoso contenente quali ingredienti farina di soia degrassata (0,1-5 g/l) oppure la porzione dializzata di autolisato di lievito (da 5 a 30 g/l) (10 g vengono disciolti in 50 ml e dializzati contro 500 ml di acqua), sali minerali e glucosio.

Il contenuto di detti sali minerali e glucosio è il seguente: da 5 a 15 g/l di K_2HPO_4, da 0,5 a 5 g/l di KH_2PO_4, da0,01 a 1 g/l di $MgCl_2$, da 0,05 a 2 g/l di citrato di sodio, da 0,1 a 3 g/l di solfato di ammonio e da 0,5 a 4 g/l di glucosio.

Al termine della fermentazione si effettua la separazione delle cellule dalla miscela colturale preferibilmente per centrifugazione. Il filtrato colturale viene successivamente concentrato fino a 1/4 - 1/5 del volume iniziale ad esempio per mezzo di ultrafiltrazione a flusso tangenziale o impiegando membrane piane o spiralate con diverso taglio molecolare (8.000-300.000 D).

La precipitazione del polisaccaride K4 oppure K5 viene effettuata a 4°C overnight, impiegando 4-5 volumi di solvente (etanolo al 96% o isopropanolo o acetone) per volume di filtrato colturale concentrato. Il precipitato raccolto per esempio per centrifugazione, disciolto in

opportuno tampone, viene sottoposto a deproteinizzazione enzimatica, impiegando una proteasi fungina (per esempio Protease Type XXIII: fungal crude da *Aspergillus oryzae*).

La successiva purificazione del polisaccaride viene effettuata tramite passaggio attraverso colonna a scambio ionico seguito da uno o più stadi di dialisi, per esempio per ultrafiltrazione contro acqua distillata, e successive riprecipitazioni con etanolo. Normalmente sono sufficienti due cicli di dialisi e precipitazione per ottenere il polisaccaride in forma sufficientemente pura. Il campione può venire successivamente disidratato secondo le tecniche tradizionali quali liofilizzazione, trattamento con solventi ed essiccamento.

A scopo illustrativo vengono riportati i seguenti esempi che descrivono dettagliatamente il processo dell'invenzione per la produzione dei polisaccaridi K4 e K5.

Esempio 1

Preparazione del polisaccaride K5 in beuta con farina di soia.

Per la produzione del polisaccaride K5 in beuta sono state impiegate beute da 750 ml con frangiflutto contenenti ciascuna 100 ml di mezzo di coltura.

E' stato impiegato il mezzo di coltura SD avente la seguente composizione (g/l):

farina di soia degrassata (PROVABIS Prodotti Gianni, Milano): 2,0,

K_2HPO_4: 9,7,

KH_2PO_4: 2,0,

$MgCl_2$: 0,1,

citrato di sodio: 0,5,

solfato di ammonio: 1,0,

glucosio: 2,0,

acqua di fonte: 1.000 ml, pH 7,3, sterilizzazione a 118°C per 20 min.

La soluzione di glucosio è stata preparata separatamente, sterilizzata a 115°C per 30 min e addizionata sterilmente al terreno colturale.

Ogni beuta è stata inoculata a partire da una sospensione cellulare proveniente da uno slant di TSA (Tryptic Soy Agar) incubato a 37°C per 24 h. Le beute sono state poste ad incubare con agitatore alternativo (6 cm di corsa, 160 cpm) a 37°C per 24 h e sono stati effettuati prelievi di campioni a tempi diversi. Lo sviluppo microbico è stato valutato mediante conta diretta al microscopio ottico impiegando la camera di Bürker.

A fine fermentazione è stato effettuato un trattamento termico (80°C per 10 min) al fine di inattivare le componenti enzimatiche eventualmente presenti.

Isolamento del polisaccaride K5

La brodocoltura ottenuta mediante la fermentazione descritta è stata sottoposta a centrifugazione a 10.000 rpm al fine di separare le cellule dal filtrato colturale.

Allo scopo di isolare il polisaccaride dal filtrato colturale sono state eseguite le seguenti operazioni:

Concentrazione

Il filtrato colturale (1.000 ml) è stato sottoposto a concentrazione per ultrafiltrazione impiegando membrane con cut-off 8.000- 10.000 D, fino

ad un volume finale pari a circa 1/5 del volume iniziale (200 ml). In questa fase possono essere impiegati diversi tipi di moduli filtranti, in particolare in questa preparazione è stata utilizzata una cella *Minitan* (Millipore) con membrane piane in polisulfone (PTCG).

Precipitazione

Il polisaccaride K5 è stato precipitato mediante aggiunta di 4 volumi (800 ml) di etanolo al 96% a 4°C per una notte. Il polisaccaride K5 presenta una naturale tendenza a sedimentare rendendo quindi possibile la separazione della maggior parte del surnatante per sifonamento; il precipitato residuo è stato quindi separato per centrifugazione a 10.000 rpm per 20 min. Queste condizioni sono state adottate in tutte le successive fasi di precipitazione.

Deproteinizzazione

Il precipitato è stato sottoposto a deproteinizzazione enzimatica impiegando una proteasi fungina (Protease Type XXIII: fungal crude from *Aspergillus oryzae* 3,2 U/mg, cod.4755, Sigma) adottando le seguenti condizioni:

- il precipitato è stato sciolto in 45 ml di una soluzione di NaCl 0,1 M-EDTA 0,15 M a pH 8, contenente sodio dodecilsolfato (SDS) allo 0,5% (p/v);
- addizione di 4 U di proteasi per litro di filtrato colturale iniziale e termostatazione a 37°C per 90 min;
- dialisi mediante ultrafiltrazione (2 cicli), impiegando la cella *Minitan*, con 50 ml di acqua distillata;
- precipitazione con etanolo.

Precipitazione

La purificazione è stata effettuata mediante due cicli di estrazione con 30 ml di NaCl 1 M, successiva dialisi per UF con 50 ml di acqua distillata e precipitazione con etanolo.

Il precipitato ottenuto dalla seconda precipitazione è stato sciolto in H_2O e sottoposto a cromatografia a scambio ionico su colonna DEAE, lavando la colonna con 1 volume di NaCl 0,4 M e separando il polisaccaride con 1 volume di NaCl 0,6 M.

La resa di fermentazione in K5 purificato è di circa 850 mg/l.

Caratteristiche del K5

I campioni ottenuti al termine della purificazione sono stati sottoposti ad analisi secondo le seguenti procedure e con i seguenti risultati.

Contenuto di acidi uronici circa 40% determinato impiegando il metodo del carbazolo (Bitter *et al.*, Anal. Biochem. **4**, 330-334, 1962).

Spettrometria ^{13}C NMR:

· Varian Gemini 200 operante a 50,3 Mhz a 22°C impiegando TSP come standard;

· campione 50 mg/ml in D_2O

Gli spettri del polisaccaride prodotto sono risultati analoghi agli spettri relativi al polisaccaride K5 riportati in letteratura.

Sono stati in particolare evidenziati i principali segnali relativi all'N-acetilglucosammina e all'acido D-glucuronico legato in sequenza.

Valutazione del peso molecolare mediante cromatografia HPLC ad esclusione molecolare:

- colonna: (1 x 30 cm) Superdex 75 HR (Pharmacia)

- eluente: tampone fosfato 0,1 M, pH 7 addizionato di NaCl 0,15 M
- flusso: 1 ml/min
- detector: UV a 210 nm
- campione: 20 µl di una soluzione 2 mg/ml.

Il polisaccaride è risultato costituito da due componenti: una con PM apparente di circa 16.000 D (70%) e l'altra con PM 5.000 D (30%).

Esempio 2

Preparazione del polisaccaride K5 in beuta con autolisato di lievito dializzato.

Per la produzione del polisaccaride K5 in beuta sono state impiegate beute da 750 ml con frangiflutto contenenti ciascuna 100 ml di mezzo di coltura.

E' stato impiegato il mezzo di coltura AL avente la seguente composizione (g/l):

autolisato di lievito : 10,0 (10,0 g vengono disciolti in 50 ml e dializzati contro 500 ml di acqua), K_2HPO_4 9,7;

KH_2PO_4 2,0,

$MgCl_2$ 0,1,

citrato di sodio 0,5,

solfato di ammonio 1,0,

glucosio 2,0,

acqua di fonte: 1000 ml, pH 7,3, sterilizzazione a 118°C per 20 min.

La soluzione di glucosio è stata preparata separatamente, sterilizzata a 115°C per 30 min e addizionata sterilmente al terreno colturale.

Ogni beuta è stata inoculata a partire da una coltura sommersa di

preinoculo in beuta (10%), ottenuta inoculando una sospensione cellulare proveniente da uno slant di TSA (Tryptic Soy Agar) incubato a 37°C per 24 h. Le beute sono state poste ad incubare con agitatore alternativo (6 cm di corsa, 160 cpm) a 37°C per 24 h e sono stati effettuati prelievi di campioni a tempi diversi. Lo sviluppo microbico è stato valutato mediante conta diretta al microscopio ottico impiegando la camera di Bürker.

A fine fermentazione è stato effettuato un trattamento termico come riportato nell'esempio 1.

La separazione del polisaccaride è stata effettuata con lo stesso procedimento utilizzato nell'esempio 1.

Concentrazione

La concentrazione del filtrato colturale è stata effettuata come nell'esempio 1.

Precipitazione

La precipitazione del polisaccaride è stata condotta nelle medesime condizioni dell'esempio I.

Deproteinizzazione

La deproteinizzazione è stata condotta nelle medesime condizioni dell'esempio I.

Purificazione

La purificazione è stata condotta nelle medesime condizioni dell'esempio 1.

La resa di fermentazione in K5 purificato è di circa 780 mg/l.

I campioni di K5 ottenuti hanno presentato un contenuto in acidi uronici

dosati con il metodo del carbazolo di circa 40%

Il polisaccaride è risultato costituito da due componenti: una con PM apparente di circa 16.000 D (70-80%) e l'altra con PM 5.000 D (20-30%).

Esempio 3

Preparazione del polisaccaride K5 in fermentatore.

La preparazione è stata effettuata in fermentatore automatizzato da 14 L con volume utile di 10 L (Chemap-Braun, Melsungen, Germania). E' stato impiegato il mezzo di coltura SD avente la stessa composizione riportata nell'esempio I.

Sono state adottate le stesse condizioni di fermentazione dell'esempio 1, con inoculo pari al 10% (v/v) proveniente da una coltura sommersa di 24 h allestita in beuta impiegando lo stesso mezzo colturale, con aerazione 1 vvm (volume per volume per minuto), agitazione 400 rpm, temperatura 37°C, tempo di fermentazione fino a 24 h.

Nel corso della fermentazione sono stati valutati i seguenti parametri:

- andamento del pH
- andamento dell'ossigeno disciolto
- glucosio residuo
- polisaccaride prodotto
- sviluppo microbico

A fine fermentazione è stato effettuato un trattamento termico (80°C per 10 min) al fine di inattivare le componenti enzimatiche eventualmente presenti.

La separazione del polisaccaride è stata effettuata con lo stesso

procedimento utilizzato nell'esempio I. Il filtrato colturale (10 L) è stato sottoposto a concentrazione per ultrafiltrazione impiegando membrane con cut off 8.000 e 10.000 D, fino ad un volume finale pari a circa 2 L utilizzando un modulo SS 316 (MST, Gallarate, Varese) con membrane spiralate di natura polimerica (PES).

Il polisaccaride è stato precipitato mediante aggiunta di 4 volumi di etanolo a 4°C per una notte e quindi separato dal surnatante per centrifugazione a 10.000 rpm per 20 min.

Per la deproteinizzazione è stata utilizzata la stessa proteasi fungina dell'esempio 1, sciogliendo il precipitato in 450 ml di tampone di reazione e procedendo nelle medesime condizioni dell'esempio 1 e utilizzando il modulo SS 316 e 500 ml di acqua distillata per l'ultrafiltrazione.

I campioni di K5 ottenuti a 24 h presentano un contenuto di circa il 70-80% del componente a 16.000 D e circa il 20-30% di quello a 5.000 D.

Resa: 820 mg/l.

Esempio 4

Preparazione del polisaccaride K4 in beuta.

La preparazione del polisaccaride K4 è stata effettuata impiegando il terreno SD nelle medesime condizioni dell'esempio 1 controllando durante la fermentazione i medesimi parametri.

A fine fermentazione è stato effettuato un trattamento termico (80°C per 10 min) al fine di inattivare le componenti enzimatiche eventualmente presenti.

L'isolamento del polisaccaride è stato effettuato come nell'esempio I.

Concentrazione

La concentrazione del filtrato colturale è stata effettuata come nell'esempio 1 utilizzando per la filtrazione una membrana da 300.000 D.

Precipitazione

La precipitazione del polisaccaride è stata condotta nelle medesime condizioni dell'esempio I.

Deproteinizzazione

La deproteinizzazione è stata condotta nelle medesime condizioni dell'esempio I.

Purificazione

La purificazione è stata effettuata mediante due cicli di estrazione con 30 ml di NaCl 1 M, successiva dialisi per UF con 50 ml di acqua distillata e precipitazione con etanolo.

Il precipitato ottenuto dalla seconda precipitazione è stato sciolto in H_2O e sottoposto a cromatografia a scambio ionico su colonna DEAE, lavando la colonna con 1 volume di NaCl 0,4 M e separando il polisaccaride con 1 volume di NaCl 0,6 M.

La resa di fermentazione in K4 purificato è di circa 400 mg/L.

Caratterizzazione del K4

I campioni ottenuti al termine della purificazione sono stati sottoposti ad analisi secondo le seguenti procedure e con i seguenti risultati.

- Contenuto di acidi uronici: circa 25% determinato impiegando il metodo del carbazolo (Bitter *et al.*, Anal. Biochem. 4, 330-334, 1962).
- Contenuto di fruttosio: circa 14,1% determinato impiegando il test

enzimatico per il fruttosio (esochinasi/fosfoglucoisomerasi/glucosio-6-fosfato deidrogenasi/NADP Kit, Boehringer, Mannheim, Germania), previa idrolisi del K4 (acido trifluoroacetico 0,1 M a 100°C per 30 min).

- Contenuto di galattosammina: circa 23% determinato impiegando il reattivo di Elson-Morgan previa idrolisi del K4 (HCl 4M a 100°C per 18 h).
- Spettrometria ^{13} C-NMR

  Varian Gemini 200 operante a 50,3 Mhz a 22°C impiegando TSP come standard.

  Campione 50 mg/ml in NaCl 1 M.

Gli spettri del polisaccaride prodotto sono risultati analoghi agli spettri relativi al polisaccaride K4 riportati in letteratura.

Sono stati infatti evidenziati i segnali relativi all'N-acetilgalattosammina e all'acido glucuronico legati in sequenza e al fruttosio legato in catena laterale all'acido glucuronico.

Valutazione del peso molecolare per cromatografia HPLC ad esclusione molecolare:

colonna: (1 x 30 cm) Superdex 75 HR (Pharmacia)

eluente: tampone fosfato 0,1 M, pH 7 addizionato di NaCl 0,15 M

flusso: 1 ml/min

detector: UV a 210 nm

campione: 20 µl di una soluzione 2 mg/ml.

Il polisaccaride è risultato costituito da una sola componente con PM apparente di circa 300.000 D.

Esempio. 5

Preparazione del polisaccaride K4 in fermentatore.

La preparazione è stata effettuata in fermentatore automatizzato da 14 L, volume utile 10 L (Chemap-Braun, Melsungen, Germania).

E' stato impiegato il mezzo di coltura SD avente la stessa composizione riportata nell'esempio I.

Sono state adottate le seguenti condizioni di fermentazione: inoculo 10% (v/v) proveniente da una coltura sommersa di 24 h allestita in beuta impiegando lo stesso mezzo colturale dell'esempio 1, aerazione 1 vvm (volume per volume per minuto), agitazione 400 rpm, temperatura 37°C, tempo di fermentazione fino 24 h.

L'isolamento e la purificazione del polisaccaride sono stati condotti come nell'esempio 3, utilizzando per la concentrazione membrane da 300.000 D. Resa: 420 mg/L.

Rivendicazioni

I. Processo per la preparazione dei polisaccaridi K4 e K5 comprendente:

a) fermentazione in coltura sommersa di un ceppo di *Escherichia coli* produttore del polisaccaride K4 oppure di un ceppo di *Escherichia coli* produttore del polisaccaride K5;

b) centrifugazione della brodocoltura, concentrazione tramite ultrafiltrazione del filtrato colturale e precipitazione del polisaccaride;

c) dissoluzione del precipitato e trattamento con proteasi;

d) passaggio attraverso colonna a scambio ionico seguito da dialisi e riprecipitazione,

caratterizzato dal fatto che il mezzo colturale per detta fermentazione è costituito da una miscela acquosa comprendente farina di soia degrassata, sali minerali e glucosio oppure comprendente la porzione dializzata di autolisato di lievito, sali minerali e glucosio.

2. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detti sali minerali sono costituiti da K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgCl_2$, citrato di sodio e solfato di ammonio.

3. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto mezzo colturale è costituito da una miscela acquosa comprendente da 0,1 a 5 g/l di farina di soia degrassata oppure da 5 a 30 g/l della porzione dializzata di autolisato di lievito, da 5 a 15 g/l di K_2HPO_4, da 0,5 a 5 g/l di KH_2PO_4, da 0,01 a 1 g/l di $MgCl_2$, da 0,05 a 2 g/l di citrato di sodio, da 0,1 a 3 g/l di solfato di ammonio e da 0,5 a 4 g/l di glucosio.

(PIC/pd)