



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00446**

(22) Data de depozit: **13.06.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27.02.2015** BOPI nr. **2/2015**

(66) Prioritate internă:

28.09.2007 RO a 2007 00678

(41) Data publicării cererii:

30.12.2009

BOPI nr. **12/2009**

(73) Titular:

• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF, CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CENTRUL DE EXCELENȚĂ DE BIOCHIMIE APLICATĂ ȘI BIOTEHNOLOGIE (BIOTEHNOL), BD.MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

• **CERCEL MARIA, STR.CHOPIN NR.40, SC.B, AP.7, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **LUPESCU IRINA, STR.PREVEDERII NR.15 A, BL.C 1, SC.A, ET.2, AP.9, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MOSCOVICI MIȘU, STR.JEAN STERIADI NR.7, BL.122, SC. B, ET.2, AP.16, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **EREMIA MIHAELA-CARMEN, STR.CÂMPIA LIBERTĂȚII NR.29, BL.B 6, SC.4, ET.2, AP.127, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **SĂVOIU GABRIELA,**

STR. PROF. MOISE NICOARĂ NR.41, BL.D 3, SC.C, ET.4, AP.113, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• **SPIRIDON MARIA, ALEEA FUIORULUI NR.2, BL.Y 3 B, SC.3, AP.117, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **COJANU ANGELA, ȘOS.MIHAI BRAVU NR.116, BL.D 5, SC.1, ET.9, AP.57, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **DOBRA MIHAELA, BD.ALEXANDRU OBREGIA NR.7 A, BL.12 B, SC.1, ET.8, AP.30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **NICULESCU FLOAREA, STR.LUNCA BRADULUI NR.6, BL.M 31, SC.A 1, ET.10, AP.60, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

C.MARANGONI, A.FURIGO JR., G.M.F.ARAGÃO, "THE INFLUENCE OF SUBSTRATE SOURCE ON THE GROWTH OF RALSTONIA EUTROPHA, AIMING AT THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATE", BRAZ. J. CHEM. ENG., VOL.18, NR.2, SAO PAULO, IUNIE 2001; JP 5023189 A; KR 20040046678 (A)

(54)

PROCEDEU DE OBTINERE A POLIMERILOR BIODEGRADABILI PE CALE MICROBIOLOGICĂ

Examinator: **biochimist EREMA LAURA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 125102 B1

Prezenta invenția se referă la un procedeu de obținere pe cale microbiologică a polimerilor biodegradabili (polihidroxi-*alcanoati*) în cantități și la randamente de interes bioteh-nologic, cu ajutorul unui microorganism denumit *Ralstonia eutropha* DSM 545.

Din literatură, se cunoaște o creștere susținută a preocupării comunității științifice cu privire la obținerea de polihidroxi-*alcanoati* (PHA) pe cale microbiologică. Acești polihidroxi-*alcanoati* sunt materiale termoplastice cu un grad mare de polimerizare. Aceste materiale sunt biodegradabile, biocompatibile, lipsite de toxicitate, înalt cristaline, optic active, izotactice, piezoelectrice, insolubile în apă. Acestea reprezintă alternativa ecologică a polimerilor sintetici.

Liderul mondial în obținerea de polihidroxi-*alcanoati* pe cale microbiologică (cu bacterii sau, mai recent, direct din plante), este compania Metabolix Inc., Massachusetts, S.U.A. Această companie aplică, în mod permanent, metodele cele mai avansate de inginerie metabolică și biologie moleculară pentru producerea, cât mai eficientă, de materiale plastice de tip PHA, Peoples Oliver P. *Metabolic engineering of knives forks and spoons*. Metabolix Inc. MEWG, Metabolix Inc., February 3, 2005, și Miller Marcia. Metabolix Inc. President honored by American Chemical Society. Press Release, September, 2003.

Obținerea polihidroxi-*alcanoatilor* are loc la scară de laborator sau la scară industrială, în sistem discontinuu (batch) sau în sistem continuu (fed-batch). Sistemul continuu este mai productiv decât cel discontinuu, dar necesită instalații adecvate și dotări speciale, Lafferty, Robert M., *Process for biotechnological preparation of poly-d(-)-3-hydroxybutyric acid*. Brevet **US 4786598**/1988 și Ramsay Bruce A., Kanda Lomaliza, Claude Chavarie, Brigitte Dube, Pierre Bataille, Juliana A. Ramsay. Production of poly-(β-hydroxybutyric- Co- (β-hydroxyvaleric) acids, Applied and Environmental Microbiology, July, 1990, pp. 2093...2098.

Cel mai comun tip de PHA produs de către microorganisme este poli-3-hidroxibutiratul, un homopolimer cu catenă scurtă, denumit și poli-D(-)-3-acid hidroxibutiric, P(3HB) sau PHB. Acesta este produs de către unele microorganisme heterotrofe, în cultivări de tip discontinuu sau continuu.

În obținerea de polihidroxi-*alcanoati*, se utilizează: microorganisme modificate genetic prin inginerie genetică, cum ar fi, de exemplu, superbacteria *Escherichia coli* K-12, microorganisme care au încorporate mai multe gene pentru producerea dirijată de PHA de interes, microorganisme stabile genetic, generații succesive pe tot parcursul fluxului continuu, fără a fi nevoie de noi selecții; microorganisme stabile genetic; plante modificate genetic, alimentare sau non-alimentare.

Printre microorganisme, *Ralstonia eutropha* crește bine în medii minerale, la temperatura de 30°C, pe o multitudine de surse de carbon. Alte denumiri ale acestui microorganism sunt următoarele: *Hydrogenomonas eutropha*, *Wautersia eutropha*, *Cupriavidus necator* și *Alcaligenes eutrophus*.

Ralstonia eutropha DSM 428 (H16) este microorganismul ales de I. C. I. (*Imperial Chemical Industries-Agricultural Division*), pentru producerea comercială de polihidroxi-butirat-copolihidroxi-*alcanoat* (PHB/HV, PHBV, P(3HB-3HV) din glucoză și acid propionic, în condiții de limitare prin azot. Acest co-polimer are calități îmbunătățite față de PHB. Denumirea comercială a acestui copolimer este Biopol.

The influence of substrate source on the growth of Rolstonia eutropha, aiming at production of polihydroxyalkanoate, C. Marangoni, A. Furigo Jr, G. M. F. Aragão, *Braz. J. Chem. Eng.*, vol. 18, nr. 2, 2001, (http://www.scielo.br/scielo.php?scrip=sci_arttext&pid=S0104-66322001000200005)-prezintă un studiu al influenței temperaturii, a sursei de carbon și a sursei de azot din mediu de cultură asupra producției de polihidroxi-*alcanoati* în prezența microorganismului *Ralstonia eutropha* DSM545. Experimentele s-au realizat la 30 și la 34°C, la pH=7 și 150 rpm.

JP 5023189 A (02.02.1993) <i>Production of de polyester copolymer</i> , descrie cultivarea bacteriei <i>Alcaligenes eutrophus</i> H16 (ATCC 17699) pe un mediu în care se alimentează	1
continuu un nutrient care cuprinde gamma-butirolactonă și fructoză, drept sursă de carbon	3
și având un raport C/N cuprins între 8 și 45.	
KR 20040046678 A (05.06.2004) <i>Microorganism producing poly-beta-hydroxy butyric acid (PHB) and proces for producing PHB using the same</i> se referă la cultivarea în mediu	5
de fermentație discontinuă a unui microorganism <i>Ralstonia Eutropha</i> (KTC 10351 BP), pe	7
un mediu care conține glucoză, fructoză și sirop bogat în fructoză. Raportul C/N este	
menținut între 15 și 25, timp de 48 h, de fermentație discontinuă, iar după 48 h, raportul C/N	9
este menținut între 25 și 35, în prezență de hidroxid de sodiu.	
Atunci când sursa de carbon este glucoza, <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIB 11599	11
produce o cantitate de 5,08 g/l PHA, cu un conținut de PHA de 54% față de biomasa uscată.	
<i>Alcaligenes eutrophus</i> ATCC 33500 produce, de asemenea, pe glucoză o cantitate de	13
4,16 g/l PHA, cu un conținut de PHA de 60% față de biomasa uscată Tabandeh Fatemeh,	
Ebrahim Vasheghani-Farahani. <i>Biosynthesis of poly-β-hydroxybutyrate as a biodegradable</i>	15
<i>polymer, Iranian polymer Journal</i> , 12 (1). 2003, pp. 37...42.	
<i>Ralstonia eutropha</i> nu crește pe glucoză, dar <i>Ralstonia eutropha</i> DSM 545, un	17
mutant de <i>Ralstonia eutropha</i> DSM 529, prezintă capacitatea de a utiliza glucoza. Atunci	
când sursa de carbon este glucoza (1%), în condițiile: suplimentării acesteia cu bulion de	19
fasole boabe negre care conține carbohidrați, proteine, fibre, calciu, fier, magneziu, potasiu,	
zinc, cupru, a aerării culturii prin agitare la 160 rpm, timp de 48...52 h și a dezvoltării culturii	21
la temperatura de 30°C, bacteria <i>Ralstonia eutropha</i> (<i>Cupriavidus necator</i>) DSM 545 pro-	
duce, la sfârșitul cultivării, o concentrație de PHB de la 0,23 g/l, (reprezentând 34% din greu-	23
tatea uscată a celulelor) până la 2,06 g/l (reprezentând 76% din greutatea uscată a	
celulelor). Autorii au notat faptul că biosinteza PHB are loc simultan cu acumularea de	25
biomasă. Dar chiar dacă randamentul de obținere de PHB din biomasa uscată este de 76%,	
concentrațiile celulare și de PHA rămân mici (Finkler L., J. C. Pinto, T. L. Alves, <i>Use of</i>	27
<i>bioproducts of the bean industry for polyhydroxyalkanoate production</i> , 2 nd Mercosur	
Congress on Chemical Engineering, 2 nd Mercosur Congress on Systems Engineering. pp.	29
1...8).	
Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere	31
a polimerilor biodegradabili, polihidroxiialcanoati, de tip polihidroxibutirat, cu ajutorul micro-	
organismului <i>Ralstonia eutropha</i> DSM 545	33
Procedeu de obținere a polimerilor biodegradabili, polihidroxiialcanoati, de tip	
polihidroxibutirat, cu ajutorul microorganismului <i>Ralstonia eutropha</i> DSM 545, conform	35
invenției, constă în etapele prin care microorganismul se antrenează de 2...6 ori pe un mediu	
de cultură care conține 1,5 g% glucoză, 0,075 g% sulfat de amoniu, 0,39 g% fosfat disodic,	37
0,15 g% fosfat monopotasic, 0,02 g% sulfat de magneziu, 0,002 g% clorură de calciu, 0,005	
g% citrat de amoniu și fier, 0,41 ml% soluție de microelemente și 0,2 g% carbonat de calciu,	39
iar apoi se cultivă pe același mediu de cultură, atât etapa de antrenare, cât și de cultivare a	
microorganismului, având loc la temperatura de 30...34°C, la un pH inițial cuprins între 6, 8	41
și 7, în condiții de aerare, prin agitare, pe un agitator rotativ cu o excentricitate de 2 cm, după	
48 h de cultivare, rezultând o cantitate de biomasă cuprinsă între 5,7 și 11,3 g/l, o	43
concentrație de polihidroxiialcanoati cuprinsă între 4,71 și 8,6 g/l, și un conținut de	
polihidroxibutirat, raportat la biomasa uscată, cuprinsă între 76,19 și 92%.	45
Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:	
- polihidroxiialcanoati sunt materiale termoplastice cu un grad mare de polimerizare;	47

1 - aceste materiale sunt biodegradabile, biocompatibile, lipsite de toxicitate, înalt
cristaline, optic active, izotactice, piezoelectrice, insolubile în apă;

3 - reprezintă alternativa ecologică a polimerilor sintetici.

În ce privește mediul de cultură pentru *Ralstonia eutropha* DSM 545, Catalogul
DSM/1998 descrie, pentru acest microorganism, următoarele medii: mediul 1 (agarul nutritiv,
utilizabil pentru întreținerea culturii) și mediul 81, utilizabil pentru dezvoltarea: chimiolito-
trofică (în atmosferă de 2% O₂, 10% CO₂, 60% H₂ și 28% N₂, v/v), heterotrofică (în prezență
de minerale și un carbohidrat 0,2% sau un acid organic 0,1%) sau pe un mediu lipsit de azot,
în atmosferă de 2% O₂, 10% CO₂, 10% H₂ și 78% N₂(v/v) sau în atmosferă de 2% O₂ și 98%
N₂ (v/v). Dezvoltarea microorganismului pe aceste medii are loc la temperatura de 30°C,
Catalogue of strains DSMZ, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*
GmbH, Sixth edition, 1998, *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) DSM 545, Medium
1 or 81: p. 138, Medium 1: p. 307, Medium 81: p. 311.

În ce privește cultivarea bacteriei *Alcaligenes latus* DSM 1123, în anul 1988, Lafferty
descrie următorul mediu de cultură: zaharoză 1,5 g%, (NH₄)₂SO₄ 0,15 g%, Na₂HPO₄·2H₂O
0,45 g%, KH₂PO₄ 0,15 g%, MgSO₄·7H₂O 0,02%, CaCl₂·2H₂O 0,002%, citrat de Fe III NH₄
0,005 g% și pH=7. Soluția de microelemente are următoarea compoziție: ZnSO₄·7H₂O 100
mg/l, MnCl₂·4 H₂O 30 mg/l, H₃BO₃ 300 mg/l, CoCl₂·6 H₂O 200 mg/l, CuSO₄·5H₂O 10 g/l,
NiCl₂·6H₂O 20 mg/l, NaMoO₄·2H₂O 30 mg/l și apă un litru. Într-o cultivare continuuă de trei
săptămâni, care se desfășoară la 37°C și pH=7, pe tot parcursul cultivării cu acest micro-
organism (*Alcaligenes latus* DSM 1123) și cu această sursă de carbon (zaharoză 1,5 g%),
se realizează un conținut de 71...79% PHB, raportat la biomasa uscată.

În ce privește costurile de producție al polihidroxialcanoatilor pe glucoză, se
estimează că acestea sunt de 8...10 cenți/libră (452 g), comparativ, costurile de producție
de PHA pe uleiuri vegetale care sunt de două ori mai mari, și anume, de 15...20 cenți/libră
(Peoples Oliver P., *Metabolic engineering of knives forks and spoons*, Metabolix Inc. MEWG,
Metabolix Inc., February 3, 2005, 19 pages).

În continuare, se prezintă următoarele 4 exemple de realizare.

Exemplul 1. Bacteria *Ralstonia eutropha* DSM 545 este mai întâi antrenată, de
2...3 ori, pe același mediu mineral, conținând glucoza și în aceleași condiții de cultivare ca
și cele pentru obținerea de PHA. Antrenarea și cultivarea discontinuă a bacteriei au loc pe
un mediu de cultură DSM, utilizat ca martor, în care raportul sursă de carbon : sursă de azot
este de 10:1, în care zaharoza a fost înlocuită cu glucoză, restul ingredientelor rămânând la
fel. Compoziția mediului de cultură este următoarea: glucoză 1,5 g (NH₄)₂SO₄, 0,15 g
Na₂HPO₄·2H₂O 0,45 g, KH₂PO₄ 0,15 g, MgSO₄·7H₂O 0,02 g, CaCl₂·2H₂O 0,002 g, citrat de
amoniu și fier 0,005 g, soluție de microelemente 0,2 ml% și apă de robinet 100 ml. Soluția
de microelemente conține: H₃BO₃ 0,3 g, CoCl₂·6H₂O 0,2 g, ZnSO₄·7H₂O 0,1 g, MnCl₂·4H₂O
30 mg, NaMoO₄·2H₂O 30 mg, NiCl₂·6H₂O 20 mg, CuSO₄·5H₂O 10 mg și apă distilată 1000
ml. Condițiile de cultivare au fost următoarele: temperatura: 30...34°C, pH-ul inițial = 6,8...7,
aerarea prin agitare pe un agitator rotativ cu 220 rpm și 2 cm excentricitatea agitatorului. La
sfârșitul celor 48 h de cultivare, principalele rezultate sunt următoarele: biomasa uscată 3,98
g/l, PHA 1,90 g/l, conținut de PHA, raportat la biomasa uscată, de 47,73%.

Exemplul 2. Bacteria *Ralstonia eutropha* DSM 545 este mai întâi antrenată de 2-3
ori pe un același mediu și în aceleași condiții de cultivare ca cele pentru obținerea de PHA.
Antrenarea și cultivarea discontinuă au loc pe un mediu de cultură ICCF, la care raportul
sursă de carbon:sursă de azot este de 20:1. Mediul are următoarea compoziție: glucoză
1,5 g, (NH₄)₂SO₄ 0,075 g, Na₂HPO₄·2H₂O 0,39 g, KH₂PO₄ 0,15 g, MgSO₄·7H₂O 0,02 g,
CaCl₂·2H₂O 0,002 g, citrat de amoniu și fier, 0,005 g, microelemente 0,41 ml, carbonat de

RO 125102 B1

calciu 0,2 g, apă de robinet, 100 ml. Soluția de microelemente conține: H_3BO_3 0,3 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, apă distilată 1000 ml. Condițiile de cultivare au fost următoarele: temperatura: 30...34°C, pH inițial = 6,8...7, aerarea prin agitare pe un agitator rotativ cu 220 rpm și 2 cm excentricitatea agitatorului. La sfârșitul celor 48 h de cultivare, principalele rezultate sunt următoarele: biomasa uscată 5,708 g/l, PHA = 4,71 g/l, conținut de PHA raportat la biomasa uscată = 82,63%.

Exemplul 3. Bacteria *Ralstonia eutropha* DSM 545 este mai întâi antrenată de 4...6 ori pe același mediu și în aceleași condiții de cultivare ca cele pentru obținerea de PHA. Antrenarea și cultivarea bacteriei au loc pe același mediu de cultură ICCF, ca în exemplul 2. Condițiile de cultivare sunt cele prezentate în exemplul 2. La sfârșitul celor 48 h de cultivare, principalele rezultate privind biomasa uscată, conținutul de PHA și conținutul de PHA, raportat la biomasa uscată, sunt următoarele: biomasa uscată 11,30 g/l, PHA = 8,60 g/l, conținutul de PHA raportat la biomasa uscată = 76,10%.

Exemplul 4. Prin antrenarea bacteriei *Ralstonia eutropha* DSM 545 și cultivarea acesteia pe mediul de cultură descris în exemplele 2 și 3, s-a atins un conținut de PHA, raportat la biomasa uscată, de 92%, în aceleași condiții de cultivare. Spectrele IR efectuate au confirmat producerea de PHB prin procedeul descris de invenție.

1

Revendicare

3

5

7

9

11

13

Procedeu de obținere de polimeri biodegradabili, polihidroxi-
alcanoati, de tip poli-
hidroxibutirat, cu ajutorul microorganismului *Ralstonia eutropha* DSM 545, **caracterizat prin**
aceea că microorganismul se antrenează, de 2...6 ori, pe un mediu de cultură care conține
1,5 g% glucoză, 0,075 g% sulfat de amoniu, 0,39 g% fosfat disodic, 0,15 g% fosfat mono-
potasic, 0,02 g% sulfat de magneziu, 0,002 g% clorură de calciu, 0,005 g% citrat de amoniu
și fier, 0,41 ml% soluție de microelemente și 0,2 g% carbonat de calciu, iar apoi se cultivă,
pe același mediu de cultură, atât etapa de antrenare, cât și de cultivare a microorganismului,
având loc la temperatura de 30...34°C, la un pH inițial cuprins între 6,8 și 7, în condiții de
aerare, prin agitare pe un agitator rotativ cu o excentricitate de 2 cm, după 48 h de cultivare,
rezultând o cantitate de biomasă cuprinsă între 5,7 și 11,3 g/l, o concentrație de polihidroxi-
alcanoati cuprinsă între 4,71 și 8,6 g/l, și un conținut de polihidroxibutirat, raportat la biomasa
uscată, cuprins între 76,19 și 92%.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 73/2015