



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00566**

(22) Data de depozit: **29.06.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.09.2013** BOPI nr. **9/2013**

(41) Data publicării cererii:
30.12.2011 BOPI nr. **12/2011**

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

(72) Inventatori:
• **CĂȘĂRICĂ ANGELA,
STR.POPA STOICA DIN FĂRCAȘ NR.19,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IONESCU CORINA, STR.LEREȘTI NR.1,
BL.A 2, SC.4, ET.2, AP.54, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MOSCOVICI MIȘU, STR.JEAN STERIADI
NR.7, BL.I 22, SC.B, ET.2, AP.16,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GHEORGHIU ELEONORA,
STR.C.A.ROSETTI NR.25, ET.7, AP.36,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **RADU IULIA CORINA,
STR.GHEORGHE DOJA NR.9, BL.C 2,
AP.125, GALAȚI, GL, RO;**
• **SOARE MARIANA, STR.STRĂULEȘTI
NR.59, BL.B 4, ET.2, AP.11, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IONESCU ANA DESPINA,
STR.ALUNIȘULUI NR.4, BL.11 A, SC.3,
AP.99, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BOGHIU ANASTASIA, STR.BĂLȚIȚA
NR.3, BL.B 19, SC.3, AP.69, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NICOLAE LENUȚA, STR.ISTRIEI NR.12,
BL.19 D, SC.B, AP.46, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**EP 0843017 A1; EP 0850314 B1;
JP 7184677 A**

(54) **PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE OBȚINERE A CELULOZEI
BACTERIENE**



RO 126940 B1

1 Inventția se referă la un procedeu biotehnic de obținere a celulozei bacteriene cu
2 *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ pe medii de biosinteză ce conțin o sursă de carbon com-
3 pusă din produse horticoale, glicerol și etanol.

4 Se cunoaște, din EP 0843017 (A1), un procedeu pentru producerea de material
5 celulozic la o viteză de producere de 0,4 g/l/h sau mai mare, care cuprinde cultivarea de
6 celuloză producătoare de bacterii, menținând în același timp concentrația de zaharuri rez-
7 duale dintr-un bulion de cultură la 20 g/l sau mai puțin, și la un procedeu pentru producerea
8 unui material celulozic, care cuprinde cultivarea bacteriei producătoare de celuloză pe un
9 mediu de cultură care conține un factor care îmbunătățește afinitatea aparentă la substratul
10 de zaharuri.

11 EP 0850314 (B1) prezintă o celuloză microbiană cu un conținut ridicat de apă și
12 procesul de obținere a celulozei microbiene care utilizează un disc rotativ sau bioreactor
13 bandă transportoare liniară, care conțin un mediu biologic și sunt produse de către un
14 microorganism producător de celuloză.

15 Celuloza bacteriană (BC) a câștigat o atenție deosebită în diferite domenii de
16 cercetare, pentru proprietățile favorabile pe care le posedă, cum ar fi: proprietăți mecanice
17 remarcabile, porozitate, absorbția apei, plasticitate și biodegradabilitate.

18 Datorită acestor proprietăți, BC are o gamă largă de aplicații potențiale predominant
19 în domeniul biomedical, în special, pentru faptul că se deosebește structural de celuloza din
20 sursa vegetală.

21 Microorganismul clasic de producere a BC este *Acetobacter xylinum*, dar s-au făcut
22 cercetări de obținere a BC și cu alte microorganisme.

23 Gama de medii de cultură este diversă, predominant fiind folosite glucoza și sucroza
24 [WO/1997/005271].

25 O variantă a mediului de bioproces este pe bază de glucoză, extract de drojdie,
26 peptonă, săruri minerale, etanol, iar în faza productivă adăugându-se o soluție apoasă din
27 patul de cultivare a ciupercilor (după recoltarea acestora) [WO/2007/063854 (A1)]; s-au
28 folosit reziduuri lichide de la fabricarea berii [KR 2005/0022591] sau de la fabricarea
29 zahărului, alături de peptonă și etanol [RU 2141530].

30 Un proces fermentativ și continuu cu o rată de producție a materialului celulozic de
31 0,4 g/L/h și menținerea unei concentrații de zahăr în lichid de 20 g/L, precum și includerea
32 unui factor de creștere cu afinitate pentru substratul de zahăr a fost descris de brevetul
33 [US6132998 A].

34 Factorul de creștere este selectat dintr-un grup de substanțe între care intră și
35 glicerolul.

36 Brevetul JP 8056689 (A) descrie utilizarea unor hidrolizate de lână industrială, dar
37 și a unui hidrolizat din plante, alături de substanța brută nestandardizată de la industria
38 băuturilor din fructe; ca agent compensator de N, dar și ca factor de creștere este utilizată
39 peptona. În biosinteza celulozei, s-au folosit de asemenea reziduuri de brutărie și 20...100
40 mg/L saponine.

41 Un alt procedeu comunică cultivarea microorganismului *A. xylinum* pe un mediu ce
42 conține, ca sursă de carbon, sucroza și invertaza 1-1,5 unit/g de sucroză [JP 7184677 (A)].

43 US 6132998 descrie o multitudine de substanțe ca posibile surse de carbon pentru
44 obținerea de BC, între care glicerol și etanol, dar și hidrolizatul de amidon - suc de melasă
45 de la industria zahărului din sfeclă sau suc de la prelucrarea trestiei de zahăr. Ca posibile
46 surse de azot, sunt enumerate: substanțe anorganice, dar și bactopectona, extract de drojdie
47 sau extract de soia și uree.

RO 126940 B1

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție constă în prezența unui procedeu de obținere a celulozei bacteriene prin valorificarea unor produse horticoale de calitate inferioară și a unor deșeuri din industria biodieselului. 1 3

Procedeul de obținere a celulozei bacteriene, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că o tulpină de *Acetobacter xylinum* DSMZ 2004 ICCF 398 se supune unei fermentații submerse statice pe un mediu de cultură ce utilizează glucoza tehnică ca sursă de carbon, extractul de porumb ca sursă de azot, fosfatul monopotasic, acidul citric și sulfatul de magneziu ca surse minerale în fazele de preinocul și inocul, și ulterior unei faze de biosinteză prin cultivare pe un mediu care utilizează ca sursă de carbon produse horticoale care au o concentrație echivalentă glucozei de 2,5...7% și glicerol 1..2% g/v, ca sursă de azot sulfatul de amoniu 0,1...0,3%, extract de drojdie 0,03...0,05%, sulfat de magneziu 0,03...0,05%, și acidul citric 0,1...0,5%, etanol 0,8...1%, procentele sunt exprimate în volum, obținându-se celuloza bacteriană care este supusă etapei de purificare. 5 7 9 11 13

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje: 15

- diversitatea substraturilor utilizabile oferă o flexibilitate considerabilă în procesul de fabricație, folosind ca sursă de C, glicerolul sau o combinație de produse horticoale și glicerolul care este un subprodus de la industria biodieselului; 17

- produsele horticoale pot fi convertite, în mod eficient, în celuloză bacteriană, deoarece microorganismele au o biodisponibilitate mai bună asupra substratului biologic comparativ cu cel sintetic; 19 21

- necesarul de oxigen al microorganismului bacterian este redus prin alegerea tipului de bioproces în regim static, care este mai productiv din punct de vedere al biosintezei de celuloză; 23

- celuloza bacteriană obținută poate fi o alternativă benefică la celuloza forestieră (vegetală), având multiple posibilități de aplicare în domenii ca industria farmaceutică, agricultură, industria alimentară, hârtiei sau coloranților, precum și în medicină. 25 27

Prezenta invenție descrie obținerea de BC prin valorificarea unor produse horticoale nestandardizate și a unor deșeuri industriale, și, în special, glicerol, cu un adaos de etanol care accelerează biosinteza BC. Microorganismul ce stă la baza acestei tehnologii este *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ (ICCF 398). Acest microorganism este cunoscut pentru transformarea alcoolului (etanol) în acid acetic în prezența oxigenului și este sursa principală a obținerii de celuloză bacteriană. Se prezintă sub formă de celule elipsoidale sau bacili drepecți, ori ușor curbați, având dimensiunile 0,6...0,8 μm/1...4 μm. Nu formează endospori și este Gram-. 29 31 33 35

Acetobacter xylinum are un metabolism respirator (obligatoriu aerob), coloniile sunt decolorate. 37

Caracteristicile biochimice sunt următoarele:

- sinteza de catalază +; 39

- sinteza de oxidază -;

- nu lichefiază gelatina; 41

- formează indol sau H₂S;

- oxidează etanolul la acid acetic; 43

- acetatul și lactatul este oxidat la CO₂ și H₂O;

- formează acid din n-propanol, n-butanol și D-glucoza; 45

- nu hidrolizează lactoza sau amidonul;

- temperatura optimă de cultivare: 25...30°C; 47

- pH-ul optim de creștere 5,4...6,3.

RO 126940 B1

1 Sursele de carbon cele mai adecvate sunt etanol, glicerol, glucoză și lactat.

2 Procedeul conform invenției constă în aceea că *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ
3 (ICCF 398) se supune unui proces de dezvoltare constând în: faza de preinocul pe un mediu
4 agarizat (Schramm-Hestrin) cu trecerea în faza de inocul pe un mediu submers static ce
5 conține glucoză, extract de porumb și săruri minerale, precum și faza de biosinteză a BC pe
6 un mediu submers static ce conține ca sursă de carbon, suc de mere/suc de pere, glicerol
7 și etanol, împreună cu sulfat de amoniu și săruri minerale.

8 Incubarea în toate fazele are loc la 30°C, în regim static de aerare.

9 Valorificarea, ca atare, a acestor produse horticole și a glicerolului sub forma unor
10 substraturi de cultivare a diferitelor specii de bacterii producătoare de bioceluloză reprezintă
11 o modalitate eficientă de reciclare a unor asemenea constituenți vegetali, care implică
12 utilizarea unor metode neconvenționale, destinate conversiei acestora în produse de calitate
13 și cu o valoare economică ridicată.

14 *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ (ICCF 398) parcurge mai multe etape de dezvoltare,
15 pornind de la o cultură liofilizată. Cultura a fost robustă într-un mediu lichid nutritiv ce resta-
16 bilește metabolismul celulelor de inițiere a fazelor de preinocul, inocul și biosinteză cu
17 respectarea parametrilor fizico-chimici și de separare specifică a fiecăruia.

18 Mediul de întreținere a culturii de *A. xylinum* 2004 DSMZ (ICCF 398) specific micro-
19 organismelor conține: glucoză, peptonă, extract de drojdie, fosfat disodic anhidru și acid
20 citric. Incubarea se face la 30°C, timp de 48 h.

21 Mediul de inocul este alcătuit din: glucoză, extract de porumb, fosfat monopotasic,
22 acid citric.

23 Mediul de bioproces este alcătuit din glicerol și soluție apoasă din pastă de fructe
24 (mere sau pere), sulfat de amoniu, fosfat acid de sodiu, acid citric, extract drojdie, sulfat de
25 magneziu, microelemente (FeSO₄, MnSO₄).

26 Incubarea se efectuează static, la 30°C, timp de 14 zile. Se formează o peliculă
27 groasă de celuloză, care este evaluată cantitativ după perioada de incubare.

28 Membrana de celuloză se tratează pentru îndepărtarea celulelor microbiene
29 aderente, prin neutralizare pentru purificare, până se ajunge la transparența peliculei.

30 Se dau în continuare 3 exemple de aplicare a invenției.

31 **Exemplul 1.** Micoorganismul *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ (ICCF 398), din forma
32 liofilizată a fost rehidratat și s-a păstrat sub formă de culturi stoc pe un mediu nutritiv agarizat.

33 Al doilea pasaj solid → solid în condiții de incubare (30°C, static) are rolul de a activa
34 (revitaliza) microorganismul și această etapă constituie preinoculul ciclului fermentativ.

35 Faza de preinocul folosește rețeta de întreținere Schramm-Hestrin, % (g/v):

- 36 - glucoză 2;
- 37 - peptonă 0,5;
- 38 - yeast extract 0,5;
- 39 - fosfat disodic anhidru 0,27;
- 40 - acid citric 0,15;
- 41 - agar-agar 0,2;
- 42 - pH = 5 corectat cu acid acetic 1 N.

43 Cultura de *Acetobacter xylinum* este de tip smooth lucioasă, ce se preia ușor în apă
44 distilată sterilă.

45 Faza de inocul se realizează la flacoane Erlenmayer de 500 mL cu 50 mL mediu
46 având următoarea compoziție, % (g/v):

- 47 - glucoză tehnică 1;
- 48 - extract de porumb 1;

RO 126940 B1

- fosfat monopotasasic 0,15; 1
- acid citric 0,1; 3
- apă distilată adăugată 100. 3

Incubarea are loc static la 30°C, timp de 24 h. Se remarcă apariția în inocul a unei pelicule subțiri și translucide, care este începutul biosintezei de celuloză pe seama sursei de C. 5

Restul lichidului este transparent, ceea ce indică faptul că nu există o contaminare secundară. 7

Incubarea fazei de bioproces se face cu 5% din suspensie microbiană de inocul de 24 h. 9

Mediul de bioproces conține, % (g/v): glicerol 2, (NH₄)SO₄ 0,3, acid citric 0,5, extract de drojdie 0,05, sulfat de magneziu 0,05, microelemente (FeSO₄, MnSO₄). pH = 5 corectat cu acid acetic 1N. 11 13

Faza de bioproces se realizează la flacoane Erlenmayer de 500 mL cu 50 mL mediu. Incubarea se face static la 30°C, timp de 14 zile. 15

Rezultate finale pentru BC obținută pe glicerină ca sursă de carbon. 17

Volum final mediu (mL)	pH	Substanța reducătoare (glicerol)%	Masă celuloză umedă, g	Masă celuloză uscată, g	Cantitate celuloză g/l
33	4,87	0,8	21,456	0,2967	5,934

 19 21

Exemplul 2. Procedeu conform exemplului 1 cu utilizarea microorganismului *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ (ICCF 398) într-un sistem de cultivare static, analog exemplului 1. 23

Pentru producerea preinoculului și a inoculului se procedează conform exemplului 1. 25

Mediul de bioproces se prepară conform exemplului 1, având glicerina asociată în substrat combinat cu o soluție apoasă de mere ca sursă de carbon, preparată astfel: 27

- 100 g mere răzuite sub formă de pastă; 29
- 1 g pastă mere se trece în soluție apoasă (factor de diluție 100); 29
- se dozează zahărul reducător (ca echivalenți glucoză) din soluția preparată cu pasta de mere. 31

Mediul de bioproces este alcătuit din % (g/v): 33

- glicerină 2; 33
- soluție apoasă din pastă de mere (2,5% glucoză); 35
- alte ingrediente, model de operare și parametrii de lucru conform exemplului 1. 35

Rezultate finale pentru BC obținută pe substrat combinat (glicerină-soluție apoasă mere). 37

Volum final mediu (mL)	pH	Substanța reducătoare finală (glucoză-glicerină)%	Masă celuloză umedă, g	Masă celuloză uscată, g	Cantitate celuloză g/l
30	4,85	0,01	12,6220	0,4837	9,674

 39 41

Exemplul 3. Procedeu conform exemplului 1 și 2 cu utilizarea microorganismului *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ (ICCF 398) într-un sistem de cultivare static, analog exemplelor 1 și 2. 45

Pentru producerea preinoculului și a inoculului se procedează conform exemplelor 1 și 2.

RO 126940 B1

1 Mediul de bioproces se prepară conform exemplului 1 și 2, având glicerina ca sursă
3 de carbon asociată cu o soluție apoasă de pere necorespunzătoare calitativ (nestandardi-
zate), preparate conform exemplului 2.

Mediul de bioproces este alcătuit din % (g/v):

5 - glicerină 1;

7 - soluție apoasă din pastă de pere degradate (1,6 % glucoză), preparată ca în
exemplul 2 (% glucoză);

- ingrediente, model de operare și parametrii de lucru conform exemplului 1 și 2.

9

11 *Rezultate finale pentru BC obținută pe substrat combinat (glicerină - soluție apoasă
pere).*

Volum final mediu (mL)	pH	Substanța reducătoare finală (glucoză - glicerină)%	Masă celuloză umedă, g	Masă celuloză uscată, g	Cantitate celuloză g/l
13 25	4,78	0 - 0,07	11,055	0,1610	3,22

15

RO 126940 B1

Revendicări

1. Procedeu de obținere a celulozei bacteriene, **caracterizat prin aceea că** o tulpină de *Acetobacter xylinum* DSMZ 2004 ICCF 398 se supune unei fermentații submerse statice pe un mediu de cultură ce utilizează glucoza tehnică ca sursă de carbon, extractul de porumb ca sursă de azot, fosfatul monopotasic, acidul citric și sulfatul de magneziu ca surse minerale în fazele de preinocul și inocul, și ulterior unei faze de biosinteză prin cultivare pe un mediu care utilizează ca sursă de carbon produse horticoale care au o concentrație echivalentă glucozei de 2,5...7,5% și glicerol 1...2% g/v, ca sursă de azot sulfatul de amoniu 0,1...0,3%, extract de drojdie 0,03...0,05%, sulfat de magneziu 0,03...0,05%, și acidul citric 0,1...0,5%, etanol 0,8...1%, procentele sunt exprimate în volum, obținându-se celuloza bacteriană care este supusă etapei de purificare. 11
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, în etapa de fermentație, se folosesc ca sursă de carbon produse horticoale de calitate inferioară și glicerol obținut ca produs secundar din procesul de fabricație al biodiselului. 15



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 865/2013