



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00566

(22) Data de depozit: 29.06.2010

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

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

(72) Inventatori:
• CASARICA ANGELA, STR.POPA STOICA
FARCAȘ NR.19, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO;
• IONESCU CORINA, STR. LEREȘTI NR. 1,
BL.A2, 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. GH. DOJA
NR.9, BL.C2, AP.125, GALAȚI, GL, RO;
• SOARE MARIANA, STR.STRĂULEȘTI
NR.59, BL.B4, ET.2, AP.11, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• IONESCU ANA DESPINA,
STR. ALUNIȘULUI NR.4, BL.11A, AP.99,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• BOGHIU ANASTASIA, STR. BĂLȚIȚA
NR.3, BL.B19, SC.3, AP.69, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NICOLAE LENUȚA, STR. ISTRIEI NR.12,
BL.19D, SC.B, AP.46, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE OBȚINERE A CELULOZEI
BACTERIENE PE SUBSTRATURI COMBINATE

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu biotehno-
logic de obținere a celulozei bacteriene pe substraturi
combinat. Procedeu conform invenției constă în
supunerea *Acetobacter xylinum* DSMZ 2004 unui pro-
ces fermentativ submers static, pe un mediu de cultură
ce utilizează glucoza tehnică drept sursă de carbon,
extractul de porumb, ca sursă de azot, fosfatul mono-
potasic, acidul citric și sulfatul de magneziu, ca surse
minerale specifice, iar faza de biosinteză utilizează

produse horticole necorespunzătoare calitativ și
glicerolul ca sursă de carbon, sulfatul de amoniu, ca
sursă de azot, extractul de drojdie, ca sursă de factori
de creștere, și acidul citric, sulfatul de magneziu și
microelemente, ca surse minerale pentru producerea
celulozei bacteriene.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



11

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2010 00566
Data depozit 29-06-2010

Procedeu biotehnologic de obtinere a celulozei bacteriene pe substraturi combinate

Prezenta invenție se referă la un procedeu biotehnologic de obtinere a celulozei bacteriene cu *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ pe medii de biosinteza ce contin o sursa de carbon compusa din produse horticoale, glicerol si etanol.

Celuloza bacteriana (BC) rezulta in urma unui proces complex ce implica polimerizarea de glucoza in lanturi liniare de β -1,4 glucan, secretia extracelulara a acestora precum si asamblarea si cristalizarea in panglici.

Spre deosebire de celuloza din plante, BC prezinta avantajul ca nu contine lignina si hemiceluloza, are un indice de cristalinitate mare (>60%), iar lanturile paralele β -1,4 glucan sunt aranjate uniaxial.

Acetobacter xylinum este o bacterie obligat aeroba gasita in otet, bauturi alcoolice, sucuri de fructe, in fructe si legume in special in cele putrede.

Procedeul conform inventiei consta in aceea ca *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ se supune unui proces fermentativ static pe un mediu de biosinteza ce utilizeaza ca sursa de carbon, un substrat combinat alcatuit din glucoza existenta in sucul unor produse horticoale necorespunzatoare calitativ si glicerol – reziduu din industria biodieselului, precum si etanol.


În general, utilizarea substraturilor din resurse regenerabile este o alegere prietenoasa pentru mediu, care de asemenea, contribuie la reducerea costurilor de tratare a deșeurilor și crește valoarea economică a produselor.

Sursa de azot este anorganica si anume $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, iar sarurile minerale sunt specifice cultivarii microorganismelor. Deasemenea ca factor de crestere se adauga extract de drojdie.

Mediul de cultura pentru faza de inocul contine glucoza tehnica si extract de porumb ca principale componente.

Conditile de cultivare sunt: bioproces de tip "batch", incubare la 30°C, regim de aerare static, durata bioprocesului este de 14 zile.

Director general
Dr. ing. Măsu Moscovici



Procedeu biotehologic de obtinere a celulozei bacteriene pe substraturi combinate

Prezenta inventie se refera la un procedeu biotehologic de obtinere a celulozei bacteriene (BC) pe un substrat combinat alcatuit din: produse horticoale – glicerol – etanol, cu microorganismul *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ.

Celuloza bacteriana (BC) a castigat o atentie deosebita in diferite domenii de cercetare pentru proprietatile favorabile pe care le posedata cum ar fi: proprietati mecanice remarcabile, porozitate, absorbtia apei, plasticitate, biodegradabilitate.

Datorita acestor proprietati BC are o gama larga de aplicatii potentiale predominant in domeniul biomedical, in special pentru faptul ca se deosebeste structural de celuloza din sursa vegetala.

Microorganismul clasic de productie a BC este *Acetobacter xylinum* dar s-au facut cercetari de obtinere a BC si cu alte microorganisme.

Gama de medii de cultura este diversa, predominant fiind folosite glucoza si sucroza [WO/1997/005271] [1].

O varianta a mediului de bioproces este pe baza de glucoza, extract de drojdie, peptona, saruri minerale, etanol, iar in faza productiva adaugandu-se o solutie apoasa din patul de cultivare a ciupercilor (dupa recoltarea acestora) [WO/2007/063854 (A1)] [2]; s-au folosit reziduuri lichide de la fabricarea berii [KR 2005/0022591] [3] sau de la fabricarea zaharului, alaturi de peptona si etanol [RU 2141530] [4].

Un proces fermentativ si continuu cu o rata de productie a materialului celulozic de 0.4g/L/h si mentinerea unei concentratii de zahar in lichid de 20g/L precum si includerea unui factor de crestere cu afinitate pentru substratul de zahar a fost descris de brevetul [US 6132998 A] [5].

Factorul de crestere este selectat dintr-un grup de substante intre care intra si glicerolul.

Se breveteaza si utilizarea unor hidrolizate de lana industriala dar si a unui hidrolizat din plante, alaturi de substanta bruta nestandardizata de la industria bauturilor din fructe; ca agent compensator de N dar si ca factor de crestere este utilizata peptona.

In biosinteza celulozei s-au folosit de asemeni reziduuri de brutarie si 20-100 mg/L saponine [JP 8056689 (A)] [6].

Director general
Dr. ing. Misu Moscovici



Un alt procedeu comunica cultivarea microorganismului *A. xylinum* pe un mediu ce contine ca sursa de carbon sucroza si invertaza 1-1.5 unit/g de sucroza [JP 7184677 (A)] [7].

[US 6132998] [5] comunica o multitudine de substante ca posibile surse de carbon pentru obtinerea de BC, intre care glicerol si etanol dar si hidrolizatul de amidon - suc de melasa de la industria zaharului din sfecla sau suc de la prelucrarea trestiei de zahar. Ca posibile surse de azot sunt enumerate: substante anorganice dar si bactopectona, extract de drojdie sau extract de soia si uree.

Problema tehnica pe care isi propune sa o rezolve prezenta inventie este aceea de a obtine BC prin valorificarea unor produse horticoale nestandardizate si a unor deseuri industriale – glicerolul, cu un adaos de etanol care accelereaza biosinteza BC. Microorganismul ce sta la baza acestei tehnologii este *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ (ICCF 398). Acest microorganism este cunoscut pentru transformarea alcoolului (etanol) in acid acetic in prezenta oxigenului si este sursa principala a obtinerii de celuloza bacteriana. Se prezinta sub forma de celule elipsoidale sau bacili drepti, ori usor curbati avand dimensiunile 0.6-0.8 μm /1-4 μm . Nu formeaza endospori si este Gram⁻.

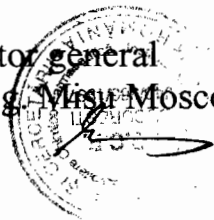
Acetobacter xylinum are un metabolism respirator (obligatoriu aerob), coloniile sunt decolorate.

Caracteristicile biochimice sunt urmatoarele:

- sinteza de catalaza +
- sinteza de oxidaza -
- nu lichefiaza gelatina
- formeaza indol sau H₂S
- oxideaza etanolul la acid acetic
- acetatul si lactatul este oxidat la CO₂ si H₂O
- formeaza acid din n-propanol, n-butanol si D-glucoza
- nu hidrolizeaza lactoza sau amidonul
- temperatura optima de cultivare: 25-30°C
- pH-ul optim de crestere 5.4-6.3

Sursele de carbon cele mai adecvate sunt etanol, glicerol, glucoza, lactat.

Director general
Dr. ing. Miru Moscovici



Procedeul conform inventiei consta in aceea ca *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ (ICCF 398) se supune unui proces de dezvoltare constand in: faza de preinocul pe un mediu agarizat (Schramm-Hestrin) [8] cu trecerea in faza de inocul pe un mediu submers static ce contine glucoza, extract de porumb si saruri minerale, precum si faza de biosinteza a BC pe un mediu submers static ce contine ca sursa de carbon, suc de mere/suc de pere, glicerol si etanol, impreuna cu sulfat de amoniu si saruri minerale.

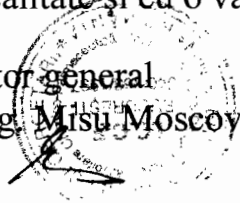
Incubarea in toate fazele are loc la 30°C, in regim static de aerare.

Desi sunt cunoscute si aplicate diverse tehnologii pentru obtinerea de BC folosind variate surse de C si parametrii de aerare (static sau sub agitare pentru o BC hidratata), procedeul descris conform inventiei de biosinteza a celulozei bacteriene pe baza de surse de C in substrat combinat (glicerol + produse horticoale) prezinta urmatoarele avantaje:

- se utilizeaza un microorganism care in mod specific transforma sursa de C in bioceluloza.
- foloseste ca sursa de C, glicerolul sau combinatie de produse horticoale + glicerol care este un subprodus de la industria biodieselului care nu a fost valorificat pana acum intr-un domeniu de importanta speciala si de perspectiva ca biosinteza celulozei.
- produsele horticoale pot fi convertite in mod eficient la celuloza bacteriana deoarece microorganismele au o biodisponibilitate mai buna asupra substratului biologic comparativ cu cel sintetic, ceea ce adauga valoare bioprocesului.
- Necesarul de oxigen al microorganismului bacterian este redus prin alegerea tipului de bioproces in regim static care este mai productiv din punct de vedere al biosintezei de celuloza.
- Celuloza bacteriana obtinuta poate fi o alternativa benefica la celuloza forestiera (vegetala), avand multiple posibilitati de aplicare in domenii ca industria farmaceutica, agricultura, industria alimentara, hartiei sau colorantilor, precum si in medicina.

Valorificarea, ca atare, a acestor produse horticoale si a glicerolului sub forma unor substraturi de cultivare a diferite specii de bacterii producatoare de bioceluloza reprezinta o modalitate eficienta de reciclare a unor asemenea constituenți vegetali, care implica utilizarea unor metode neconventionale, destinate conversiei acestora in produse de calitate si cu o valoare economica ridicata.

Director general
Dr. ing. Misu Moscovici



Acetobacter xylinum 2004 DSMZ (ICCF 398) parcurge mai multe etape de dezvoltare, pornind de la o cultura liofilizata. Cultura a fost robusta intr-un mediu lichid nutritiv ce restabileste metabolismul celulelor de initiere a fazelor de preinocul, inocul si biosinteza cu respectarea parametrilor fizico-chimici si de separare specifice fiecareia.

Mediul de intretinere a culturii de *A. xylinum* 2004 DSMZ (ICCF 398) specific microorganismelor, contine: glucoza, peptona, extract de drojdie, fosfat disodic anhidru si acid citric. Incubarea se face la 30°C, timp de 48h.

Mediul de inocul este alcatuit din: glucoza, extract de porumb, fosfat monopotasice, acid citric.

Mediul de bioproces este alcatuit din glicerol si solutie apoasa din pasta de fructe (mere sau pere), sulfat de amoniu, fosfat acid de sodiu, acid citric, extract drojdie, sulfat de magneziu, microelemente (FeSO₄, Mn SO₄).

Incubarea se efectueaza static, la 30°C, timp de 14 zile. Se formeaza o pelicula groasa de celuloza, care este evaluata cantitativ dupa perioada de incubare.

Membrana de celuloza se trateaza pentru indepartarea celulelor microbiene aderente, prin neutralizare pentru purificare, pana se ajunge la transparenta peliculei.

Se dau in continuare exemple de aplicare a inventiei:

Exemplul 1.

Micoorganismul *Acetobacter xylinum* 2004 DSMZ (ICCF 398), din forma liofilizata a fost rehidratat si s-a pastrat sub forma de culturi stoc pe un mediu nutritiv agarizat.

Al doilea pasaj solid→solid in conditii de incubare (30°C, static), are rolul de a activa (revitaliza) microorganismul si aceasta etapa constituie preinoculul ciclului fermentativ.

Faza de preinocul foloseste reteta de intretinere Schramm-Hestrin, % (g/v):

- glucoza 2
 - peptona 0.5
 - yeast extract 0.5
 - fosfat disodic anhidru 0.27
 - acid citric 0.15
 - agar-agar 0.2
- pH = 5 corectat cu acid acetic 1N

Director general
Dr. ing. Misu Moscovici



Cultura de *Acetobacter xylinum* este de tip smooth lucioasa, ce se preia usor in apa distilata sterila.

Faza de inocul se realizeaza la flacoane Erlenmayer de 500 mL cu 50 mL mediu avand urmatoarea compozitie, % (g/v):

- glucoza tehnica 1
- extract de porumb 1
- fosfat monopotasice 0.15
- acid citric 0.1
- apa distilata adaugata 100

Incubarea are loc static la 30°C, timp de 24 h. Se remarca aparitia in inocul a unei pelicule subtiri si translucide care este inceputul biosintezei de celuloza pe seama sursei de C.

Restul lichidului este transparent, ceea ce indica faptul ca nu exista o contaminare secundara.

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

Mediul de bioproces contine, % (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.

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

Rezultate finale pentru BC obtinuta pe glicerina ca sursa de carbon.

Volum final mediu (mL)	pH	Substanta reductoare (glicerol) %	Masa celuloza umeda, g	Masa celuloza uscata, g	Cantitate celuloza g/l
33	4.87	0.8	2.1456	0.2967	5.934

Director general
Dr. ing. Misu Moscovici



✓

Exemplul 2.

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

Pentru producerea preinoculului si a inoculului se procedeaza conform exemplului 1.

Mediul de bioproces se prepara conform exemplului 1, avand glicerina asociata in substrat combinat cu o solutie apoasa de mere ca sursa de carbon, preparata astfel:

- 100 g mere razuite sub forma de pasta
- 1 g pasta mere se trece in solutie apoasa (factor de dilutie 100)
- se dozeaza zaharul reducator (ca echivalenti glucoza) din solutia preparata cu pasta de mere.

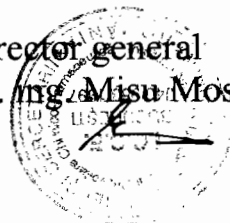
Mediul de bioproces este alcatuit din % (g/v):

- glicerina 2
- solutie apoasa din pasta de mere (2.5 % glucoza)
- alte ingrediente, model de operare si parametrii de lucru conform exemplului 1.

Rezultate finale pentru BC obtinuta pe substrat combinat (glicerina-solutie apoasa mere).

Volum final mediu (mL)	pH	Substanta reducatoare finala (glucoza-glicerina) %	Masa celuloza umeda, g	Masa celuloza uscata, g	Cantitate celuloza g/l
30	4.85	0.01	12.6220	0.4837	9.674

Director general
Dr. ing. Misu Moscovici



Exemplul 3.

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

Pentru producerea preinoculului si a inoculului se procedeaza conform exemplelor 1 si 2.

Mediul de bioproces se prepara conform exemplului 1 si 2 avand glicerina ca sursa de carbon asociata cu o solutie apoasa de pere necorespunzatoare calitativ (nestandardizate) preparate conform exemplului 2.

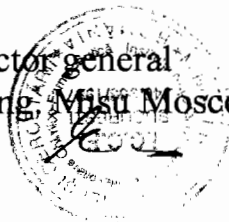
Mediul de bioproces este alcatuit din % (g/v):

- glicerina 1
- solutie apoasa din pasta de pere degradate (1.6 % glucoza), preparata ca in exemplul 2 (% glucoza)
- ingrediente, model de operare si parametrii de lucru conform exemplului 1 si 2.

Rezultate finale pentru BC obtinuta pe substrat combinat (glicerina-solutie apoasa pere).

Volum final mediu (mL)	pH	Substanta reductoare finala (glucoza - glicerina) %	Masa celuloza umeda, g	Masa celuloza uscata, g	Cantitate celuloza g/l
25	4.78	0 - 0.07	11.055	0.1610	3.22

Director general
Dr. ing. Miru Moscovici



Bibliografie

1. **H.R. Bungay, G. C. Serafica**; Production of microbial cellulose using a rotating disk film bioreactor (WO/005271) (1997).
2. **Y. Tamai**; Method of producing bacterial cellulose (WO/063854) (2007).
3. **Joong Kon Park, Seung Hoon Hyun and Won Sool Ahn**; Method for production bacterial cellulose using the waste of beer fermentation broth (KR 0022591) (2005).
4. **A. K. Hripunov, A. A. Tkachenko**; Composition of nutrient medium for *Acetobacter xylinum* cultivation to obtain bacterial cellulose (RU 2141530) (1999).
5. **T. Naritomi; T. Kouda; M. Naritomi; H. Yano; F. Yoshinaga**; Process for continuously preparing bacterial cellulose (US Patent 6132998) (2000).
6. **H. Seto, T. Tsuchida, F. Yoshinaga**; Production of bacterial cellulose (JP Patent 8056689) (1996).
7. **H. Seto, T. Tsuchida, F. Yoshinaga**; Production of bacterial cellulose (JP Patent 7184677) (1995).
8. **S. Hestrin, M. Schramm**, Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose, *Biochem. J.* 58 (1954) 345–352.

26-06-2010

REVENDICARI

1. Procedeu conform inventiei consta in aceea ca *Acetobacter xylinum* DSMZ 2004 (ICCF 398) se supune unui proces fermentativ submers static pe un mediu de cultura ce utilizeaza glucoza tehnica ca sursa de carbon, extractul de porumb ca sursa de azot, fosfatul monopotasic, acidul citric si sulfatul de magneziu ca surse minerale specifice microorganismelor in fazele de preinocul si inocul, iar faza de biosinteza utilizeaza produse horticoale necorespunzatoare calitativ si glicerolul (reziduu de la industria de biodiesel) ca sursa de carbon, sulfatul de amoniu ca sursa de N, extractul de drojdie ca sursa de factori de crestere, precum si acidul citric, sulfatul de magneziu si microelemente ca surse minerale pentru producerea de celuloza bacteriana.

2. Procedeu conform revendicarii 1, care pastreaza modul de operare pentru preinocul si inocul, in faza de biosinteza este caracterizat prin aceea ca foloseste ca sursa de carbon un substrat combinat din produse horticoale (fructe) necorespunzatoare calitativ si glicerol (reziduu de la industria de biodiesel), pentru obtinerea de celuloza bacteriana.

Director general
Dr. ing. Miru Moscovici

