



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00764

(22) Data de depozit: 26.08.2010

(41) Data publicării cererii:
30.04.2012 BOPI nr. 4/2012

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

(72) Inventatori:
• MOSCOVICI MIȘU, STR.JEAN STERIADI
NR.7, BL. I 22, SC.B, ET.2, AP.16,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• IONESCU CORINA, STR. LEREȘTI NR. 1,
BL.A2, SC. 4, ET.2, AP. 54, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MARINESCU MIHAELA CLAUDIA,
STR. DRUMUL TABEREI NR. 15, BL. A1,
SC. 2, ET.6, AP. 72, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• VLADU MARIANA GRAȚIELA,
ALEEA TRIPOLI NR.4, BL.B4, ET.2, AP.11,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• CASARICA ANGELA, STR.POPA STOICA
FARCAȘ NR.19, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO;
• GHERA DANIELA MARIANA,
STR.ION BREZOIANU NR.18, AP.5,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• PREDĂ SILVIA, STR.FRUMUȘANI NR.14,
BL.99, ET.1, AP.12, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MANEA VASILICA,
STR. THEODOR PALLADY NR.17, BL.U 27,
AP.17, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI POLIZAHARID
MICROBIAN, VALORIFICÂND GLICERINA, SUBPRODUS AL
FABRICAȚIEI BIODIESELULUI**

(57) Rezumat:

Procedeu biotehnologic de obținere a unui polizaharid microbial prin valorificarea glicerinei, în care, la fermentația microorganismului *Pseudomonas sp.*, izolat din natură, pe un mediu conținând glicerina rezultată, ca subprodus la fabricarea biodieselului, și în condiții optime de agitare aerare, are loc biosinteza polizaharidului pseudozan, atingând concentrații finale de 19...23 g/l, cu productivități de 0,36...0,48 g/l/h. După

separarea biomasei, soluția liberă de celule se purifică parțial și se concentrează prin microfiltrare și ultrafiltrare, obținându-se polizaharidul brut care se redizolvă, se purifică și se concentrează, cu obținerea unui produs cu o concentrație de peste 90% pseudozan.

Revendicări: 3

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).



6

| |
|--|
| OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI |
| Cerere de brevet de invenție |
| Nr. a. 701. CC 764 |
| Data depozit 26-08-2010 |

PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI POLIZAHARID MICROBIAN, VALORIFICÂND GLICERINA, SUBPRODUS AL FABRICAȚIEI BIODIESELULUI

Invenția se referă la un procedeu de biosinteză prin fermentație, a unui polizaharid utilizând ca sursă de carbon glicerina rezultată ca subprodus din fabricația biodieselului, precum și la izolarea și purificarea acestuia din mediu, după biosinteză. Microorganismul producător este *Pseudomonas* sp ICCF- 400, izolat din natură.

Literatura de specialitate menționează surplusul de glicerină pe piața internațională datorat producției de biodiesel având ca o consecință scăderea drastică a prețului acestui subprodus, în condițiile în care el ar putea contribui la creșterea necesară a competitivității acestui biocarburant. Microbiologia industrială, prin biotehnologii microbiene utilizând glicerina ca sursă de carbon e considerată una din căile promițătoare de valorificare a acesteia, realizând, mai ieftin decât sinteza chimică, bioconversia glicerinei în produse cu valoare adăugată apreciabilă: propandiol, dihidroxiacetona, acizii succinic, propionic, citric, bioetanol, pigmenți, poliesteri, biosurfactanți [1].

S-a evidențiat capacitatea unor bacterii ale genului *Pseudomonas* de a produce polizaharide extracelulare, acestea putând avea activitate imunostimulatoare sau antivirală, chiar anti HIV [2,3]. Singurul polizaharid produs industrial de o specie de *Pseudomonas* (*Ps.elodea*) și utilizat ca agent gelifiant este gellanul.

Microorganisme ale speciei *Pseudomonas aeruginosa* au fost experimentate ca utilizatoare de glicerină producând ramnolipide ca biosurfactanți [1].

Literatura prezintă o singură tulpină de *Pseudomonas oleovorans* care a produs un polizaharid extracelular utilizând glicerina rezultată din fabricația biodieselului [4,5]. Se citează ca cele mai bune rezultate în biosinteză, o concentrație finală în polizaharid de 7-18 g/L după 4-7 zile de fermentație, productivitate maximă 0,1-0,2 g/L h. Produsul este obținut în stare brută, prin precipitare cu etanol din lichidul liber de celule [6].

Procedeul conform invenției realizează, prin fermentația unei tulpini de *Pseudomonas* sp. izolate din natură, pe un mediu conținând glicerină din fabricația biodieselului, biosinteza unui polizaharid extracelular numit pseudozan, după care mediul de fermentație e procesat în vederea separării, izolării și purificării produsului.

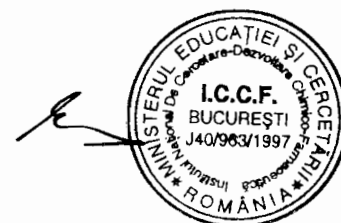
Mediul de fermentație conține glicerina 3,5-4% (g/v) ca sursă de carbon, extract de porumb 1,5-2% (g/v) ca sursă de azot, acid citric ca precursor și săruri, având un pH inițial de 7-7,5.

Pe parcursul fermentației, agitarea și aerarea se reglează astfel încât nivelul oxigenului dizolvat să se mențină la peste 30 % saturație. După 48-53 ore de fermentație, sursa de carbon este epuizată și se obține o concentrație finală în polizaharid de 19-23 g/L; productivitatea fiind astfel de 0,36-0,48 g/L h. După biosinteză, mediul este procesat prin separarea biomasei, microfiltrarea și concentrarea prin ultrafiltrare și sub vid a soluției libere de celule, urmată de izolarea produsului, sau prin separarea unui produs brut, urmată de redizolvare, purificarea și concentrarea soluției obținute prin filtrare, ultrafiltrare – diafiltrare și izolarea produsului.

Puritatea produsului obținut, exprimată prin conținutul în glucoză polimerizată după hidroliză, este de 60-65%, respectiv peste 90%.

Prin cromatografie în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC) s-au evidențiat ca unități monomere glucoza, acidul glucuronic, galactoza, manoza și ramnoza, alte monozaharide neidentificate.

Avantajele invenției constau în principal în aceea că, valorificând superior glicerina, subprodus al fabricației biodieselului, atinge performanțe în biosinteză, mult superioare puținelor date cunoscute până în prezent, cât și în faptul că se realizează izolarea și purificarea polizaharidului produs.



Biopolimerul polizaharidic obținut prezintă aplicații potențiale ca biosurfactant în tratarea apelor uzate și combaterea poluării, în industriile cosmetică, farmaceutică, minieră, a hârtiei și de extracție a petrolului, dar și în perspectivă, ca agent profilactic terapeutic sau asociat acestora.

Se prezintă în continuare două exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

Biosinteza cuprinde cele trei faze caracteristice biotehnologiei microbiene preparative: preinocul, inocul (faza vegetativă) și fermentație, în care are loc biosinteza propriu-zisă.

Preinoculul reprezintă cultura de întreținere a microorganismului producător de pseudozan, *Pseudomonas sp.* ICCF- 400. Se obține pe mediu solid agarizat, incubat la 30°C, timp de 48 ore.

Inoculul se realizează prin obținerea unei suspensii de cultură de preinocul în 5 ml apă distilată sterilă, transferul a câte 0,5 ml din această suspensie în flacoane Erlenmayer de 500 ml conținând 100 ml mediu de cultură lichid steril și incubarea la 28-30°C, cu agitare rotativă (230 rpm). Mediul de cultură conține (% g/v): glicerină 1; extract de porumb 1,5; KH₂PO₄ 0,2; NaCl 0,2; MgSO₄·7H₂O 0,05; pH inițial 6,7-7. Se sterilizează 30 min la 115°C. Cultivarea durează 48 ore, obținându-se o cultură de inocul cu următoarele caracteristici : glicerină 0; D.O. (1:50, la 570 nm) 15,4; pH 8,0; vâscozitate aparentă 6,7 cP.

Fermentația decurge în microfermentator cu capacitatea de 10 L, volum util 7 L.

Mediul de cultivare conține (% g/v): glicerină, (subprodus din fabricația biodieselului, conținut 86-88%) 4; acid citric 0,15; K₂HPO₄ 0,4; KH₂PO₄ 0,07; MgSO₄·7H₂O 0,05; MnSO₄ 0,03; se completează volumul cu apă până la 7 L. Se corectează pH-ul la 7,5, după care bioreactorul cu mediu se sterilizează la 115°C timp de 30 min.

După răcirea la 30°C, se face inocularea cu 10% cultură de inocul. Fermentația are loc la 30°C, cu monitorizarea automată a parametrilor, modificând agitarea (în domeniul 350-600 rpm) și aerarea (0,4-0,5 L/L min), astfel încât nivelul oxigenului dizolvat să se mențină la peste 30% saturație. Biosinteza se consideră încheiată când se epuizează substratul sursă de carbon (glicerina) – 53 ore de fermentație. Vâscozitatea aparentă a mediului atinge 100 cP. Concentrația finală atinsă în biosintează este de 19,7 g/L, productivitatea fiind de 0,37 g/L h.

Procesarea post-biosintează

Mediul de fermentație final (6 L cu 19,7 g polizaharid/L) se diluează cu apă demineralizată 1:1 (v/v) și se separă biomasa prin filtrare sub vid, pe un filtru nutsche cu strat de adjuvant (celită).

Lichidul liber de celule (11 L cu 5,7 g/L) se supune succesiv micro- și ultrafiltrării pe membrane: fluoropolimerică FSM 045 (0,45 μm) și respectiv polisulfonică GR 81PP (limită de excludere 10 KDa), utilizând un modul de separare prin membrane Lab Unit M-37 (DSS-Alfa Laval). Se rețin astfel resturi celulare (microfiltrare), se concentrează și se purifică soluția de microsolute, obținând un retentat parțial concentrat, care se concentrează în continuare sub vid într-un rotaevaporator (temperatura maximă 60°C). Se obțin 2,1 L concentrat cu 12,8 g/L. Din concentrat se izolează produsul prin precipitare cu etanol: după adăugarea a 1%(g/v) clorură de potasiu, soluția concentrată se adaugă, sub agitare energetică, în 6,3 L etanol, se mai agită în continuare cca. 2 ore, după care se menține în repaos, la 8-10°C, aprox.10 ore. Produsul precipitat se separă prin decantare și filtrare, se spală cu etanol și se usucă într-o etuvă sub vid, la max.85°C.

Rezultă 26,1 g de produs, cu un conținut (exprimat în glucoză, după hidroliză acidă) de 64,2%.



Exemplul 2

Pentru biosinteză se procedează ca în exemplul 1, cu diferența că faza de cultivare a inoculului e de numai 24 ore, iar mediul de cultivare în fermentație (de biosinteză) conține, conform unei rețete optimizate (% g/v): glicerina 3,5; extract de porumb 1,5.

Cultura de inocul de 24 ore prezintă următoarele caracteristici: glicerină 0; D.O. 8,2; pH 7,4; vâscozitate aparentă 11,4 cP.

Dupa 48 ore de fermentație, când glicerina s-a epuizat, concentrația finală este de 23,4 g/L (productivitate 0,48 g/L h). Vâscozitatea aparentă a mediului atinge 229 cP.

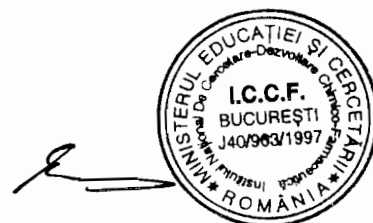
Procesare post-biosinteza

Din mediul de fermentație final (6,3 L cu 23,4 g polizaharid/L) se precipită un produs brut cu 19 L etanol, sub agitare energetică, se continuă agitarea 2 ore, apoi se lasă în repaos la 8-10°C, aprox.10 ore.

Produsul sedimentat se separă prin decantare și filtrare, se spală cu etanol și se usucă în etuvă sub vid, la max. 85°C. Rezultă 122 g produs brut. Acesta se suspendă în 20 L apă demineralizată și suspensia obținută (conținând solide nedizolvate, în special resturi de celule) se filtrează sub vid, pe filtru nutsche cu strat de adjuvant.

Soluția filtrată obținută (22L) se supune purificării și concentrării prin ultrafiltrare și diafiltrare pe o casetă de membrane disulfonice PTGC 00005 (limită de excludere 10 kDa) montată într-un modul Pellicon standard (Millipore). Astfel, după o primă concentrare la 6 L, se completează la volumul initial cu apă demineralizată și se supune din nou concentrării prin ultrafiltrare, îndepărtându-se astfel microsolute (în special săruri). Se obțin 6 L concentrat 7,9 g/L. Din acesta se izolează produsul prin precipitare cu 18 L etanol, în modul descris în exemplul 1.

Se obțin 44,5 g produs purificat, cu un conținut de 90,9 %.



BIBLIOGRAFIE

1. da Silva G.P., Mack M., Contiero J. (2009), Biotechnol. Adv. **27**, 30-39.
2. Kocharova N.A., Hatano K., Shaskov A.S., Knirel Y.A., Kochetkov N.K., Pier G.B. (1989), J.Biol. Chem. **264** (26), 15569-15573.
3. Matsuda M., Shigeta S., Okutani K. (1999), Mar.Biotechnol. **1**, 68-73.
4. Freitas F., Alves V.D., Pais J., Costa N., Mafra L., Hilliou L., Oliveira R., Reis M.A.M., (2009), Biores.Technol. **100**, 859-865.
5. Alves V.D., Freitas F., Costa N., Carvalheira M., Oliveira R., Goncalves M.P., Reis M.A.M (2010), Carbohydr. Polym. **79** (4), 981-988.
6. Freitas F., Alves V.D., Carvalheira M., Costa N., Oliveira R., Reis M.A.M (2009) Carbohydr.Polym. **78** (3) 549-556.



PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI POLIZAHARID MICROBIAN, VALORIFICÂND GLICERINA, SUBPRODUS AL FABRICAȚIEI BIODIESELULUI

REVENDICĂRI

1. Procedeu de biosinteză a unui polizaharid numit pseudozan **caracterizat prin aceea că** microorganismul *Pseudomonas sp.* ICCF-400 este supus unei fermentații submerse pe un mediu conținând (%g/v) : glicerină din fabricatia biodieselului 3,5 – 4; extract de porumb 1,5-2; acid citric și săruri minerale, cu un pH înainte de sterilizare de 7-7,5, controlând agitarea-aerarea astfel încât să se mențină un nivel al oxigenului dizolvat de min. 30% saturație.
2. Procedeu prin care se izolează polizaharidul din mediul fermentat obținut conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, după separarea biomasei, soluția liberă de celule se purifică parțial și se concentrează prin microfiltrare și ultrafiltrare.
3. Procedeu prin care se izolează polizaharidul purificat din mediul fermentat obținut conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se izolează inițial din mediul fermentat un produs brut, care se redizolvă, soluția obținută fiind apoi purificată și concentrată prin ultrafiltrare și diafiltrare.

