



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00764**

(22) Data de depozit: **26.08.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.05.2013** BOPI nr. **5/2013**

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

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF
BUCUREȘTI, 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.A 2, SC.4, ET.2, AP.54, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MARINESCU MIHAELA CLAUDIA,
DRUMUL TABEREI NR.15, BL.A 1, SC.2,
ET.6, AP.72, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **VLADU MARIANA GRAȚIELA,
ALEEA TRIPOLI NR.4, BL.B 4, ET.2, AP.11,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CĂȘĂRICĂ ANGELA,
STR.POPA STOICA DIN FĂRCAȘ NR.19,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GHERA DANIELA MARIANA,
STR.ION BREZOIANU NR.18, AP.5,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **PREDA 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**K. HATANO, J.B.GOLDBERG, G.B.PIER,
"PSEUDOMONAS AERUGINOSA
LIPOPOLYSACCHARIDE: EVIDENCE
THAT THE O SIDE CHAINS AND COMMON
ANTIGENS ARE ON THE SAME
MOLECULE", JOURNAL OF
BACTERIOLOGY, 175(16), PP.5117-5128,
AUGUST 1993; GERVASIO PAULO DA
SILVA ȘI COLAB., "GLYCEROL: A
PROMISING AND ABUNDANT CARBON
SOURCE FOR INDUSTRIAL
MICROBIOLOGY", BIOTECHNOLOGY
ADVANCES 27, PP.30-39, 16 AUGUST
2008; A.S.AHMAD ȘI COLAB.,
"REVELATION OF ANTIVIRAL ACTIVITIES
BY ARTIFICIAL SULFATION OF A
GLYCOSAMINOGLYCAN FROM A MARINE
PSEUDOMONAS", MAR. BIOTECHNOL.,
PP.102-106, IANUARIE 1999**

(54) **PROCEDEU DE BIOSINTEZĂ A PSEUDOZANULUI**



RO 127296 B1

1 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,
3 precum și la izolarea și purificarea acestuia din mediu, după biosinteză. Microorganismul
producător este *Pseudomonas* sp ICCF- 400, izolat din natură.

5 Este cunoscut, din literatura de specialitate, că surplusul de glicerină pe piața
internațională, datorat producției de biodiesel, are drept consecință scăderea drastică a
7 prețului acestui subprodus, în condițiile în care acesta ar putea contribui la creșterea
necesară a competitivității acestui biocarburant. Microbiologia industrială, prin biotehnologii
9 microbiene utilizând glicerina ca sursă de carbon, este considerată una dintre căile
promițătoare de valorificare a acesteia, realizând, mai ieftin decât sinteza chimică, biocon-
11 versia glicerinei în produse cu valoare adăugată apreciabilă: propandiol, dihidroxiacetona,
acizii succinic, propionic, citric, bioetanol, pigmenți, poliesteri și biosurfactanți, din
13 documentul *Biotechnol. Adv. 27, 30-39, da Silva G.P., Mack M., Contiero J. (2009)*.

15 S-a evidențiat capacitatea unor bacterii ale genului *Pseudomonas* de a produce
polizaharide extracelulare, acestea putând avea activitate imunostimulatoare sau antivirală,
chiar anti-HIV, Kocharova N.A., Hatano K., Shaskov A.S., Knirel Y.A., Kochetkov N.K., Pier
17 G.B. (1989), *J. Biol. Chem.* 264 (26), 15569- 15573 și Matsuda M., Shigeta S., Okutani K.
(1999), *Mar. Biotechnol.* L, 68-73. Singurul polizaharid produs industrial de o specie de
19 *Pseudomonas (Ps.elodea)* și utilizat ca agent gelifiant este gellanul.

21 Microorganisme ale speciei *Pseudomonas aeruginosa* au fost experimentate ca
utilizatoare de glicerină, producând ramnolipide ca biosurfactanți, da Silva G.P., Mack M.,
Contiero J. (2009), *Biotechnol. Adv. 27, 30-39*.

23 Literatura prezintă o singură tulpină de *Pseudomonas oleovorans* care a produs un
polizaharid extracelular, utilizând glicerina rezultată din fabricația biodieselului, Freitas F.,
25 Alves V.D., Pais J., Costa N., Mafra L., Hilliou L., Oliveira R., Reis M.A.M., (2009), *Biores.*
Technol. 100, 859-865 și Alves V.D., Freitas F., Costa N., Carvalheira M., Oliveira R.,
27 Goncalves M.P., Reis M.A.M (2010), *Carbohydr. Polym.* 79 (4), 981-988. Se citează, cu cele
mai bune rezultate în biosinteză, o concentrație finală în polizaharid de 7...18 g/L după 4...7
29 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, Freitas F., Alves V.D., Carvalheira M.,
31 Costa N., Oliveira R., Reis M.A.M (2009), *Carbohydr. Polym.* 78 (3) 549-556.

33 Procedeu conform invenției se 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
35 de fermentație este procesat, în vederea separării, izolării și purificării produsului.

37 Mediul de fermentație conține glicerină 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.

39 Pe parcursul fermentației, agitarea și aerarea se reglează astfel încât nivelul
oxigenului dizolvat să se mențină la peste 30% saturație. După 48...53 h de fermentație,
41 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
43 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
45 redizolvare, purificarea și concentrarea soluției obținute prin filtrare, ultrafiltrare - diafiltrare
și izolarea produsului.

RO 127296 B1

Problema, pe care o rezolvă invenția, este de a realiza un procedeu de biosinteză a pseudozanului, utilizând, ca sursă de carbon, glicerina rezultată ca subprodus din fabricația biodieselului. 1
3

Procedeu de biosinteză a pseudozanului, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că microorganismul *Pseudomonas* sp. ICCF-400 se supune unei fermentații submerse, pe un mediu care conține 3,5...4% (g/v) glicerină rezultată din fabricația biodieselului, 1,5...2% (g/v) extract de porumb, 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 la o saturație de minimum 30%, se separă soluția liberă de celule, se purifică parțial și se concentrează prin microfiltrare și ultrafiltrare, obținându-se un produs brut, care apoi se redizolvă, iar soluția obținută se purifică și se concentrează prin ultrafiltrare și diafiltrare, obținându-se produsul purificat. 5
7
9
11

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje: 13

- valorificând superior glicerina, subprodus al fabricației biodieselului, se ating performanțe în biosinteză, mult superioare puținelor date cunoscute până în prezent; 15
- se realizează izolarea și purificarea polizaharidului produs. 17

Puritatea produsului obținut, exprimată prin conținutul în glucoză polimerizată după hidroliză, este de 60...65%, respectiv, peste 90%. 17

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. 19
21

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. 23
25

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. 27
29

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 h. 31

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 h, obținându-se o cultură de inocul cu următoarele caracteristici: glicerină 0; D.O. (1:50, la 570 nm) 15,4; pH 8,0; viscozitate aparentă 6,7 cP. 33
35
37
39

Fermentația decurge într-un microfermentator cu capacitatea de 10 L, volum util de 7 L. 41

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. 43
45

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 (in domeniul 350...600 rpm) și aerarea (0,4...0,5 L/L min), astfel încât nivelul oxigenului dizolvat să se 47

RO 127296 B1

1 mențină la peste 30% saturație. Biosinteza se consideră încheiată când se epuizează
substratul sursă de carbon (glicerină) - 53 h de fermentație. Viscositatea aparentă a mediului
3 atinge 100 cP. Concentrația finală, atinsă în biosinteză, este de 19,7 g/L, productivitatea fiind
de 0,37 g/L h.

5 **Procesarea post-biosinteză**

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

9 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
11 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
13 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
15 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
17 energetică, în 6,3 L etanol, se mai agită în continuare circa 2 h, după care se menține în
repaus, la 8...10°C, aproximativ 10 h. Produsul precipitat se separă prin decantare și filtrare,
19 se spală cu etanol și se usucă într-o etuvă sub vid, la maximum 85°C.

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

23 **Exemplul 2.** Pentru biosinteză, se procedează ca în exemplul 1, cu diferența că faza
de cultivare a inoculului este de numai 24 h, iar mediul de cultivare în fermentație (de bio-
sinteză) conține, conform unei rețete optimizate (% g/v): glicerină 3,5; extract de porumb 1,5.

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

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

29 **Procesarea post-biosinteză**

31 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 h, apoi se lasă în repaus la
8...10°C, aproximativ 10 h.

33 Produsul sedimentat se separă prin decantare și filtrare, se spală cu etanol și se
usucă în etuvă sub vid, la maximum 85°C. Rezultă 122 g produs brut. Acesta se suspendă
35 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.

37 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),
39 montată într-un modul Pellicon standard (Millipore). Astfel, după o primă concentrare la 6 L,
se completează la volumul inițial cu apă demineralizată și se supune din nou concentrării prin
41 ultrafiltrare, îndepărtându-se astfel microsolutul (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
43 exemplul 1.

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

RO 127296 B1

Revendicare

1

Procedeu de biosinteză a pseudozanului, **caracterizat prin aceea că** micro-organismul *Pseudomonas* sp. ICCF-400 se supune unei fermentații submerse pe un mediu care conține 3,5...4% (g/v) glicerină rezultată din fabricația biodieselului, 1,5...2% (g/v) extract de porumb, 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 la o saturație de minimum 30%, se separă soluția liberă de celule, se purifică parțial și se concentrează prin microfiltrare și ultrafiltrare, obținându-se un produs brut, care apoi se redizolvă, iar soluția obținută se purifică și se concentrează prin ultrafiltrare și diafiltrare, obținându-se produsul purificat.

11



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 452/2013