



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2022 00551**

(22) Data de depozit: **08/09/2022**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2024 BOPI nr. **3/2024**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,**
ȘOS.PANDURI, NR.90, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **TĂNASE ANA MARIA, STR. ALEEA ARINII**
DORNEI, NR.8, BL.M29, SC.A, ET.9, AP.40,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• **LASCU IRINA ANDREEA,**
ȘOS.PANTELIMON, NR.3-15, BL.P2, SC.4,
ET.3, AP.73, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **AVRAMESCU SORIN,**
STR.NICOLAE FILIMON, NR.30, BL.17,
AP.17, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **STOICA ILEANA, STR.TRAIAN POPOVICI,**
NR.89, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE LA NIVEL DE BIOREACTOR
DE BIOMASĂ BACTERIANĂ CU CONȚINUT RIDICAT
DE POLIHIDROXIALCANOAȚI UTILIZĂND GLICEROL**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea de biomasă bacteriană cu conținut ridicat de polihidroxi-alcanoati (PHA) pentru sinteza unor materiale biodegradabile pentru aplicații. Procedeu, conform invenției, constă în cultivarea la nivel de bioreactor la volum de 1,5 l, respectiv, 2 l a tulpinii *Photobacterium ganghwense* C2.2 DSM 109767, la temperatura de 20°C, timp de 40..60 h, utilizând un mediu de cultură de bază modificată cu 2% glicerol pur/industrial ca

sursă de carbon și 0,2% uree ca sursă de azot, în condiții de agitare la 500 rpm și aerare 0,06 vvm, rezultând un maxim de masă celulară de 10 g/l după 48 h de proces cu o cantitate de peste 6 g/l poli(3-hidroxi-butirat) notat PHB și 189 mg/l poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerat) notat PHV.

Revendicări: 1
Figuri: 2



DESCRIEREA BREVETULUI:**PROCEDEU DE OBTINERE LA NIVEL DE BIOREACTOR, DE BIOMASĂ BACTERIANĂ CU CONȚINUT RIDICAT DE POLIHIDROXIALCANOAȚI UTILIZÂND GLICEROL****Autori: Tănase Ana Maria, Lascu Irina, Avramescu Sorin, Stoica Ileana****PREAMBUL**

Poluarea și în special poluarea cu plastic obținut din produse petroliere este o problemă majoră pentru sănătatea populației umane dar și a ecosistemelor în care acesta ajunge. Abandonarea materialelor plastice în diverse medii naturale, face ca acestea să se fragmenteze în microparticule nedegradabile, care ulterior sunt preluate de către organismele din acel ecosistem generând probleme medicale pe termen lung. Numai în Uniunea Europeană aproape 26 de milioane de tone de plastic sunt generate anual, din care peste 75% ajung în apa lacurilor și mai ales mărilor. Aceste efecte negative au fost accentuate în timpul pandemiei, din cauza cererii extrem de mare de obiecte din plastic de unică folosință. De aceea este absolut necesară înlocuirea cât mai rapidă a acestor materiale cu unele de tip biodegradabil. La ora actuală există o serie de biopolimeri care pot fi utilizați ca înlocuitori pentru confecționarea recipientelor și obiectelor de unică folosință dar de cele mai multe ori costul acestora este mai ridicat.

Unul dintre polimerii cu un potențial economic dar și ecologic foarte mare sunt polihidroxicanoații (PHA), biopolimeri sintetizați de microorganisme și în special de tulpini bacteriene, ca răspuns la diferite condiții de mediu. Mai mult decât atât, PHA prezintă avantajul de a fi complet biocompatibili deoarece nu determină nici un efect toxic asupra celulelor umane (Koller, M. (2018). Biodegradable and biocompatible polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. *Molecules*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/molecules23020362>). Cel mai studiat polimer din clasa polihidroxicanoaților este cel cu catenă scurtă (short chain length PHA-sclPHA) care este un polimer de poli(3-hidroxi-butirat) notat și PHB, ce prezintă proprietăți destul de similare cu polimerul de polipropilenă dar care este mai casant. Un alt tip de polimer ceva mai atractiv din acest punct de vedere al proprietăților este de fapt un copolimer de poly(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerat) (PHBV), chiar și atunci când 3-hidroxi-valeratul reprezintă doar un procent foarte mic. Ca urmare, acest polimer poate fi utilizat pentru o serie întreagă de aplicații de la obiecte de unică folosință până la diverse pelicule, proteze medicale și chiar și ca adjuvante în livrarea intracelulară a unor medicamente (Zhang, J., Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., da Silva, L. F., & Chen, G. Q. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 86, 144–150. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.12.035>). Acest polimer este un material regenerabil ce poate fi produs din surse de carbon care pot fi produse secundare ale altor procese industriale, pentru ca procesul să fie integrat într-o economie circulară.

În cea mai mare parte, sursele de carbon utilizate industrial pentru producția de PHA sunt produse cu un grad ridicat de puritate (RO 125102B1) și ca urmare cu cost ridicat, iar deoarece substratul de creștere reprezintă până la 50% din costurile totale de producție, acest fapt determină comercializarea PHA la un preț de mai mult de două ori mai mare decât costul polipropilenei. Nu este nevoie să se producă PHA din materii prime, scumpe, atunci când tulpinile microbiene pot folosi eficient deșeurile și subprodusele rezultate din alte procese

industriale. Un exemplu de astfel de produs secundar industrial este glicerolul brut, rezultat din producția de biodiesel. Când sunt produse 100 kg biocombustibil din uleiuri vegetale, cum ar fi cel de rapiță, 10 kg glicerol brut sunt generate ca produs secundar. Pentru a reduce, de asemenea, costul producției de biocombustibil, este necesar să obținem valoare adăugată din deșeurile de glicerol. Glicerolul brut, denumit și glicerol industrial conține glicerol 50-75%, cantități semnificative de acizi grași, hidroxizi de sodiu și potasiu 3-5%, sodiu, metale, săpun și metanol 0,5-25%. În forma sa lichidă, este un poluant al apei, iar această compoziție chimică elimină distrugerea sa prin procesul de ardere. Astfel, s-a propus utilizarea glicerolului brut în diverse procese biotehnologice, dar de cele mai multe ori aceasta implică un proces de pretratare, fie că este vorba de distilare, pentru îndepărtarea metanolului, fie de tratamente cu acizi, pentru îndepărtarea săpunurilor. Testele efectuate cu tulpina bacteriană izolată din sol, *Cupriavidus necator*, în ceea ce privește producerea de PHA utilizând ca sursă de carbon glicerol industrial, au aratat că aceasta prezintă o rată de creștere și producție limitate, din cauza concentrației de sodiu și prezenței metanolului. (Salakkam, A., & Webb, C. (2015). The inhibition effect of methanol, as a component of crude glycerol, on the growth rate of *Cupriavidus necator* and other micro-organisms. *Biochemical Engineering Journal*, 98, 84–90. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2015.02.024>). Există o necesitate majoră de găsire a unor tulpini bacteriene capabile să genereze o cantitate de biomasă semnificativă, care să metabolizeze amestecuri de surse de carbon ieftine și care producă un conținut ridicat de granule de polimer (Koller, M., & Obruča, S. (2022). Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates from glycerol: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2022.102333>). Cu toate acestea, este necesară găsirea unei anumite tulpini bacteriene și stabilirea parametrilor necesari procesului de multiplicare și producere de biopolimer.

2. Problema tehnică pe care invenția actuală o rezolvă constă în utilizarea glicerolului industrial ca sursă de carbon într-un proces la nivel de bioreactor pentru a obține biomasă cu conținut crescut de polihidroxicanoați.

3. Soluția pe care o propune prezenta invenție este procedeul de cultivare la nivel de bioreactor la volum de 1.5L a tulpinii *Photobacterium ganghwense* C2.2 DSM 109767 utilizând mediu de cultură cu o compoziție specifică, parametrii de proces. Pentru obținerea unei cantități mari de biomasă ce conține un procent ridicat de PHA, procesul este necesar să aibă loc la anumiți parametri ce fac obiectul acestui brevet. De noul procedeu ar putea să beneficieze eventualii producători de materiale biodegradabile pentru extracția și modelarea polimerului în vederea realizării de obiecte de unică folosință sau de materiale inovative din domeniul medical.

4. Avantajele invenției: Procedeul de cultivare prezintă avantajul că are loc într-un timp foarte scurt 48-60h, la temperaturi ce determină un cost redus de energie, anume 20°C, utilizează medii de cultură ieftine, sursa de azot este reprezentată de uree, o sursă de asemeni cu costuri reduse, iar sursa de carbon este reprezentată de glicerol, ca resursă din a doua generație de biomasă, ceea ce dă posibilitatea integrării procesului prezent într-o economie de tip circular.

5. Prezentarea pe scurt a figurilor

Figura 1A. Evaluarea creșterii densității optice (DO_{600}) și evoluției pH-ului, pe parcursul a 96h de cultivare la nivel de bioreactor, având ca sursă de carbon glicerol pur și uree.

Figura 1B. Evaluarea acumulării de biomasă, pe parcursul a 96h ale procesului biotehologic, având ca sursă de carbon glicerol pur și uree.

Figura 1C. Evaluarea cantității de PHB în timpul procesului la nivel de bioreactor

Figura 1D. Evaluarea cantității de PHV în timpul procesului la nivel de bioreactor

Figura 2A Evaluarea creșterii densității optice DO_{600} și evoluției pH-ului, pe parcursul a 96h de cultivare la nivel de bioreactor, având ca sursă de carbon glicerol industrial și uree.

Figura 2B Evaluarea acumulării de biomasă, pe parcursul a 96h de proces biotehologic, având ca sursă de carbon glicerol industrial și uree.

Figura 2C Evaluarea cantității de PHB produs la nivel de bioreactor având ca sursă de carbon glicerol industrial.

6. Prezentarea în detaliu a două exemple de realizare a invenției cu referire la figuri

DESCRIERE Tulpina de interes pentru obținerea de biomasă cu conținut crescut de polimer a fost izolată din sediment marin (Marea Neagră) prelevat în luna februarie, la temperatură a apei mării de 2° C, salinitatea 17‰ și pH 7. Această tulpină a fost identificată ca fiind *Photobacterium ganghwense* (Lascu, I., Mereuță, I., Chiciudean, I., Hansen, H., Avramescu, S. M., Tănase, A. M., & Stoica, I. (2021). Complete genome sequence of *Photobacterium ganghwense* C2.2: A new polyhydroxyalkanoate production candidate. *MicrobiologyOpen*, 10(2), e1182. <https://doi.org/10.1002/MBO3.1182>) și face parte din Colecția de Microorganisme a Centrului Microgen al Facultății de Biologie, Universitatea din București dar și din Colecția de Microorganisme și Culturi Celulare din Germania (DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) cu numărul de catalog DSM 109767

Pentru menținerea tulpinii în laborator și pentru pregătirea inocului pentru bioreactor este necesar ca aceasta să fie cultivată pe un mediu de bază denumit în literatura (Xiao, N., & Jiao, N. (2011). Formation of polyhydroxyalkanoate in aerobic anoxygenic phototrophic bacteria and its relationship to carbon source and light availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7445–7450. <https://doi.org/10.1128/AEM.05955-11>) c-ASW apă de mare artificială (Xiao & Jiao, 2011), la care se adaugă 1g/L extract de drojdie și 5g/L peptonă. Compoziția mediului la 1L: 4.0 g $NaSO_4$, 0.2 g KH_2PO_4 , 0.25 g NH_4Cl , 20.0 g $NaCl$, 3.0 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.5 g KCl , 0.15 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, la care se adaugă după sterilizare 15 min 121°C, 1 ml soluție oligoelemente, 10 ml soluție de vitamine și 0.19 g $NaHCO_3$. Soluția de oligoelemente care următoarea compoziție la 1L: 2.1 g $Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$, 13 ml 25% (vol/vol) HCl , 5.2 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$, 30 mg H_3BO_3 , 0.1 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.19 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.144 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, și 36 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$. Soluția de vitamine conține 0.2 g biotină, 2.0 g acid nicotinic, și 0.8 g acid 4-aminobenzoic, la 1L de soluție. Toate soluțiile adăugate la mediu se sterilizează în prealabil prin filtrare cu ajutorul filtrelor microbiologice

de 0.2 μm . Pentru varianta solidă a acestui mediu de cultură se adaugă 20 g agar la 1L de mediu. În ambele situații mediul se ajustează înainte de autoclavare la pH 7.

Mediu utilizat pentru obținerea de biomasă cu conținut crescut de polimer este realizat pornind de la rețeta anterioară din care au fost eliminate 0.25 g NH_4Cl , 1 g peptonă și 5 g extract de drojdie, aceste componente au fost înlocuite cu **varianta 1**: 0.2% uree și 2% glicerol pur, adică glicerol de uz de laborator, **varianta 2**: 3.0 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2% uree, 2% glicerol industrial preluat de la o unitate industrială de producere de biocombustibili. Pentru ambele variante de mediu de producere se adaugă soluțiile de oligoelemente, vitamine și NaHCO_3 , precizate anterior.

Pentru obținerea de celule cu conținut ridicat de polihidroxi-alcanoati, s-a pregătit un volum de 1.5L de mediu de producere varianta 1, respectiv apă de mare artificială suplimentată cu 2% glicerol pur drept sursă de carbon, a fost ajustat pH-ul la valoarea 7 și a fost sterilizat direct în vasul bioreactor prin autoclavare 15 minute la 121°C. După autoclavare s-au adăugat: 0.2% uree, 1.5ml soluție oligoelemente, 15 mL soluție de vitamine și 7.5 mL NaHCO_3 de concentrație 3.8%. Inoculul pentru această cultivare de volum mare a fost realizat prin cultivarea tulpinii pe mediu de cultură cu triptonă și extract de drojdie, la un volum de 300 mL, 24 h, 20°C, 150 rpm, până la o densitate optică la 600 nm de 4. Inocularea s-a făcut până la atingerea unei densități optice inițiale de 0.5, măsurată în vasul bioreactorului.

Parametrii procesului au fost: mediul de cultură descris mai sus, pentru care după adăugarea sursei de azot a ajuns la $\text{pH}_{\text{inițial}}$ 8.5, densitate optică a culturii bacteriene direct în incinta de cultivare 0.5, 20°C, aerare 0.06 vvm și agitare 500 rpm folosind o turbină Rushton.

Pentru monitorizarea calitativă a acumulării de granule de polihidroxi-alcanoati, s-a prelevat 1 mL cultură la care s-a adăugat 40 μL Soluție de Roșu de Nil (în etanol, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). După un interval 30 minute incubare la întuneric, din cultura astfel tratată, s-au efectuat preparate proaspete lamă-lamelă ce au fost examinate la microscopul cu epifluorescență (Zeiss Axioplan, Carl Zeiss, Germany; FS00 (λ_{exc} : 545 \pm 25 nm, λ_{em} : 560–710 nm), în ceea ce privește prezența în celule a unor incluziuni fluorescente.

Pentru determinarea **cantitativă** a conținutului de polimer din masa celulară obținută a fost obținută printr-o reacție de metanoliză a aproximativ 20 mg celule liofilizate și mojarate în prealabil. Această reacție a constat în adăugarea de 1.5% acid sulfuric/metanol (2 mL) și cloroform (3 mL), urmată de incubare la 100°C timp de 72 h, în tuburi de sticlă rezistente, cu capac special care să împiedice evaporarea. Drept standard intern a fost utilizat acidul benzoic (2 mg/reacție) iar drept standard pentru polimerul de interes, s-a utilizat poly [(R)-3-hydroxybutyric acid] (PHB) și respectiv poly [(R)-3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid] (PHBV) (#363502, # 403121, Sigma). La sfârșitul etapei de metanoliză, 2 mL soluție amoniacală 12.5% a fost adăugată peste reacție pentru separarea fazei apoase de faza organică, ce conține derivații metilesteri ai monomerilor proveniți din polimerul intracelular ce ulterior a fost analizată prin gaz cromatografie utilizând un sistem Varian 3800 echipat cu un detector de tip He Pulsed Discharge Detector (Vici) și o coloană CPSIL 5CB (100% dimetilpolisiloxane, 30 m, 0.25 mm diametru, 2 μm grosime film) (Varian). Condițiile de operare ale sistemului au fost setate astfel: volum de injecție 1 μL split 50%, gaz purtător heliu de puritate 6.0 la o presiune de 13.81 psi, și un debit total de 9 mL/min, debit gaz 1 mL/min, purge flow 3.0 mL/min, increment temperatură 10°C/min începând cu 50°C până la o

temperatură maximă de 220°C, temperatura injectorului 250°C, temperatura detector 250 °C. Analiza datelor a fost efectuată folosind programul Varian Star Workstation 6.9.

EXEMPLUL 1. PARAMETRII DE CULTIVARE LA NIVEL DE BIOREACTOR DE PENTRU OBȚINEREA DE BIOMASĂ CU CONȚINUT RIDICAT DE POLIHIDROXIALCANOAT, UTILIZÂND UREE ȘI GLICEROL PUR.

Evaluarea creșterii biomasei bacteriene în timpul cultivării la nivel de bioreactor a fost realizată prin prelevarea unui volum de 42 mL probă la fiecare 12 h de cultivare. Din acest volum, 1 mL a fost utilizat prin măsurarea DO₆₀₀ pentru evaluarea globală a multiplicării celulare (Figura 1), în timp ce sonda de pH a bioreactorului ne indica valoarea de pH pe care cultura a atins-o la fiecare moment de prelevare (Figura 1A). După cum se poate observa (Figura 1A) condițiile de cultivare menționate mai sus au dus la obținerea unor densități optice de peste 40, ceea ce sugerează o masă celulară foarte bună și pretabilă pentru aplicații biotehnologice. Valorile maxime au fost atinse după 48 până la 60 h de cultivare, ceea ce presupune o creștere de 80 de ori a densității celulare.

Volumul de 40 mL a fost centrifugat în tuburi de plastic precântărite pentru obținerea sedimentului celular. După centrifugare la 11.500 rpm 5 minute, supernatantul a fost aruncat iar celulele au fost conservate la -20°C în vederea liofilizării, și ulterior pentru aflarea masei celulare uscate (CDW) (Figura 1B). Liofilizarea sedimentului celular s-a realizat la sfârșitul celor 96 h pentru toate sedimentele obținute în aceeași tranșă prin utilizarea unui liofilizator CHRIST ALPHA1-2 LD PLUS, Fisher Scientific, USA, la o temperatură de -55°C timp de 24 h. Rezultatele indică obținerea unei mase celulare uscate de 10 g/L după 48-60 ore de cultivare, ceea ce este o performanță foarte bună pentru condițiile de cultivare menționate (Figura 1B).

Pentru acuratețea măsurărilor duplicatul biologic a fost supus metanolizei și respectiv analizei cantitative în duplicat tehnic. Ca urmare deviația standard este rezultatul atât a variației biologice cât și a eventualelor erori tehnice, valorile extrem de mici ale acestora indică faptul că parametrii procesului prezentat sunt stabili și reproductibili.

Rezultatele obținute (Figura 1C și Figura 1D) indică faptul că în condițiile stabilite pentru procesul la nivel de bioreactor, tulpina bacteriană a produs o cantitate de peste 6 g/L PHB și 189 mg/L PHV, ceea ce reprezintă 65% din greutatea masei celulare totale, ceea ce conduce la o productivitate de 0.134 g/L/h, în doar 48 h de desfășurare a procesului.

EXEMPLUL 2. PARAMETRII DE CULTIVARE LA NIVEL DE BIOREACTOR DE 2L PENTRU OBȚINEREA DE BIOMASĂ CU CONȚINUT RIDICAT DE POLIHIDROXIALCANOAȚI, UTILIZÂND UREE ȘI GLICEROL BRUT/ INDUSTRIAL

Pentru obținerea de biomasă celulară din tulpina *Photobacterium ganghwense* C2.2 DSM 109767, cu conținut de polihidroxialcanoati, s-a procedat identic cu exemplul 1, cu menținerea ca a fost utilizată varianta 2 de mediu de cultură. Toți parametrii procesului au fost identici, mai puțin sursa de carbon reprezentată de glicerolul brut.

Glicerolul brut/industrial utilizat ca sursă de carbon a fost obținut de la SC Mac Farmacons SRL, cu sediul în jud. Cluj, ca produs secundar din producerea de biocombustibil printr-un proces de transesterificare din uleiuri de rapiță, uleiuri uzate sau grăsimi animală. Fișa tehnică menționează un conținut de aproximativ 50% glicerol, resturi de hidroxizi de potasiu și sodiu,

resturi de metanol, apă și săpunuri sub formă de metil esteri de acizi grași ca rezultat al procesului de saponificare prin care se obțin biocombustibili. Din cauza prezenței acizilor grași în mediul de cultură aceasta a prezentat la momentul inițial un aspect neomogen, cu aglomerări de lipide, chiar depuneri pe elementele bioreactorului, care la finalul cultivării au fost complet omogenizate în urma procesului.

Valorile densității optice măsurate la fiecare 12 h a procesului (Figura 2A) au atins un maxim de aproximativ 23 la 36 de ore de la inițierea procesului. În ceea ce privește masa celulară uscată obținută, aceasta a fost de 13.2 g/L la 48 de ore de incubare și s-a menținut la acest nivel până la final (Figura 2B). Această valoare de biomasă este foarte bună pentru cultivarea pe o sursă de carbon așa de complexă, ceea ce subliniază atât capacitatea tulpinii de multiplicare cât mai ales condițiile stabilite pentru proces, ca fiind favorabile pentru obținerea unei cantități considerabile de masa celulară cu conținut de PHB.

Analiza cantitativă a mojaratelor celulare ca în exemplul anterior a indicat un conținut de PHB de 1.8 g/L (Figura 2C) la 48 de ore de proces, polimer constituit în exclusivitate de 3 hidroxibutirat, cu o productivitate de 0.05 g/L/h.

REVENDICARE

Procedeu de obținere a unei cantități semnificative de masă celulară bacteriană de *Photobacterium ganghwense* C2.2 DSM 109767 cu conținut ridicat de polihidroxialcanoăți prin utilizarea parametrilor de cultivare la nivel de bioreactor: mediu de cultură specific descrise anterior, uree, glicerol sau glicerol industrial/brut, 20°C, agitare 500 rpm și aerare 0.06 vvm.

FIGURI BREVET CU TITLUL: " *PROCEDEU DE OBTINERE LA NIVEL DE BIOREACTOR DE BIOMASĂ BACTERIANĂ CU CONȚINUT RIDICAT DE POLIHIDROXIALCANOAȚI UTILIZÂND GLICEROL* "

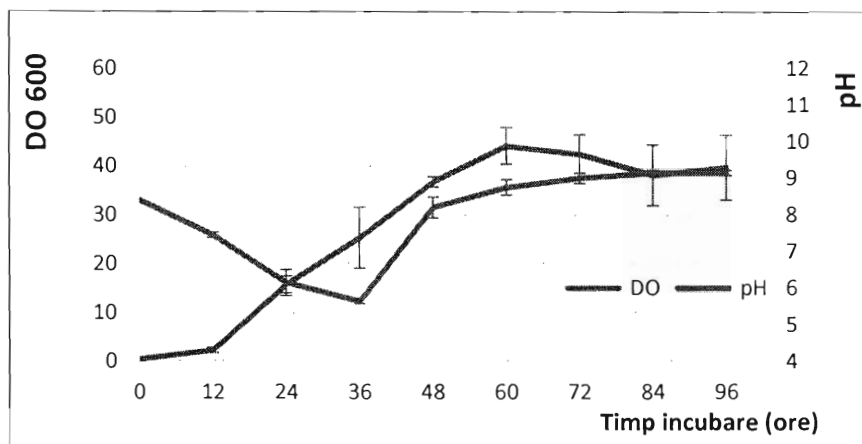


Figura 1A. Evaluarea creșterii densității optice DO_{600} și evoluției pH-ului, pe parcursul a 96 h de cultivare la nivel de bioreactor, având ca sursă de carbon glicerol pur și uree.

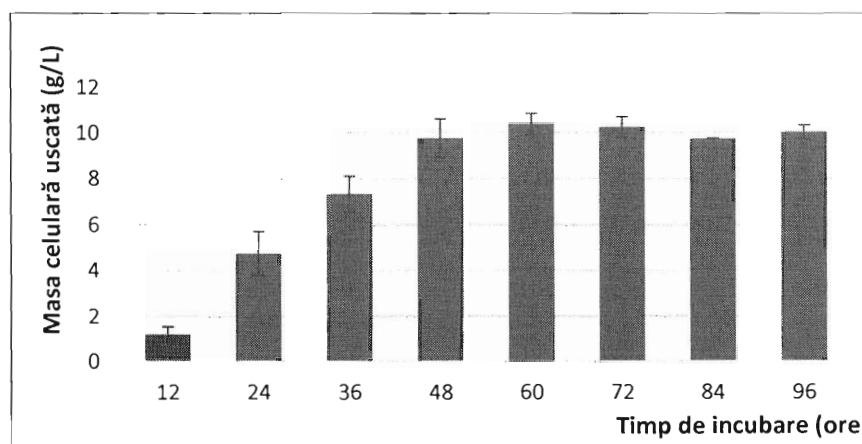


Figura 1B. Evaluarea acumulării de biomasă, pe parcursul a 96 h ale procesului biotehnologic, având ca sursă de carbon glicerol pur și uree.

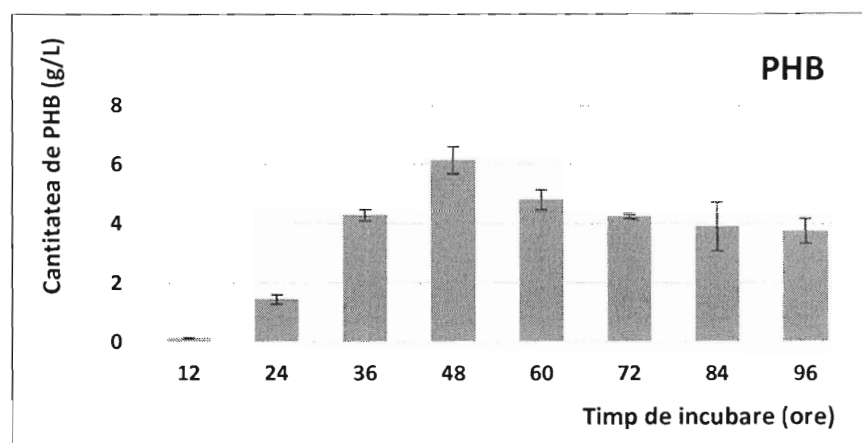


Figura 1C. Evaluarea cantității de PHB în timpul procesului la nivel de bioreactor

25

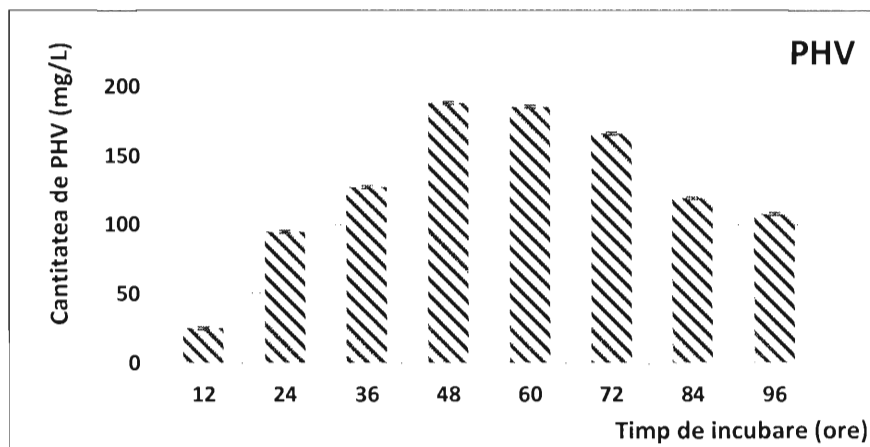


Figura 1D. Evaluarea cantității de PHV în timpul procesului la nivel de bioreactor

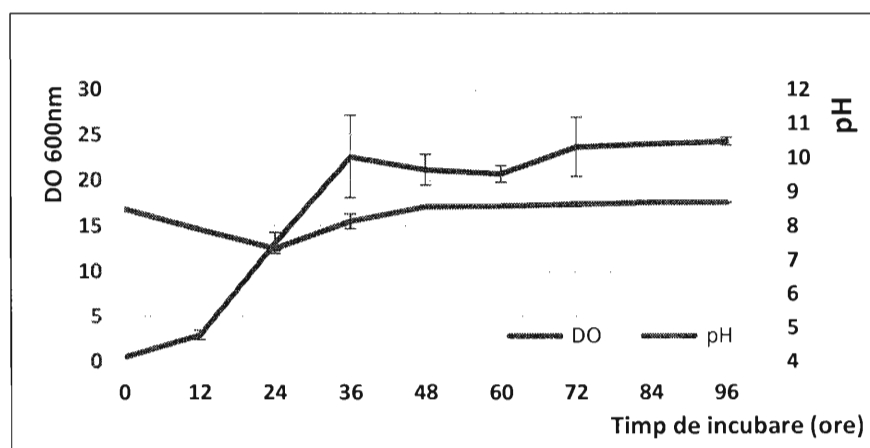


Figura 2A Evaluarea creșterii densității optice DO₆₀₀ și evoluției pH-ului, pe parcursul a 96h de cultivare la nivel de bioreactor, având ca sursă de carbon glicerol industrial și uree.

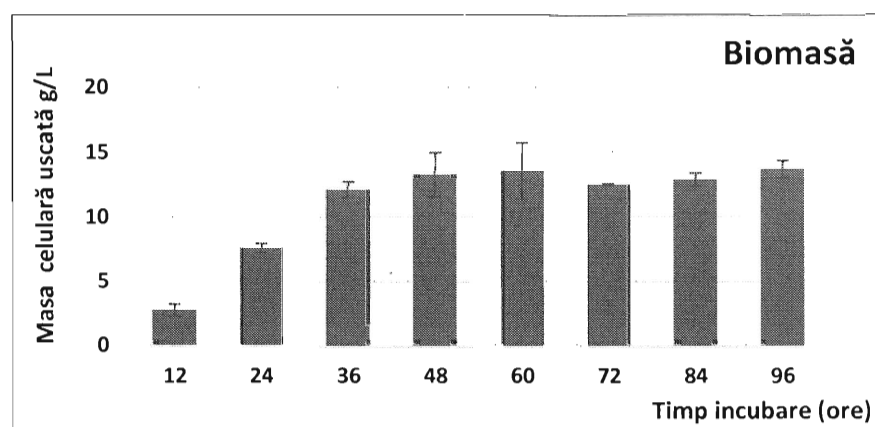


Figura 2B Evaluarea acumulării de biomasă, pe parcursul a 96h de proces biotehnologic, având ca sursă de carbon glicerol industrial și uree.

27

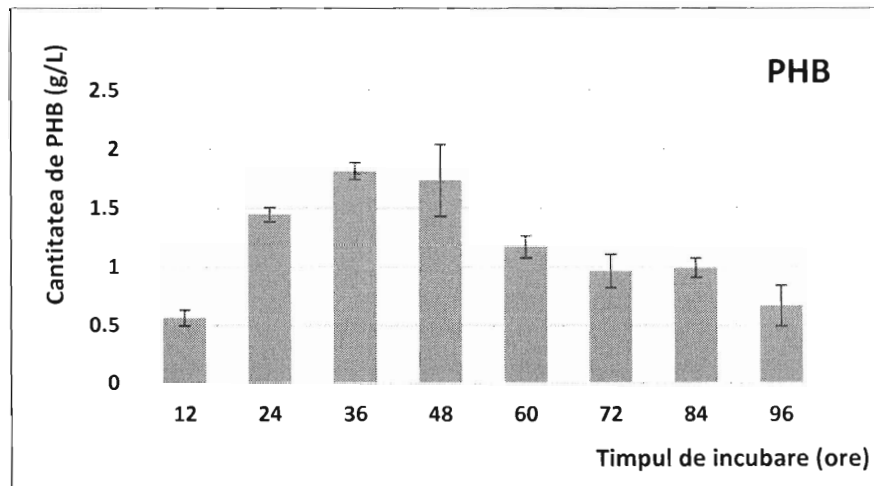


Figura 2C Evaluarea cantității de PHB produs la nivel de bioreactor având ca sursă de carbon glicerol industrial.