

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 741**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/04** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2013 PCT/JP2013/085163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14104318**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2013 E 13869657 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2940145**

54 Título: **Celulosa bacteriana y bacteria que la produce**

30 Prioridad:

**28.12.2012 JP 2012289043**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.03.2018**

73 Titular/es:

**TAJIMA, KENJI (50.0%)  
111, 2-2, Kotoni 1-jyo 3-chome, Nishi-ku,  
Sapporo-shi  
Hokkaido, 0630811, JP y  
KOSE, RYOTA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAJIMA KENJI;  
KOSE RYOTA y  
SAKURAI HIROAKI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Nuria**

ES 2 660 741 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Celulosa bacteriana y bacteria que la produce

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una celulosa bacteriana y a una bacteria que la produce, y, en particular, a una celulosa bacteriana con excelente dispersibilidad en líquidos y a una bacteria que la produce.

10 Antecedentes de la técnica

Una celulosa bacteriana normalmente consiste en una nanofibra que tiene un ancho de aproximadamente 50 nm, y ha sido el centro de atención como un material capaz de usarse en diversos campos industriales, ya que tiene características tales como alta resistencia mecánica, y biocompatibilidad y biodegradabilidad. La celulosa bacteriana normalmente se obtiene en forma de una película que consiste en una sustancia gelificada (denominada, de aquí en adelante, "película gelificada") en la superficie del medio de cultivo, sometiendo a una bacteria, tal como una bacteria de ácido acético, a un cultivo estacionario; sin embargo, la película gelificada tiene el problema de ser poco aplicable como material real, ya que tiene una moldeabilidad y una miscibilidad bajas con otras sustancias cuando se aplica a materiales, y tiene un alto coste debido a su baja eficiencia de producción.

20 Para abordar dicho problema, existe la necesidad de una celulosa bacteriana que no se encuentre en forma de una película gelificada, sino que sea dispersable en líquidos y, por lo tanto, de excelente aplicabilidad. Por ejemplo, el documento no de patente 1 desvela una celulosa bacteriana obtenida sometiendo a *Acetobacter xylinum* subespecie *sucrofermentaciones* para el cultivo aireado y agitado, y el documento no de patente 2 también desvela una celulosa bacteriana obtenida sometiendo la cepa JCM10150 de *Gluconacetobacter xylinum* a un cultivo con agitación giratoria en un medio de cultivo que contiene carboximetilcelulosa (CMC).

Lista de citas

30 Literatura no de patente

Documento no de patente 1: Yoshinaga *et al.*, *Kagaku ToSeibutsu* (Chemistry and Biology), vol. 35, n.º 11, pág. 7-14, 1997.

35 Documento no de patente 2: S. Warashina *et al.*, 2010 "Cellulose R&D Abstracts at the 17th Annual Meeting of the Cellulose Society", pág. 98, 2010.

Sumario de la invención

Problema técnico

40 Sin embargo, la celulosa bacteriana descrita en el documento no de patente 1 no es de alta dispersibilidad en agua, como es evidente a partir de la descripción de que no se produce usando un medio de cultivo que contenga CMC que tenga el efecto de mejorar la dispersabilidad de una celulosa bacteriana y que se disperse "en forma de pequeños granos o fibras" en agua (*ibid*, página 9, columna derecha). Por consiguiente, la celulosa bacteriana es insuficiente en términos de moldeabilidad y miscibilidad con otras sustancias para un uso práctico. La celulosa bacteriana descrita en el documento no de patente 2 tampoco tiene alta dispersibilidad en agua, ya que el agua que contiene la celulosa bacteriana es más alta en turbidez blanca en el fondo que en la parte superior, y se ha observado que tiene sedimentación y los granos de celulosa son visiblemente grandes (*ibid*; Figura 1) en cualquiera de los casos en los que la cantidad de adición de CMC al medio de cultivo es del 0,5 %, 1 % y 2 %. Por consiguiente, esta celulosa bacteriana es insuficiente en términos de moldeabilidad y miscibilidad con otras sustancias, necesarias para el uso práctico.

50 Por lo tanto, las celulosas bacterianas descritas en ambos documentos no de patente 1 y 2 tienen una moldeabilidad insuficiente como material e insuficiente miscibilidad con otras sustancias, y también son poco practicables en términos de eficacia de producción de material.

60 La presente invención se ha realizado para resolver dichos problemas, y un objeto de la misma es proporcionar una celulosa bacteriana con alta dispersibilidad en líquidos, moldeabilidad y miscibilidad favorables con otros materiales para su uso práctico, y excelente aplicabilidad como material real, y una bacteria que produzca la celulosa bacteriana.

Solución del problema

65 Como resultado de estudios exhaustivos, los presentes inventores han descubierto que la celulosa bacteriana es altamente dispersable en agua, que se obtiene sometiendo la cepa S1D9587 a una nueva cepa de *Gluconacetobacter intermedius* (número de acceso NITE BP-01495) (de aquí en adelante, algunas veces

denominada "cepa NEDO-01 (cepa de *G. intermedius* SIID9587)" en cultivo agitado en un medio de cultivo que contiene CMC usando un subproducto que contiene glicerol generado en la producción de un combustible biodiesel a partir de aceite vegetal (subproducto combustible biodiesel; BDF-B, glicerina residual), glicerol reactivo o melaza como fuente de carbono, logrando así las siguientes invenciones.

5 (1) La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención tiene la característica física de una transmitancia de luz a una longitud de onda de 500 nm de agua que contiene celulosa bacteriana a una concentración final de  $0,1 \pm 0,006$  % (p/p) del 35 % o superior.

10 (2) La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención tiene además la característica física de un volumen de retención del máximo superior del cromatograma en la cromatografía de permeación en gel realizada en las siguientes condiciones i) a vi) de 2,5 ml inclusive a 3,0 ml no inclusive:

15 i) columna: una columna de 6,0 mm de diámetro interior y 15 cm de longitud, empaquetada con un polímero de metacrilato que tiene un diámetro de partícula de 9  $\mu$ m; ii) columna de protección: 4,6 mm de diámetro interior y 3,5 cm de longitud; iii) temperatura de la columna: 35 °C; iv) caudal de alimentación: 0,07 ml/minuto; v) eluyente: una solución acuosa del 40 al 42 % (p/p) de hidróxido de tetrabutilfosfonio; y vi) concentración final de la celulosa bacteriana en el eluyente: 0,2 % (p/p).

20 (3) La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención se produce preferentemente mediante la asimilación de BDF-B.

(4) La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención se produce preferentemente mediante la asimilación de 1 o 2 o más seleccionados del grupo que consiste en azúcar, un subproducto que contiene sacarosa generado en la producción de azúcar, y sus hidrolizados, y azúcar isomerizado.

25 (5) El subproducto es preferentemente melaza cuando la celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención se produce mediante la asimilación del subproducto que contiene sacarosa generado en la producción de azúcar.

(6) La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención puede ser aquella producida por *Gluconacetobacter intermedius*.

30 (7) La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención puede ser aquella producida por la cepa SIID9587 de *Gluconacetobacter intermedius* (cepa NEDO-01) (número de acceso NITE BP-01495).

(8) La bacteria de acuerdo con la presente invención se caracteriza por producir la celulosa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de (1) a (5) anteriores.

35 (9) La bacteria de acuerdo con la presente invención puede ser la cepa SIID9587 de *Gluconacetobacter intermedius* (cepa NEDO-01) (número de acceso NITE BP-01495) que produce la celulosa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de (1) a (5) anteriores.

#### Efectos ventajosos de la invención

40 La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención puede proporcionar una celulosa bacteriana casi uniformemente dispersable en líquidos tales como el agua, y puede contribuir a una mejora de la calidad del producto final y a la eficacia de producción o a una reducción en el coste de producción, ya que esta celulosa bacteriana tiene una moldeabilidad y una miscibilidad excelentes con otras sustancias. La presente invención puede proporcionar una celulosa bacteriana casi uniformemente dispersable en líquidos mediante la purificación en condiciones moderadas sin requerir etapas de refinado con un mezclador y similares, y puede proporcionar una

45 celulosa bacteriana que tenga un peso molecular medio relativamente alto. Además, la presente invención puede contribuir a la utilización eficaz de los recursos mediante el uso de un subproducto que contenga sacarosa generado en la producción de azúcar, tal como BDF-B o melaza, como fuente de carbono, y permite reducir el precio de la celulosa bacteriana. Además, la presente invención puede proporcionar de manera eficiente una gran cantidad de celulosa bacteriana mediante la producción con el uso de *Gluconacetobacter intermedius* o la cepa SIID9587 de *Gluconacetobacter intermedius* (cepa NEDO-01).

50

#### Breve descripción de los dibujos

55 [Figura. 1] La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un protocolo para aislar una bacteria que produce una celulosa bacteriana mediante la asimilación de BDF-B. En la figura, la celulosa bacteriana se abrevia como BC.

[Figura 2-1] La Figura 2-1 es un diagrama que muestra los puntos de identidad y la diferencia entre las secuencias de nucleótidos de ADNr 16S de la cepa SIID9587 y la cepa TF2 de *G. intermedius*. En la figura, los puntos de identidad en las secuencias de nucleótidos están representados por marcas \* y los puntos de diferencia están representados por recuadros cuadrangulares. En la figura, *G. intermedius* indica la cepa TF2 de *G. intermedius*.

60

[Figura 2-2] La Figura 2-2 es un diagrama que muestra los puntos de identidad y la diferencia entre las secuencias de nucleótidos de ADNr 16S de la cepa SIID9587 y la cepa TF2 de *G. intermedius*. En la figura, los puntos de identidad en las secuencias de nucleótidos están representados por marcas \* y los puntos de diferencia están representados por recuadros cuadrangulares. En la figura, *G. intermedius* indica la cepa TF2 de *G. intermedius*.

65

[Figura 3] La Figura 3 es un par de tablas que muestran las propiedades bacteriológicas de la cepa SIID9587.

[Figura 4] La Figura 4 es una serie de gráficos que muestran los espectros IR de una celulosa bacteriana obtenida sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) al cultivo estacionario (gráfico superior) y los productos obtenidos mediante cultivo aireado y agitado usando BDF-B y glicerol reactivo como fuentes de carbono (gráficos central e inferior).

[Figura 5] La Figura 5 es una serie de fotografías que muestran la aparición de aguas que contienen celulosas bacterianas obtenidas sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a cultivo aireado y agitado y a cultivo estacionario (izquierda y medio) y una nanofibra de celulosa bacteriana derivada de pulpa (derecha).

[Figure 6] La Figura 6 es una serie de dibujos que muestran la transmitancia de la luz a una longitud de onda de 500 nm de aguas que contienen celulosas bacterianas obtenidas sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a cultivo aireado y agitado usando melaza y glicerol reactivo como fuentes de carbono, respectivamente, y la cantidad de celulosa bacteriana producida (cantidad de BC producida) y la velocidad de producción de la misma (velocidad de producción de BC).

[Figure 7] La Figura 7 es una serie de dibujos que muestran la transmitancia de la luz a una longitud de onda de 500 nm de aguas que contienen celulosas bacterianas obtenidas sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) y las bacterias conocidas productoras de celulosa bacteriana, que son la cepa ATCC23769 de *G. hansenii*, la cepa ATCC53582 de *G. xylinus*, la cepa ATCC700178 de *G. xylinus* (BPR2001), la cepa JCM10150 de *G. xylinus*, la cepa DSM11804 de *G. intermedius* y la cepa KCCM40274 de *G. xylinus* en cultivo aireado y agitado, y la cantidad de BC producida, la velocidad de producción de BC y la proporción de la velocidad de producción de BC.

[Figura 8] La Figura 8 es un gráfico que muestra los cromatogramas de la cromatografía de permeación en gel de una celulosa bacteriana obtenida sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) al cultivo de rotación usando BDF-B como fuente de carbono (muestra B), una nanofibra de celulosa derivada de pulpa (solución de CNF derivada de pulpa) y pululano.

[Figura 9] La Figura 9 es un par de fotografías que muestran los anchos de las fibras y las imágenes de celulosas bacterianas observadas por microscopía electrónica de transmisión obtenidas sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a cultivo aireado y agitado (solución de BC de cultivo agitado) y cultivo estacionario (solución de BC de cultivo estacionario tratado en mezclador).

[Figura 10] La Figura 10 es un par de fotografías que muestran las imágenes de una celulosa bacteriana observadas por microscopía electrónica de transmisión obtenidas sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a cultivo aireado y agitado (solución de BC de cultivo agitado) y nanofibra de celulosa derivada de pulpa (solución de CNF derivada de pulpa).

[Figura 11] La Figura 11 es un par de fotografías que muestran las imágenes de una celulosa bacteriana observadas por microscopía de polarización obtenidas sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a cultivo aireado y agitado (solución de BC de cultivo agitado) y nanofibra de celulosa derivada de pulpa (solución de CNF derivada de pulpa).

[Figure 12] La Figura 12 es un gráfico que muestra el peso de las celulosas bacterianas obtenidas sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) y las bacterias conocidas productoras de celulosa bacteriana que son la cepa ATCC23769 de *G. hansenii*, cepa ATCC53582 de *G. xylinus* y cepa ATCC700178 de *G. xylinus* (BPR2001) al cultivo estacionario usando glicerol reactivo o BDF-B como fuente de carbono.

[Figure 13] La Figura 13 es un gráfico que muestra el peso de las celulosas bacterianas obtenidas sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) y las bacterias conocidas productoras de celulosa bacteriana que son la cepa ATCC53582 y la cepa ATCC23769, a cultivo de agitación usando glicerol reactivo o BDF-B como fuente de carbono.

#### Descripción de las realizaciones

A continuación, se describirán la celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención y una bacteria que la produce en detalle. La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención se refiere a una celulosa producida por una bacteria.

Para el fin de la presente invención, la celulosa bacteriana “que se dispersa” en un líquido tal como agua se refiere a la celulosa bacteriana que flota o se suspende en el líquido. La alta dispersabilidad se refiere, por ejemplo, al diámetro de partícula o al ancho de la fibra de una celulosa bacteriana como un dispersoide que es relativamente pequeño en un líquido, o la celulosa bacteriana como un dispersoide que flota o se suspende de forma relativamente uniforme en el líquido.

La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención tiene una alta dispersabilidad en un grado tal que se dispersa casi uniformemente en un líquido. En el presente documento, el líquido en el que se dispersa la celulosa bacteriana puede ser cualquiera de un disolvente orgánico y un disolvente acuoso; sin embargo, es preferible un disolvente acuoso.

La dispersabilidad de una celulosa bacteriana se puede medir, por ejemplo, usando la transmitancia de la luz como índice; la relación muestra que una mayor dispersabilidad da lugar a una mayor transmisión de la luz y una menor dispersabilidad da lugar a una menor transmitancia de la luz. La transmitancia de la luz se puede determinar

proporcionando agua que contenga la celulosa bacteriana a una concentración predeterminada en un espectrofotómetro, irradiando el agua con luz a una longitud de onda predeterminada, y midiendo la cantidad de luz transmitida.

5 La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención tiene la característica física de una transmitancia de la luz a una longitud de onda de 500 nm de agua que contiene celulosa bacteriana a una concentración final de  $0,1 \pm 0,006$  % (p/p) del 35 % o superior. En el presente documento, los ejemplos de la transmitancia de la luz a una longitud de onda de 500 nm de agua que contiene la celulosa bacteriana a una concentración final de  $0,1 \pm 0,006$  % (p/p) de acuerdo con la presente invención pueden incluir 35 % o superior, así como del 36 % o superior, 37 % o superior, 38 % o superior, 39 % o superior, 40 % o superior, del 35 % al 99 % (ambos inclusive), del 36 % al 99 % (ambos inclusive), del 37 % al 99 % (ambos inclusive), del 38 % al 99 % (ambos inclusive), del 40 % al 99 % (ambos inclusive), del 35 % al 95 % (ambos inclusive), del 36 % al 95 % (ambos inclusive), del 37 % al 95 % (ambos inclusive), del 38 % al 95 % (ambos inclusive), del 40 % al 95 % (ambos inclusive), del 35 % al 90 % (ambos inclusive), del 36 % al 90 % (ambos inclusive), del 37 % al 90 % (ambos inclusive), del 38 % al 90 % (ambos inclusive), del 40 % al 90 % (ambos inclusive), del 35 % al 85 % (ambos inclusive), del 36 % al 85 % (ambos inclusive), del 37 % al 85 % (ambos inclusive), del 38 % al 85 % (ambos inclusive), del 40 % al 85 % (ambos inclusive), del 35 % al 80 % (ambos inclusive), del 36 % al 80 % (ambos inclusive), del 37 % al 80 % (ambos inclusive), del 38 % al 80 % (ambos inclusive) del 40 % al 80 % (ambos inclusive).

20 La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención también puede tener un alto peso molecular medio en comparación con el de una celulosa derivada de plantas, tal como una nanofibra de celulosa derivada de pulpa. El peso molecular medio de una celulosa puede medirse usando, por ejemplo, un cromatograma en la cromatografía de permeación en gel como índice; la relación muestra que un menor peso molecular da lugar a un mayor volumen de retención del máximo superior de dicho cromatograma y que un mayor peso molecular da lugar a un menor volumen de retención. En concreto, la celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención puede tener la característica física de un volumen de retención del máximo superior del cromatograma en la cromatografía de permeación en gel realizada en las siguientes condiciones i) a vi) de 2,5 ml inclusive a 3,0 ml no inclusive: una columna de 6,0 mm de diámetro interior y 15 cm de longitud, empaquetada con un polímero de metacrilato que tiene un diámetro de partícula de 9  $\mu$ m; ii) columna de protección es de 4,6 mm de diámetro interior y 3,5 cm de longitud; 25 iii) la temperatura de la columna es de 35 °C; iv) el caudal de alimentación es de 0,07 ml/minuto; v) el eluyente es una solución acuosa del 40 % al 42 % (p/p) de hidróxido de tetrabutilfosfonio; y vi) la concentración final de la celulosa bacteriana en el eluyente es del 0,2 % (p/p).

35 La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención se puede producir, por ejemplo, haciendo que una bacteria produzca una celulosa bacteriana mediante el cultivo en un medio de cultivo que contenga una fuente de carbono adecuada.

En el presente documento, los ejemplos de la fuente de carbono pueden incluir monosacáridos tales como glucosa y fructosa; disacáridos tales como sacarosa, maltosa y lactosa; oligosacáridos; azúcar; subproductos que contienen 40 sacarosa generados en la producción de azúcar, sus hidrolizados y azúcar isomerizado; sacáridos tales como hidrolizados de almidón; manitol; etanol; ácido acético; ácido cítrico; glicerol; y BDF-B. La fuente de carbono se puede ajustar adecuadamente dependiendo del tipo de bacteria, de las condiciones de cultivo, del coste de producción y similares. BDF-B consiste en un 41,5 % de glicerol, un 21,4 % de ácido graso, un 12,4 % de metanol, un 6,3 % de residuo de ignición y un 18,4 % de otros (Japan Food Research Laboratories) como composición típica, 45 y es una composición que contiene una gran cantidad de glicerol disponible como fuente de carbono para una bacteria.

En el presente documento, azúcar se refiere a un edulcorante que consiste esencialmente en sacarosa (Kohjien, 6<sup>a</sup> Ed.), y, para el fin de la presente invención, puede ser uno sintetizado químicamente o uno producido usando un producto natural tal como caña de azúcar, remolacha de azúcar (remolacha blanca), arce azucarero, gomuti (*Borassus flabellifer*), o sorgo dulce (*Sorghum bicolor dulciusculum*), como materia prima. Los ejemplos del azúcar de acuerdo con la presente invención pueden incluir azúcar no centrífugo, tal como mascabado, shiroshita, azúcar moreno, wasanbon o azúcar de arce, y azúcar centrífugo, tal como azúcar sin refinar o azúcar refinado. Los ejemplos del azúcar refinado pueden incluir azúcar duro, tal como shirozara, azúcar blando medio de cristal grueso o 55 azúcar granulado; azúcar blando tal como azúcar blando superior blanco o azúcar blando amarillo; azúcar procesado tal como azúcar en cubitos, azúcar de cristal, azúcar en polvo o azúcar congelado; y azúcar líquido.

El subproducto que contiene sacarosa generado en la producción de azúcar se refiere a aquel que contiene sacarosa entre los subproductos generados en una etapa de producción de azúcar, y los ejemplos específicos del mismo pueden incluir el orujo de materias primas naturales tales como la caña de azúcar y la remolacha azucarera según lo descrito anteriormente; melaza; y el residuo generado en una etapa de purificación usando filtración o resina de intercambio iónico.

El hidrolizado de un disacárido, un oligosacárido, azúcar o un subproducto que contiene sacarosa generado en la producción de azúcar se refiere al obtenido al someter el disacárido, oligosacárido, azúcar o subproducto que contiene sacarosa generado en la producción de azúcar a un tratamiento de hidrólisis tal como el calentamiento en

una solución ácida.

Los componentes del medio de cultivo distintos de la fuente de carbono pueden ser los mismos que en los medios de cultivo bien conocidos usados para el cultivo de bacterias y, preferentemente, contienen CMC. Los ejemplos específicos de dicho medio de cultivo pueden incluir medios de cultivo de nutrientes comunes que contienen CMC, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y, según sea necesario, nutrientes traza orgánicos tales como aminoácidos y vitaminas. Los ejemplos de la fuente de nitrógeno pueden incluir fuentes de nitrógeno orgánico o inorgánico tales como sales de amonio (por ejemplo, sulfato de amonio, cloruro de amonio y fosfato de amonio), nitratos, urea o peptona. Los ejemplos de la sal inorgánica también pueden incluir fosfatos, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro y sales de manganeso. Los ejemplos del nutriente traza orgánico pueden incluir aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, ácidos nucleicos y, además, peptona, casaminoácidos, extractos de levadura e hidrolizados de proteína de soja que contengan los nutrientes. Cuando se usa un mutante auxotrófico que requiere aminoácidos para el crecimiento, los nutrientes requeridos pueden suplementarse adicionalmente.

La bacteria no se limita a una en particular, siempre que pueda producir una celulosa bacteriana; sin embargo, se prefiere una bacteria capaz de producir la celulosa bacteriana bajo cultivo agitado o cultivo aireado, más preferentemente una bacteria que asimile BDF-B. Los ejemplos específicos de las mismas pueden incluir bacterias del género *Acetobacter*, el género *Gluconacetobacter*, el género *Pseudomonas*, el género *Agrobacterium*, el género *Rhizobium* y el género *Enterobacter*. Ejemplos más específicos de los mismos pueden incluir *Gluconacetobacter intermedius*, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter swingsii*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter acetii*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans*, *Acetobacter xylinum* subsp. *nonacetoxidans*, *Acetobacter ransens*, *Sarcinaventriculi*, *Bacterium xyloides* y *Enterobacter* sp.; sin embargo, entre ellas, se prefiere *Gluconacetobacter intermedius*. Los ejemplos de las mismas incluso más específicos pueden incluir la cepa SIID9587 de *Gluconacetobacter intermedius* (cepa NEDO-01) (número de acceso NITE BP-01495), la cepa ATCC53582 de *Gluconacetobacter xylinum*, la cepa ATCC23769 de *Gluconacetobacter hansenii*, la cepa ATCC700178 de *Gluconacetobacter xylinum* (BPR2001), la cepa BPR3001E de *Gluconacetobacter swingsii*, la cepa JCM10150 de *Acetobacter xylinum* y la cepa CJF-002 de *Enterobacter* sp.; entre estas, se prefiere la cepa SIID9587 de *Gluconacetobacter intermedius* (cepa NEDO-01) (número de acceso NITE BP-01495).

Los métodos de cultivo pueden incluir, por ejemplo, cultivo agitado y cultivo aireado. Los ejemplos específicos del cultivo agitado pueden incluir cultivo usando un fermentador, que no implica aireación (cultivo no aireado y agitado), cultivo usando un fermentador, que implica aireación (cultivo aireado y agitado), cultivo bajo balanceo usando un matraz con deflectores (cultivo de agitación) y cultivo giratorio usando un matraz con deflectores (cultivo de rotación). Las condiciones de cultivo pueden ser condiciones de cultivo bien conocidas usadas para el cultivo de las bacterias anteriores; los ejemplos de los mismos pueden incluir condiciones de cultivo de un volumen de aireación de 1 a 10 l/minuto, un número de rotación de 100 a 800 rpm, una temperatura de 20 a 40 °C y un período de cultivo de 1 día a 7 días.

En la producción de la celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención, se puede llevar a cabo una etapa de pretratamiento de una fuente de carbono, una etapa previa al precultivo, una etapa de precultivo, una etapa de purificación, secado y suspensión de la celulosa bacteriana y similares, según sea necesario.

La celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención se puede usar, por ejemplo, como aditivo para agentes fuertes de papel, espesantes para productos alimentarios, estabilizantes de suspensión y similares.

Entonces, la bacteria de acuerdo con la presente invención produce la celulosa bacteriana descrita anteriormente. Para las bacterias que producen la celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención, no se describirán nuevamente los mismos componentes o componentes equivalentes a los de la celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención.

A continuación, se describirán la celulosa bacteriana de acuerdo con la presente invención y una bacteria que la produce se basándose en los ejemplos. Sin embargo, el alcance técnico de la presente invención no pretende limitarse a las características presentadas por estos ejemplos.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de bacterias

### (1) Aislamiento de bacterias

Se aislaron bacterias productoras de una celulosa bacteriana mediante la asimilación de BDF-B. En concreto, usando el protocolo mostrado en la Figura 1, se llevó a cabo primero el cultivo de enriquecimiento empleando un medio de cultivo que contenía el 2 % (p/v) de glicerol reactivo (un reactivo garantizado de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en lugar de glucosa en medio de cultivo patrón de Hestrin-Schramm (composición; 0,5 % (p/v) de peptona bacteriológica, 0,5 % (p/v) de extracto de levadura, 0,27 % (p/v) de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,115 % (p/v) de ácido cítrico, 2 % (p/v) de glucosa; medio de cultivo de HS) (medio de cultivo de HS/glicerol) usando manzana y ciruela pasa

como fuentes de separación. Las bacterias resultantes se inocularon en un medio de cultivo de HS/glicerol que contenía un reactivo de tinción de celulosa y se cultivaron en placas a 30 °C, y se seleccionaron 15 cepas bacterianas productoras de celulosas bacterianas. Posteriormente, se inocularon estas cepas en un medio de cultivo de LB (composición; 1 % (p/v) de tripsina, 0,5 % (p/v) de extracto de levadura y 0,5 % (p/v) de cloruro de sodio) que contenía el 2 % (p/v) de glicerol reactivo (un reactivo garantizado de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) y se sometió a cultivo estacionario a 30 °C para formar películas gelificadas. Se midió el peso seco de las películas gelificadas (denominado de aquí en adelante "peso de película seca") y se seleccionaron 8 cepas para las que el peso de la película seca era alto como bacterias que asimilan glicerol y que tienen una elevada capacidad de producción de celulosa bacteriana. A continuación, se inocularon estas cepas en un medio de cultivo de LB que contenía BDF-B y se cultivaron en placas a 30 °C, y se inocularon además en el medio de cultivo de HS y se sometieron a cultivo estacionario a 30 °C para formar películas gelificadas. Se repitió la operación de selección de una cepa bacteriana para la que el peso de la película seca era alto entre estas bacterias, de cultivo en placas con el medio de cultivo de LB que contenía glicerol o el medio de cultivo de HS/glicerol, y luego el someter el cultivo resultante a cultivo estacionario en el medio de cultivo de HS para seleccionar una cepa bacteriana que tuviera una propiedad de asimilación de BDF-B y que tuviera una alta capacidad de producción de celulosa bacteriana, que se denominó cepa SIID9587.

## (2) Identificación de bacterias

Se llevó a cabo la secuenciación de acuerdo con un método habitual para la cepa SIID9587 de 1 (1) del presente ejemplo para determinar la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S de longitud completa (1.367 pb; SEQ ID NO: 1). Posteriormente, se realizó el análisis de la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S y se realizó el ensayo de las propiedades bacteriológicas en TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.

### [2-1] Análisis de la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S

El análisis de la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S se llevó a cabo usando Aporon 2.0 (TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.) como software, y Aporon DB-BA 6.0 (TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.) y las bases de datos internacionales de secuencias de nucleótidos (GenBank/DDBJ/EMBL) como bases de datos. Como resultado de la búsqueda de homologías con Aporon DB-BA 6.0, se encontró que la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S para la cepa SIID9587 (SEQ ID NO: 1) tiene una alta homología con la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S para el género *Gluconacetobacter* y tiene la homología más alta con la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S para la cepa TF2 de *G. intermedius* (número de acceso Y14694) (índice de homología: 99,8 %). Como resultado de la búsqueda de homología con GenBank/DDBJ/EMBL, también se encontró que la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S para la cepa SIID9587 (SEQ ID NO: 1) tiene una alta homología con la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S para el género *Gluconacetobacter*, y que, para la cepa tipo, se encontró que tenía una alta homología con la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S para la cepa TF2 de *G. intermedius* (número de acceso NR\_026435) (índice de homología: 99,8 %). La secuencia del número de acceso Y14694 es idéntica a la secuencia del número de acceso NR\_026435. Los resultados de la comparación entre las secuencias de nucleótidos del ADNr 16S para la cepa SIID9587 y la cepa TF2 de *G. intermedius* (número de acceso Y14694 o NR\_026435) se muestran en las Figuras 2-1 y 2-2. Como se muestra en las Figuras 2-1 y 2-2, había 4 nucleótidos diferentes entre ambas secuencias. En la búsqueda de homología con Aporon DB-BA 6.0, como resultado del análisis filogenético molecular simplificado basado en las secuencias de nucleótidos del ADNr 16S para las 15 cepas superiores que tenían una alta homología, se encontró que la cepa SIID9587 se incluía en el grupo formado por las especies del género *Gluconacetobacter*.

### [2-2] Ensayo de las propiedades bacteriológicas

Los resultados del ensayo de las propiedades bacteriológicas se muestran en la Figura 3. Como se muestra en la Figura 3, la cepa SIID9587 tenía diferentes propiedades en términos de no crecer en un medio de cultivo con ácido acético al 5 % de *G. intermedius* conocido y propiedades no diferentes (BRENNER *et al.*, "Bergey's manual of Systematic Bacteriology". Vol. 2. "The Proteobacteria, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria". 2005. Springer. pág. 72-77).

Los resultados anteriores de (2) [2-1] y [2-2] del presente Ejemplo 1 mostraron que la cepa SIID9587 pertenecía a *Gluconacetobacter intermedius*. Por otro lado, se demostró que la cepa SIID9587 era una nueva cepa de *G. intermedius*, ya que existen diferencias en la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S y la propiedad bacteriológica entre la cepa SIID9587 y la cepa TF2 de *Gluconacetobacter intermedius* como la cepa tipo para *G. intermedius* como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, esta cepa bacteriana se depositó en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depositario de Microorganismos Patentados (NITE-IPOD; n.º 122, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japón) con el número de acceso NITE BP-01495, 21 de diciembre de 2012. De aquí en adelante, la cepa SIID9587 de *Gluconacetobacter intermedius* (número de acceso NITE BP-01495) se denomina cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*).

## (3) Determinación del producto

Se precultivó la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) para hacer proliferar células bacterianas. Posteriormente, se añadió la solución de cultivo obtenida mediante el precultivo (solución de precultivo) al medio de cultivo de HS (fuente de carbono, glucosa), que luego se sometió a cultivo estacionario a 30 °C durante aproximadamente 8 días para realizar el cultivo principal con el fin de formar una película gelificada en la superficie del medio de cultivo. Se obtuvieron el espectro de espectroscopia de infrarrojos (IR) y el perfil de difracción de rayos X de la película gelificada y se analizaron de acuerdo con un método habitual. Como resultado de ello, se demostró que la película gelificada era una celulosa que tenía una estructura cristalina de tipo I. Como resultado de la obtención y del análisis de una imagen de microscopio electrónico de barrido de acuerdo con un método habitual, se demostró que las fibras de celulosa que tienen un ancho del orden de los nanómetros (nanofibras de celulosa) forman una estructura reticular en la película gelificada. A partir de estos resultados, se determinó que la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) produce celulosa.

## Ejemplo 2: Evaluación del producto obtenido mediante cultivo aireado y agitado

## (1) Preparación del producto mediante cultivo aireado y agitado

Se sometió BDF-B a tratamiento de neutralización y se sometió además a tratamiento en autoclave para proporcionar BDF-B pretratado.

Se prepararon medios de cultivo en los que se añadió glicerol reactivo (un reactivo garantizado de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en lugar de glucosa como fuente de carbono en un medio de cultivo de HS que contenía 2 % (p/v) de CMC (calidad química, de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) y en los que el BDF-B pretratado se añadió a una concentración del 2 % (p/v) en lugar de glucosa en el medio de cultivo de HS que contenía CMC, y se denominó medio de cultivo principal con glicerol y un medio de cultivo principal con BDF-B, respectivamente. Se precultivó primero la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) para hacer proliferar células bacterianas. A continuación, se inoculó la solución de precultivo en 5 l del medio de cultivo principal con glicerol y del medio de cultivo principal con BDF-B, y usando el fermentador, se sometió a cultivo aireado y agitado durante 4 días en condiciones de un volumen de aireación de 7 a 10 l/minuto, un número de revoluciones de 200 a 800 rpm, y una temperatura de 30 °C para realizar el cultivo principal. Se añadió una solución acuosa de NaOH al 1 % (p/v) a la solución de cultivo obtenida mediante el cultivo principal (solución de cultivo principal), que luego se agitó a 60 °C y 80 rpm durante 4 a 5 horas para lisar las células bacterianas. Después de someter el producto resultante a centrifugación, se retiró el sobrenadante para recuperar el precipitado con el fin de eliminar los componentes celulares bacterianos hidrosolubles. Se repitió la operación de adición de agua ultrapura a la misma, de realización de la centrifugación y luego de eliminación del sobrenadante hasta que el pH del precipitado en estado húmedo alcanzó 7 o menos para purificar el producto, y la solución resultante se denominó solución BC de cultivo agitado.

## (2) Preparación de celulosa bacteriana mediante cultivo estacionario

Se obtuvo una película gelificada mediante el método descrito en (3) del Ejemplo 1 y se cortó a un tamaño de aproximadamente 1 cm x 1 cm. Posteriormente, se añadió una solución acuosa de NaOH al 1 % (p/v), que luego se agitó a 60 °C y 80 golpes/minuto durante 4 a 5 horas, y luego se agitó durante una noche a 20 °C. Se retiró el líquido por filtración usando una gasa de metal para recuperar una película gelificada. Se repitió la operación de adición de agua ultrapura a la misma y de agitación de la solución resultante durante una noche a 20 °C hasta que el pH alcanzó 7 o menos para la purificación, seguido del tratamiento en suspensión usando una mezcladora durante varios minutos, y la solución resultante se denominó solución de BC de cultivo estacionario tratada en mezclador.

## (3) Análisis

Se añadieron la solución de BC de cultivo agitado de (1) del presente Ejemplo 2 y la solución de BC de cultivo estacionario tratada con mezclador de (2) del presente Ejemplo 2 gota a gota a una placa de silicio, se secaron y luego se suministraron a un espectrofotómetro infrarrojo. (FT/IR-4200; JASCO Corporation), y se midieron a un número acumulativo de 32 y una resolución de 2 cm<sup>-1</sup> o 4 cm<sup>-1</sup> para proporcionar un espectro de IR. Los resultados se muestran en la Figura 4. Como se muestra en la Figura 4, los espectros de IR de las soluciones BC de cultivo agitado obtenidas usando el medio de cultivo principal con BDF-B y el medio de cultivo principal con glicerol tenían formas similares al espectro de IR de la solución de BC de cultivo estacionario tratada con mezclador. A partir de estos resultados, se determinó que el producto obtenido sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a cultivo agitado usando BDF-B o glicerol reactivo como fuente de carbono se determinó que era una celulosa.

## Ejemplo 3: Dispersibilidad de celulosa bacteriana en agua

## (1) Aspecto del agua que contiene celulosa bacteriana



Se proporcionaron la solución de BC de cultivo agitado que usaba la solución de cultivo principal con BDF-B de (1) del Ejemplo 2 y la solución de BC de cultivo estacionario tratada con mezclador de (2) del Ejemplo 2. Se añadieron nanofibras de celulosa derivadas de pulpa comerciales al agua para su dispersión, y la solución resultante se denominó solución de CNF derivada de pulpa. Se dejaron reposar la solución de BC de cultivo agitado, la solución de BC de cultivo estacionario tratada con mezclador y la solución de CNF derivada de pulpa se durante 1 día, tras lo que se observó su aspecto. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Como se muestra en la Figura 5, se observó la precipitación de celulosa en la solución de CNF derivada de pulpa. Se observó celulosa bacteriana masiva en la solución de BC de cultivo estacionario tratada con mezclador, lo que muestra que el estado de dispersión de la celulosa bacteriana no era uniforme. Por el contrario, en la solución de BC de cultivo agitado, no se observó precipitación ni celulosa bacteriana masiva, y se observó que la celulosa bacteriana estaba en el estado de dispersión uniforme. Estos resultados mostraron que la celulosa bacteriana obtenida sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a un cultivo agitado tenía una alta dispersabilidad y se dispersaba uniformemente en un líquido tal como el agua, en comparación con la celulosa bacteriana obtenida al someter las nanofibras de celulosa derivadas de pulpa o la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) al cultivo estacionario.

(2) Transmitancia de la luz del agua que contiene celulosa bacteriana

[2-1] Comparación entre la celulosa bacteriana obtenida mediante el cultivo estacionario y la celulosa derivada de pulpa

En el método descrito en (1) del Ejemplo 2, se realizó el cultivo de rotación en condiciones de 150 rpm y una temperatura de 30 °C durante 3 días usando un matraz con deflectores en lugar del fermentador como cultivo principal para preparar soluciones de BC de cultivo agitado, que se denominaron muestra A (obtenida usando el medio de cultivo principal con glicerol) y muestra B (obtenida usando el medio de cultivo principal con BDF-B). La solución de BC de cultivo agitado obtenida usando el medio de cultivo principal con BDF-B de (1) del Ejemplo 2 se denominó muestra C, y la solución de BC de cultivo agitado obtenida usando el medio de cultivo principal con glicerol se denominó muestra D. Se proporcionaron la solución de BC de cultivo estacionario tratada con mezclador de (2) del Ejemplo 2 y la solución de CNF derivada de pulpa de (1) del Ejemplo 3. Estas soluciones se ajustaron a una concentración final de celulosa de  $0,1 \pm 0,006$  % (p/p), y se añadió 1 ml de cada una a las células y se sometieron a un espectrofotómetro (espectrofotómetro de doble haz U-2001; Hitachi, Ltd.) para medir la transmitancia de la luz a una longitud de onda de 500 nm. Se usó una cubeta desechable de polietileno (semi-micro, que tenía una longitud del paso de luz de 10 mm y un ancho del paso de luz de 4 mm) como cada celda, y se usó agua ultrapura como referencia. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

	Método de cultivo	Fuente de carbono	Concentración final de celulosa (% (p/p))	Transmitancia (%)
Muestra A	Cultivo agitado (matraz con deflectores)	Glicerol reactivo	0,10505	74,75
Muestra B	Cultivo agitado (matraz con deflectores)	BDF-B	0,10309	70,53
Muestra C	Cultivo agitado (Fermentador)	BDF-B	0,09570	63,82
Muestra D	Cultivo agitado (Fermentador)	Glicerol reactivo	0,10375	49,66
Solución de BC de cultivo estacionario tratada en mezclador	Cultivo estacionario	Glucosa	0,09964	19,19
Solución de CNF derivada de pulpa			0,10514	12,72

Como se muestra en la Tabla 1, la transmitancia de las muestras A, B, C y D fue del 74,75 %, 70,53 %, 63,82 % y 49,66 %, respectivamente, destacadamente alta en comparación con el 19,19 % de la solución de BC de cultivo estacionario tratada con mezclador y el 12,72 % de la solución de CNF derivada de pulpa, y aproximadamente en el intervalo del 40 % al 80 % (ambos inclusive).

[2-2] Comparación entre la presencia y la ausencia de CMC en medio de cultivo

En el método descrito en (1) del Ejemplo 2, se usaron el medio de cultivo de HS que contenía 2 % (p/v) de CMC y el medio de cultivo de HS que no contenía CMC para proporcionar soluciones de BC de cultivo agitado. Sin embargo, se usó melaza en lugar de glucosa como fuente de carbono. Cuando se usó melaza como fuente de carbono, el número de días en el cultivo principal se estableció en 3 días en lugar de 4 días, ya que la fuente de carbono en el medio de cultivo prácticamente desapareció en el día 3 del cultivo principal. Posteriormente, se midió la

transmitancia de la luz de las aguas que contenían celulosa bacteriana mediante el método descrito en (2) [2-1] del Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2.

[Tabla 2]

CMC en medio de cultivo	Método de cultivo	Fuente de carbono	Transmitancia (%)
Contiene	Cultivo agitado	Melaza	57
No contiene	Cultivo agitado	Melaza	18

5 Como se muestra en la Tabla 2, la transmitancia cuando se usó el medio de cultivo de HS que contenía CMC fue del 57 %, mientras que la transmitancia cuando se usó el medio de cultivo de HS que no contenía CMC fue del 18 %.

10 Los resultados anteriores de (2) [2-1] y [2-2] del presente Ejemplo 3 mostraron que el agua que contenía la celulosa bacteriana obtenida sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a un cultivo agitado en el medio de cultivo que contenía CMC a una concentración final del  $0,1 \pm 0,006$  % (p/p) tenía una transmitancia de luz a una longitud de onda de 500 nm del 40 % al 80 % (ambos inclusive). En otras palabras, se demostró que el cultivo agitado de la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) en el medio de cultivo que contenía CMC proporciona una celulosa bacteriana que tiene una dispersabilidad destacadamente alta en un líquido y es uniformemente dispersable en el líquido.

Ejemplo 4: Comparación en la transmitancia y la velocidad de producción de celulosa bacteriana entre diferentes fuentes de carbono

20 Las soluciones de BC de cultivo agitado se obtuvieron cada una mediante el método descrito en (1) del Ejemplo 2. Sin embargo, se usaron la melaza y el glicerol reactivo como fuentes de carbono en lugar de la glucosa. Cuando se usó melaza como fuente de carbono, el número de días en el cultivo principal se estableció en 3 días en lugar de 4 días. Posteriormente, se midió la transmitancia de la luz de cada agua que contenía celulosa bacteriana mediante el método descrito en (2) [2-1] del Ejemplo 3. Se secó la solución de BC de cultivo agitado para medir el peso seco absoluto de la celulosa bacteriana, y se calculó la concentración de la celulosa bacteriana por 1 l del medio de cultivo en función de los resultados de la medición, y se definió como la cantidad de celulosa bacteriana producida (cantidad de BC producida, g/l). Se calcula un valor proporcionado dividiendo la cantidad de BC producida entre el número de días en el cultivo principal, y se definió el valor como la velocidad de producción de celulosa bacteriana (velocidad de producción de BC, g/l/día). Los resultados se muestran en la Figura 6.

30 Como se muestra en la tabla y el gráfico de barras de la izquierda de la Figura 6, la transmitancia cuando se usó melaza como fuente de carbono fue del 57 %, y fue la misma (57 %) que cuando se usó glicerol reactivo como fuente de carbono. Estos resultados mostraron que el cultivo de la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) usando melaza como fuente de carbono proporcionó una celulosa bacteriana que tenía una alta transmitancia de la luz a una longitud de onda de 500 nm de agua que contenía la celulosa bacteriana a una concentración final del  $0,1 \pm 0,006$  % (p/p) y fue la misma que cuando se usó el glicerol reactivo como fuente de carbono. En otras palabras, se demostró que el cultivo de la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) usando melaza como fuente de carbono proporciona una celulosa bacteriana que tiene alta dispersabilidad y que es uniformemente dispersable en un líquido.

40 Como se muestra en la tabla y en el gráfico de barras de la derecha de la Figura 6, la velocidad de producción de BC cuando se usó melaza como fuente de carbono fue de 1,48 g/l/día, y fue aproximadamente 1,5 veces superior a la que había (0,95 g/l/día) cuando se usó glicerol reactivo como fuente de carbono. Estos resultados mostraron que el cultivo de la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) usando melaza como fuente de carbono proporcionó una celulosa bacteriana que tenía alta dispersabilidad en grandes cantidades en un corto período de tiempo.

Ejemplo 5: Comparación en la transmitancia y la velocidad de producción de celulosa bacteriana entre diferentes bacterias

50 Se obtuvo una solución de BC de cultivo agitado mediante el método descrito en (1) del Ejemplo 2. Sin embargo, se usó melaza como fuente de carbono en lugar de glucosa. Como bacterias, se usaron la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) y la cepa ATCC23769 de *Gluconacetobacter hansenii*, la cepa ATCC53582 de *Gluconacetobacter xylinus*, la cepa ATCC700178 de *Gluconacetobacter xylinus* (BPR2001), la cepa JCM10150 de *Gluconacetobacter xylinus*, la cepa DSM11804 de *Gluconacetobacter intermedius* y la cepa KCCM40274 de *Gluconacetobacter xylinus* como bacterias productoras de celulosa bacteriana conocidas, respectivamente. Cuando se usó la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*), el número de días en el cultivo principal se estableció en 3 días en lugar de 4 días, ya que la fuente de carbono en el medio de cultivo prácticamente desapareció en el día 3 del cultivo principal. Por otro lado, cuando se usó la cepa DSM11804, el número de días en el cultivo principal se estableció en 5 días en lugar de 4 días, ya que la reducción de la fuente de carbono en el medio de cultivo fue de pequeña magnitud incluso del día 4 del cultivo principal. Posteriormente, se midió la transmitancia de la luz de cada agua que contenía celulosa bacteriana mediante el método descrito en (2) [2-1] del Ejemplo 3. La cantidad de BC

producida (g/l) y la velocidad de producción de BC (g/l/día) se calcularon mediante el método descrito en el Ejemplo 4, y la transmitancia y la tasa de producción de BC se cuantificaron en gráficos de barras. Los resultados se muestran en la Figura 7.

5 Como se muestra en la tabla y en el gráfico de barras de la izquierda de la Figura 7, la transmitancia cuando se usó la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) fue del 57 %, mientras que la transmitancia cuando se usaron la cepa ATCC23769 de *G. hansenii*, la cepa ATCC53582 de *G. xylinus*, la cepa ATCC700178 de *G. xylinus* (BPR2001), la cepa JCM10150 de *G. xylinus*, la cepa DSM11804 de *G. intermedius* y la cepa KCCM40274 de *G. xylinus* fueron del 20 %, 33 %, 29 %, 27 %, 9 % y 13 %, respectivamente. Estos resultados mostraron que la transmitancia de la luz a una longitud de onda de 500 nm del agua que contiene la celulosa bacteriana obtenida mediante el cultivo de la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a una concentración final del 0,1 ± 0,006 % (p/p) fue destacadamente alta (35 % o superior) en comparación con la transmitancia de la luz del agua que contiene la celulosa bacteriana obtenida al cultivar cada una de las cepas distintas de NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*). En otras palabras, se demostró que el cultivo de la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) es capaz de proporcionar una celulosa bacteriana que tenía alta dispersabilidad y era dispersable uniformemente en un líquido.

20 Como se muestra en la tabla y en el gráfico de barras de la derecha de la Figura 6, la velocidad de producción de BC cuando se usó la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) fue DE 1,48 g/l/día, mientras que la velocidad de producción de BC cuando se usaron la cepa ATCC23769 de *G. hansenii*, la cepa ATCC53582 de *G. xylinus*, la cepa ATCC700178 de *G. xylinus* (BPR2001), la cepa JCM10150 de *G. xylinus*, la cepa DSM11804 de *G. intermedius* y la cepa KCCM40274 de *G. xylinus* fue de 1,05 g/l/día, 1,03 g/l/día, 1,11 g/l/día, 1,10 g/l/día, 0,42 g/l/día, 0,43 g/l/día, respectivamente. En otras palabras, la velocidad de producción de BC cuando se usó la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) fue destacadamente alta en comparación con la velocidad de producción de BC cuando se usaron cepas distintas de NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*). Estos resultados mostraron que el cultivo de la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) podría proporcionar una celulosa bacteriana que tenía una alta dispersabilidad en grandes cantidades en un corto período de tiempo.

Ejemplo 6: Peso molecular de la celulosa bacteriana

30 Como muestras, se proporcionaron las muestras A, B, C y D y la solución de CNF derivada de pulpa de (2) del Ejemplo 3. Estas muestras se liofilizaron, se añadieron a una solución acuosa de hidróxido de tetrabutilfosfonio del 57 al 59 % y se disolvieron permaneciendo a 35 °C, seguido de la adición de agua a una concentración de hidróxido de tetrabutilfosfonio del 40 al 42 % (p/p) y una concentración de muestra del 0,2 % (p/p). Posteriormente, se llevó a cabo la centrifugación para hacer precipitar impurezas para recuperar el sobrenadante. Se sometió el sobrenadante a cromatografía de permeación en gel en las siguientes condiciones para medir el volumen de retención del máximo superior del cromatograma. El sobrenadante se midió 3 veces en las mismas condiciones. Los resultados se muestran en la Tabla 3, y, en la Figura 8, se muestra un cromatograma seleccionado al azar.

40 Condiciones para la cromatografía de permeación en gel

Instrumento: cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento (Shimadzu Corporation).  
 Columna: una columna de 6,0 mm de diámetro interior y 15 cm de longitud, empaquetada con un polímero de metacrilato que tiene un diámetro de partícula de 9 µm (TSKgel super AWM-H; Tosoh Corporation).  
 45 Columna de protección: una columna de 4,6 mm de diámetro interior y 3,5 cm de longitud (TSK guardcolumn super AW-H; Tosoh Corporation).  
 Temperatura de la columna: 35 °C.  
 Caudal de alimentación: 0,07 ml/minuto.  
 Volumen de inyección de muestra: 10 µl.  
 50 Eluyente: una solución acuosa de hidróxido de tetrabutilfosfonio del 40 al 42 % (p/p).  
 Concentración final de celulosa bacteriana en el eluyente: 0,2 % (p/p).  
 Muestra de control: pululano que tiene un peso molecular de 85,3 x 10<sup>4</sup> (patrón P-82 de Shodex)

[Tabla 3]

	Tiempo de retención/minutos	Volumen de retención /ml	Media/ml	Desviación típica/ml
Muestra A (1 <sup>a</sup> )	40,4	2,828	2,79	0,05
Muestra A (2 <sup>a</sup> )	39,1	2,737		
Muestra A (3 <sup>a</sup> )	40	2,8		
Muestra B (1 <sup>a</sup> )	39,8	2,786	2,81	0,03
Muestra B (2 <sup>a</sup> )	39,9	2,793		
Muestra B (3 <sup>a</sup> )	40,7	2,849		
Muestra C (1 <sup>a</sup> )	40,1	2,807	2,82	0,02
Muestra C (2 <sup>a</sup> )	40,5	2,835		
Muestra C (3 <sup>a</sup> )	40,1	2,807		

	Tiempo de retención/minutos	Volumen de retención /ml	Media/ml	Desviación típica/ml
Muestra D (1 <sup>a</sup> )	39,2	2,744	2,76	0,02
Muestra D (2 <sup>a</sup> )	39,4	2,758		
Muestra D (3 <sup>a</sup> )	39,8	2,786		
Solución de CNF derivada de pulpa (1 <sup>a</sup> )	42,9	3,003	3,04	0,04
Solución de CNF derivada de pulpa (2 <sup>a</sup> )	43,4	3,038		
Solución de CNF derivada de pulpa (3 <sup>a</sup> )	43,9	3,073		
Pululano (1 <sup>o</sup> )	45,7	3,199	3,24	0,04
Pululano (2 <sup>o</sup> )	46,8	3,276		
Pululano (3 <sup>o</sup> )	46,4	3,248		

Como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 8, el volumen de retención de la parte superior del máximo de cada una de las muestras A, B, C y D fue de una media de 2,79 ml, 2,81 ml, 2,82 ml y 2,76 ml, respectivamente y, bajo en comparación con los 3,04 ml de la solución de CNF derivada de pulpa y 3,24 ml para el pululano. Estos resultados mostraron que el peso molecular medio de la celulosa bacteriana obtenida sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a un cultivo agitado fue superior al de la celulosa derivada de pulpa y superior a  $85,3 \times 10^4$  en términos del pululano. La Tabla 3 también mostró que cuando la celulosa bacteriana obtenida sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a cultivo agitado se sometió a cromatografía de permeación en gel en las condiciones anteriores, el volumen de retención del máximo superior del cromatograma alcanzó de 2,5 ml (inclusive) a 3,0 ml (no inclusive), ya que el volumen de retención del máximo superior de cada una de las muestras A, B, C y D estuvo en el intervalo de 2,737 a 2,849 ml.

#### Ejemplo 7: Morfología de la celulosa bacteriana

##### (1) Medición del ancho de la fibra

Se proporcionaron la solución de BC de cultivo agitado que usaba el medio de cultivo principal con glicerol de (1) del Ejemplo 2 y la solución de BC de cultivo estacionario tratada con mezclador de (2) del Ejemplo 2. Se ajustaron cada una de estas soluciones de celulosa a una concentración del aproximadamente 0,001 % (p/p), y luego, se añadieron 10  $\mu$ l de cada solución gota a gota a una rejilla de cobre recubierta con Formvar y secada al aire. Posteriormente, se añadieron gota a gota 5  $\mu$ l de una solución acuosa de acetato de gadolinio al 5 % (p/v), y se retiró el exceso de solución con un filtro de papel 10 segundos más tarde para la tinción negativa. El resultado se observó en un microscopio electrónico de transmisión a una tensión de aceleración de 80 kV y una ampliación de la observación de 30.000 veces para medir el ancho de las fibras de celulosa basándose en la imagen observada. Los resultados se muestran en la Figura 9.

Como se muestra en la Figura 9, el ancho de las fibras de celulosa era de  $17 \pm 8$  nm para la solución de BC de cultivo agitado, siendo destacadamente bajo en comparación con los  $55 \pm 22$  nm de la solución de BC de cultivo estacionario tratada con mezclador, y con una baja desviación típica. Estos resultados mostraron que la celulosa bacteriana obtenida sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a un cultivo agitado formó fibras finas y uniformes que mostraban pequeñas variaciones del ancho entre las fibras.

##### (2) Determinación de la uniformidad del ancho de fibra y del estado de agregación

Se proporcionaron la solución de BC de cultivo agitado que usaba el medio de cultivo principal con BDF-B de (1) del Ejemplo 2 y la solución de CNF derivada de pulpa de (1) del Ejemplo 3. Se ajustaron cada una de estas soluciones de celulosa a una concentración del aproximadamente 0,01 % (p/p), y luego, se repitió 10 veces la operación de pulverizar la solución sobre una rejilla de cobre recubierta con Formvar y secarla usando un secador. Posteriormente, se añadieron gota a gota 5  $\mu$ l de una solución acuosa de acetato de gadolinio al 5 % (p/v), y se retiró el exceso de solución con un filtro de papel. Además, se repitió 2 veces la secuencia de añadir gota a gota 5  $\mu$ l de agua ultrapura y luego retirar el exceso de solución con un filtro de papel, seguida de la tinción negativa mediante secado al aire. El resultado se observó bajo un microscopio electrónico de transmisión a una tensión de aceleración de 80 kV y una ampliación de la observación de 10.000 veces. Los resultados se muestran en la Figura 10. También se observó con nicoles cruzados usando un microscopio polarizante. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Como se muestra en la Figura 10, se observaron muchas fibras de celulosa que tenían anchos comparables en la escala nanométrica en la solución de BC de cultivo agitado, mientras que se observaron fibras de celulosa que tenían diversos anchos, incluyendo anchos de hasta aproximadamente 500 nm, en la solución de CNF derivada de pulpa. A partir de estos resultados, se determinó nuevamente que la celulosa bacteriana obtenida sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) a un cultivo agitado forma fibras que tienen un ancho uniforme en la escala nanométrica.

Como se muestra en la Figura 11, se observaron definitivamente fibras relativamente gruesas como se muestra mediante flechas en la solución de CNF derivada de pulpa, mientras que se observaron imágenes oscuras en la parte encerrada por una línea de puntos en la solución de BC de cultivo agitado. Estos resultados mostraron que había fibras relativamente gruesas, tales como submicrofibras y microfibras, presentes en la celulosa derivada de pulpa, mientras que se dispersaron uniformemente fibras delgadas a escala nanométrica para la celulosa bacteriana obtenida sometiendo la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 *G. intermedius*) a cultivo agitado.

Ejemplo 8: Evaluación de la capacidad de producción de celulosa bacteriana

(1) Capacidad de producción en cultivo estacionario

Se prepararon medios de cultivo en los que se añadieron BDF-B pretratado y glicerol reactivo, en lugar de glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo de LB, y se denominaron medio de cultivo de LB/BDF-B y medio de cultivo de LB/glicerol, respectivamente. Se inocularon la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*), la cepa ATCC53582 de *Gluconacetobacter xylinus*, la cepa ATCC23769 de *Gluconacetobacter hansenii* y la cepa ATCC700178 de *Gluconacetobacter xylinus* (BPR2001) en cada uno de los medios de cultivo de LB/glicerol y el medio de cultivo de LB/BDF-B, y se sometió a cultivo estacionario a 30 °C durante 7 días para formar una película gelificada. Se repitió la operación de adición de una solución acuosa de NaOH al 1 % (p/v) a la misma y de realización del tratamiento en autoclave hasta que la película gelificada se volvió blanca. Tras ello, se repitió la operación de adición de agua y de realización del tratamiento en autoclave hasta que el pH alcanzó 7 o menos para la purificación. Se midió la celulosa bacteriana obtenida por secado después de la purificación para determinar el peso seco absoluto. Los resultados se muestran en la Figura 12.

Como se muestra en la Figura 12, la cepa ATCC23769 de *G. hansenii* produjo bajos pesos de celulosas bacterianas tanto en el medio de cultivo de LB/glicerol como en el medio de cultivo de LB/BDF-B. La cepa ATCC53582 de *G. xylinus* y la cepa ATCC700178 de *G. xylinus* (BPR2001) produjeron pesos relativamente elevados de celulosas bacterianas en el medio de cultivo de LB/glicerol, mientras que no se observó producción de celulosa bacteriana en el medio de cultivo de LB/BDF-B. Por el contrario, la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) produjo pesos comparativamente elevados de celulosas bacterianas tanto en el medio de cultivo de LB/glicerol como en el medio de cultivo de LB/BDF-B. Estos resultados mostraron que la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) podía producir de manera eficaz una celulosa bacteriana al someterse a un cultivo estacionario usando glicerol reactivo o BDF-B como fuente de carbono. Su característica de ser capaz de producir una celulosa bacteriana usando BDF-B como fuente de carbono es una característica que otras cepas comparadas no tienen, también es ventajosa en el lado práctico en el que se puede utilizar el subproducto, y contribuye en gran medida a la reducción del coste de producción.

(2) Capacidad de producción en cultivo agitado

Se inocularon cada una de las cepas NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*), cepa ATCC53582 y cepa ATCC23769 en 10 ml del medio de cultivo de HS y se sometieron a cultivo estacionario a 30 °C durante 3 días para el precultivo. Posteriormente, se inoculó la solución de cultivo obtenida mediante el cultivo previo en 10 ml del medio de cultivo de HS y se sometió a cultivo estacionario a 30 °C durante 3 días para el precultivo. A continuación, se colocaron 100 ml del medio de cultivo principal con glicerol y del medio de cultivo principal con BDF-B de (1) del Ejemplo 2 en un matraz Erlenmeyer con paletas, y se inoculó la solución de precultivo en una cantidad correspondiente al mismo número de células bacterianas para cada cepa bacteriana, y se sometió a cultivo de agitación durante 3 días en condiciones de 150 rpm y 30 °C para el cultivo principal. Posteriormente, se purificó una celulosa bacteriana en la solución de cultivo principal mediante el método descrito en (1) del Ejemplo 2. Sin embargo, la agitación se realizó a 60 °C y 80 rpm durante de 4 a 5 horas, seguida de una agitación adicional a 20 °C durante una noche. Se secó la celulosa bacteriana purificada y se midió para determinar el peso seco absoluto. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Como se muestra en la Figura 13, no se observó que la cepa ATCC53582 de *G. xylinus* produjera celulosa bacteriana en el medio de cultivo principal con glicerol ni en el medio de cultivo principal con BDF-B. Para la cepa ATCC23769 de *G. hansenii*, el peso seco absoluto de la celulosa bacteriana fue relativamente alto cuando se usó el medio de cultivo principal con glicerol, pero no se observó producción de celulosa bacteriana cuando se usó el medio de cultivo principal con BDF-B. Por el contrario, para la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*), el peso seco absoluto de la celulosa bacteriana fue elevado cuando se usó el medio de cultivo principal con glicerol y el medio de cultivo principal con BDF-B. Estos resultados mostraron que la cepa NEDO-01 (cepa SIID9587 de *G. intermedius*) podía producir de manera eficaz la celulosa bacteriana mediante cultivo estacionario o cultivo agitado usando glicerol reactivo o BDF-B como fuente de carbono.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nippon Beet Sugar Manufacturing., Co., LTD. Tajima, Kenji Kose, Ryota

<120> Celulosa bacteriana y una bacteria que la produce

ES 2 660 741 T3

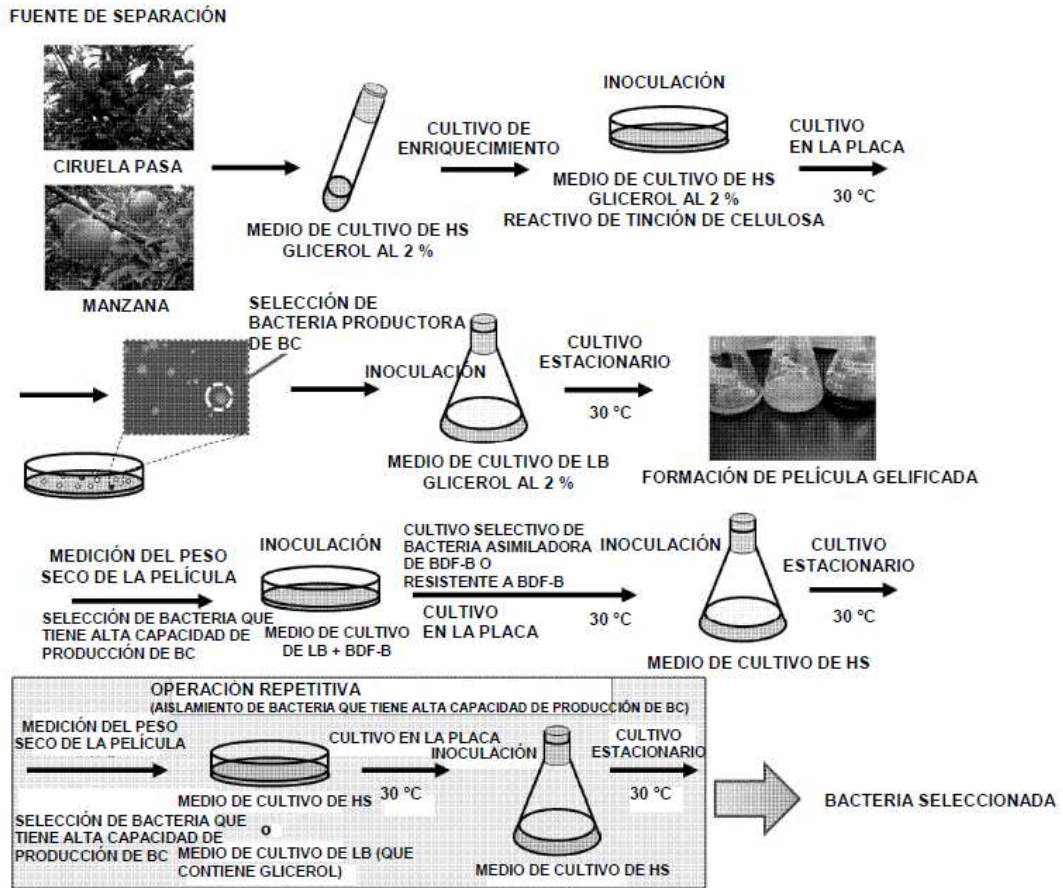
<130> PCT0614  
 <150> JP2012-289043  
 <151> 28-12-2012  
 5  
 <160> 1  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 10  
 <210> 1  
 <211> 1367  
 <212> ADN  
 <213> SIID9587 de *Gluconobacter intermedius*

15 <400> 1  
  
 catgcagtcg cacgaacctt tcggggtag tggcggacgg gtgagtaacg cgtagggatc 60  
 tatccacggg tgggggataa ctttgggaaa ctgaagctaa taccgcatga cacctgaggg 120  
 tcaaaggcgc aagtcgcctg tggaggaacc tgcgttcgat tagctagttg gtggggtaaa 180  
 ggcctaccaa ggcgatgac gatagctggg ctgagaggat gatcagccac actgggactg 240  
 agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggaaa tgggcgcaag 300  
 cctgatccag caatgcccg tgtgtgaaga aggttttcgg attgtaaagc actttcagcg 360  
 gggacgatga tgacggtacc cgcagaagaa gccccggcta acttcgtgcc agcagcccg 420  
 gtaatacгаа gggggcaagc gttgctcgga atgactgggc gtaaaggcg cgtagggcgt 480  
 tgacacagtc agatgtgaaa ttcccgggct taacctgggg gctgcatttg atactggcg 540  
 actagagtgt gagagagggg tgtggaattc ccagtgtaga ggtgaaattc gtagatattg 600  
 ggaagaacac cgggtggcgaa ggcggcaacc tggctcataa ctgacgctga ggcgcgaaa 660  
 cgtggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ctgtaaacga tgtgtgctgg 720  
 atgttgggtg actttgtcat tcagtgtcgt agttaacgcg ataagcacac cgcctgggga 780  
 gtacggccgc aaggttgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca 840  
 tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgcagaac cttaccaggg cttgacatgc ggaggctgtg 900  
 tccagagatg ggcatttctc gcaagagacc tccagcacag gtgctgcatg gctgtcgtca 960  
 gctcgtgctg tgagatggtg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg ccttagttg 1020  
 ccatcacgtt tgggtgggca ctctaaagga actgccggtg acaagccgga ggaagggtgg 1080  
 gatgacgtca agtcctcatg gcccttatgt cctgggctac acacgtgcta caatggcgg 1140  
 gacagtggga agccagggtg tgacaccgag ccgatctcaa aaagccgtct cagttcggat 1200  
 tgcactctgc aactcgagtg catgaagggt gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc 1260  
 gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc acaccatggg agttggttt 1320  
 accttaagcc ggtgagcgaa ccgcaaggac gcagccgacc acgtcgt 1367

**REIVINDICACIONES**

1. Una celulosa bacteriana producida por una bacteria que tiene una característica física de (a) siguiente:
  - 5 (a) una transmitancia de la luz, a una longitud de onda de 500 nm y un camino óptico de 10 mm, de agua que contiene la celulosa bacteriana a una concentración final de  $0,1 \pm 0,006$  % (p/p) del 35 % o superior.
2. La celulosa bacteriana de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una característica física de (b) siguiente:
  - 10 (b) un volumen de retención de un máximo superior de un cromatograma, en la cromatografía de permeación en gel realizada en las siguientes condiciones i) a vi), de 2,5 ml inclusive a 3,0 ml no inclusive:
    - i) columna: una columna de 6,0 mm de diámetro interior y 15 cm de longitud, empaquetada con un polímero de metacrilato que tiene un diámetro de partícula de 9  $\mu$ m;
    - 15 ii) columna de protección: 4,6 mm de diámetro interior y 3,5 cm de longitud;
    - iii) temperatura de la columna: 35 °C;
    - iv) caudal de alimentación: 0,07 ml/minuto;
    - v) eluyente: una solución acuosa de hidróxido de tetrabutilfosfonio del 40 al 42 % (p/p); y
    - vi) concentración final de la celulosa bacteriana en el eluyente: 0,2 % (p/p).
- 20 3. La celulosa bacteriana de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, producida mediante la asimilación de un subproducto que contiene glicerol generado en la producción de combustible biodiesel a partir de aceite vegetal usando la bacteria.
4. La celulosa bacteriana de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, producida mediante la asimilación de uno o dos o  
25 más seleccionados del grupo que consiste en azúcar, un subproducto que contiene sacarosa generado en la producción de azúcar, y sus hidrolizados, y azúcar isomerizado, usando la bacteria.
5. La celulosa bacteriana de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el subproducto es melaza.
- 30 6. La celulosa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la bacteria es *Gluconacetobacter intermedius*.
7. La celulosa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la bacteria es la  
35 cepa SIID9587 de *Gluconacetobacter intermedius* (número de acceso NITE BP-01495).
8. La cepa SIID9587 de *Gluconacetobacter intermedius* (número de acceso NITE BP-01495).
9. Un método de producción de una celulosa bacteriana que comprende una etapa de cultivar la bacteria de acuerdo  
40 con la reivindicación 8 para producir celulosa.

[Figura 1]





ES 2 660 741 T3

[Figura 2-1]

```

SlID9587      1: CATGCA-GTCGCACGAACCTTTCGGGGTAGTGCCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGGAT 59
G. intermedius 1: CATGCAAGTCGCACGAACCTTTCGGGGTAGTGCCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGGAT 60
*****

SlID9587      60: CTATCCACGGGTGGGGATAACTTTGGGAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGG 119
G. intermedius 61: CTATCCACGGGTGGGGATAACTTTGGGAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGG 120
*****

SlID9587      120: GTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGAACCTGCCTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA 179
G. intermedius 121: GTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGAACCTGCCTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA 180
*****

SlID9587      180: AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGCTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT 239
G. intermedius 181: AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGCTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT 240
*****

SlID9587      240: GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGACAATGGGCCAA 299
G. intermedius 241: GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGACAATGGGCCAA 300
*****

SlID9587      300: GCCTGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAGCACTTTCAGC 359
G. intermedius 301: GCCTGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAGCACTTTCAGC 360
*****

SlID9587      360: GGGACGATGATGACGGTACCCGCAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCG 419
G. intermedius 361: GGGACGATGATGACGGTACCCGCAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCG 420
*****

SlID9587      420: GGTAAATACGAAGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGCGTAAAGGGCCGTAGGCGG 479
G. intermedius 421: GGTAAATACGAAGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGCGTAAAGGGCCGTAGGCGG 480
*****

SlID9587      480: TTGACACAGTCAGATGTGAAATTCGGGGCTTAACCTGGGGCTGCATTGATACGTGCC 539
G. intermedius 481: TTGACACAGTCAGATGTGAAATTCGGGGCTTAACCTGGGGCTGCATTGATACGTGCC 540
*****

SlID9587      540: GACTAGAGTGTGAGAGGGTTGTGGAATCCCACTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT 599
G. intermedius 541: GACTAGAGTGTGAGAGGGTTGTGGAATCCCACTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT 600
*****

SlID9587      600: GGGAAAGAACACCGGTGGCGAAGCGGCAACCTGGCTCAAACTGACGCTGAGGCCGAAA 659
G. intermedius 601: GGGAAAGAACACCGGTGGCGAAGCGGCAACCTGGCTCAAACTGACGCTGAGGCCGAAA 660
*****

SlID9587      660: GCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACCGATGTGTGCTG 719
G. intermedius 661: GCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACCGATGTGTGCTG 720
*****

```

ES 2 660 741 T3

[Figura 2-2]

SIID9587 720: GATGTTGGGTGACTTTGTCATTCACTGTCGTAGTTAACCGGATAAGCACACCGCCTGGGG 779  
G. intermedius 721: GATGTTGGGTGACTTTGTCATTCACTGTCGTAGTTAACCGGATAAGCACACCGCCTGGGG 780  
\*\*\*\*\*

SIID9587 780: AGTACGCCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC 839  
G. intermedius 781: AGTACGCCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC 840  
\*\*\*\*\*

SIID9587 840: ATGTGGTTAATTGGAAGCAACCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCGGAGGCTGT 899  
G. intermedius 841: ATGTGGTTAATTGGAAGCAACCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCGGAGGCTGT 900  
\*\*\*\*\*

SIID9587 900: CTCACAGATGGCATTCTCGAAGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC 959  
G. intermedius 901: CTCACAGATGGCATTCTCGAAGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC 960  
\*\*\*\*\*

SIID9587 960: AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCTTTAGTT 1019  
G. intermedius 961: AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCTTTAGTT 1020  
\*\*\*\*\*

SIID9587 1020: GCCATCACGTTTGGGTGGGCACTCTAAAGGAAGTCCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGG 1079  
G. intermedius 1021: GCCATCACGTTTGGGTGGGCACTCTAAAGGAAGTCCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGG 1080  
\*\*\*\*\*

SIID9587 1080: GGATGACGTCAAGTCCCTATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACAGTGTACAATGGCGG 1139  
G. intermedius 1081: GGATGACGTCAAGTCCCTATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACAGTGTACAATGGCGG 1140  
\*\*\*\*\*

SIID9587 1140: TGACAGTGGGAAGCCAGGTGGTGACACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGA 1199  
G. intermedius 1141: TGACAGTGGGAAGCCAGGTGGTGACACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGA 1200  
\*\*\*\*\*

SIID9587 1200: TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC 1259  
G. intermedius 1201: TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC 1260  
\*\*\*\*\*

SIID9587 1260: CGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTT 1319  
G. intermedius 1261: CGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTT 1320  
\*\*\*\*\*

SIID9587 1320: GACCTTAAGCCGGTGAGCGAACC GCAAGGACGACCGACCACGTCG 1366  
G. intermedius 1321: GACCTTAAGCCGGTGAGCGAACC GCAAGGACGACCGACCACGTCG 1368  
\*\*\*\*\*

## ES 2 660 741 T3

[Figura 3]

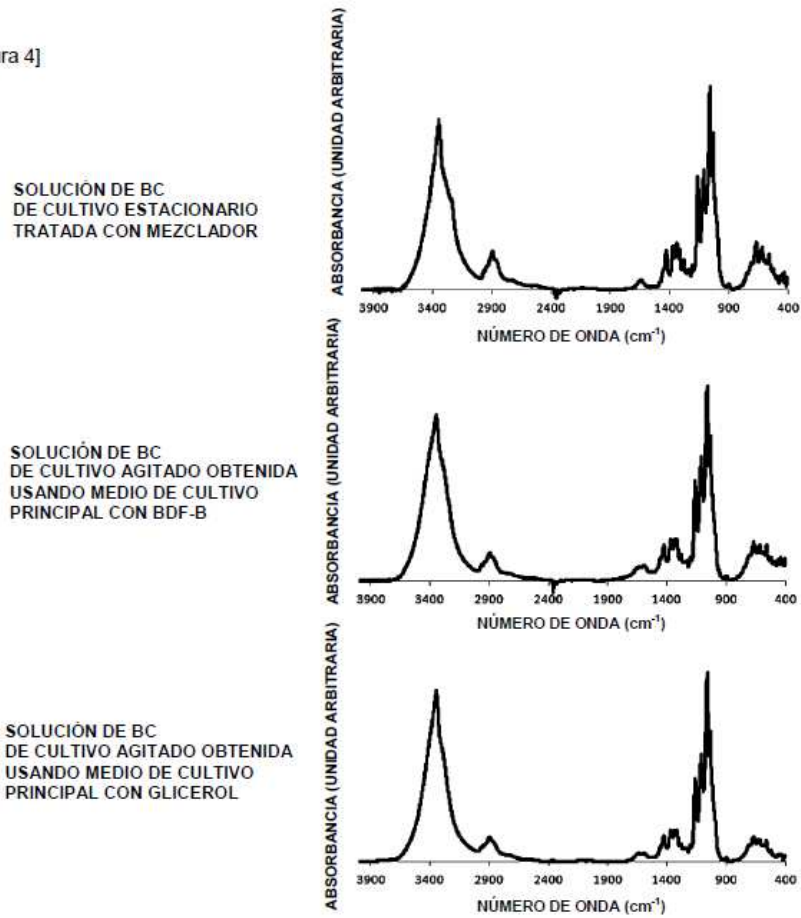
ARTÍCULO DE ENSAYO	SIID9587	
TEMPERATURA DEL CULTIVO (°C)	30	
MORFOLOGÍA CELULAR	BACILOS (0,7 x 0,8 x 1,5-2,5 µm)	
CAPACIDAD DE TINCIÓN DE GRAM	-	
PRESENCIA O AUSENCIA DE ESPORA	-	
MOVILIDAD	-	
MORFOLOGÍA DE LA COLONIA	MEDIO DE CULTIVO: AGAR GYC	
	DURACIÓN DEL CULTIVO: 48 h	
	DIÁMETRO: 1,0-2,0 mm	
	TONO DE COLOR: COLOR CREMA	
	FORMA: CIRCULAR	
	ESTADO ELEVADO: HEMISFÉRICO	
	CIRCUNFERENCIA: ENTERA	
	FORMA Y ASPECTO DE SUPERFICIE: LISA	
	GRADO DE TRANSPARENCIA: OPACO	
	VISCOSIDAD: MANTECOSA	
ENSAYO DE TEMPERATURA DEL CRECIMIENTO (°C)	37	+
	45	-
REACCIÓN CATALASA	+	
REACCIÓN OXIDASA	-	
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO/GAS DE LA GLUCOSA (PRODUCCIÓN DE ÁCIDO/PRODUCCIÓN DE GAS)	NE	
ENSAYO O/F (OXIDACIÓN/FERMENTACIÓN)	NE	

+: POSITIVO; -: NEGATIVO; NE: No Ensayado

ARTÍCULO DE ENSAYO	
PRODUCCIÓN DE TINTE EN MEDIO DE CULTIVO DE GYC	-
CRECIMIENTO EN CONDICIONES ANAERÓBICAS	-
DESCOMPOSICIÓN DE ACETETO DE SODIO EN CO <sub>2</sub>	+
OXIDACIÓN	
n-PROPANOL	+
GLUCOSA	+
ETANOL	+
ASIMILACIÓN	
ETANOL	+
GLICERINA	+
LACTATO DE SODIO	+
SACAROSA	+ W
CRECIMIENTO EN ETANOL AL 3 %	+
CRECIMIENTO EN ÁCIDO ACÉTICO AL 5 %	-
CRECIMIENTO EN MEDIO QUE CONTIENE GLUCOSA AL 30 %	+
CRECIMIENTO EN AGAR MRS	+

+: POSITIVO; -: NEGATIVO

[Figura 4]

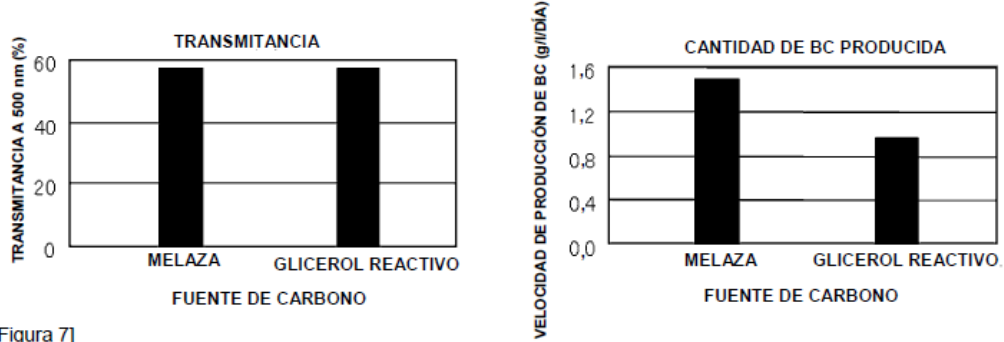


[Figura 5]



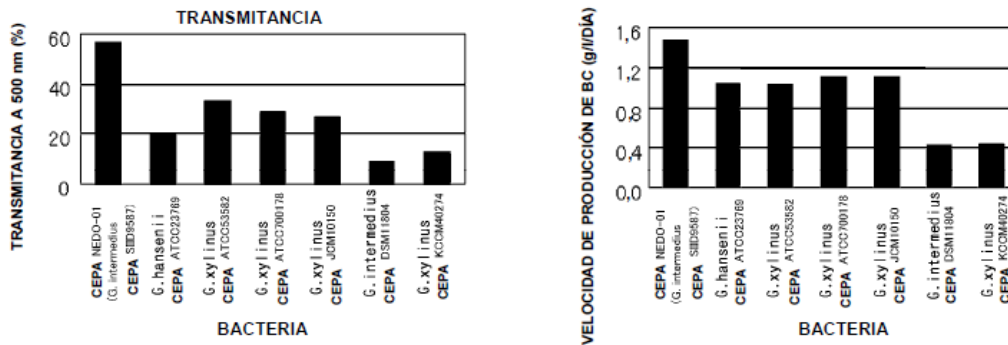
[Figura 6]

FUENTE DE CARBONO	TRANSMITANCIA (%)	NÚMERO DE DÍAS EN CULTIVO PRINCIPAL	CANTIDAD DE BC PRODUCIDA (g/l)	VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE BC (g/l/día)
MELAZA	57	3	4,45	1,48
GLICEROL REACTIVO	57	4	3,80	0,95



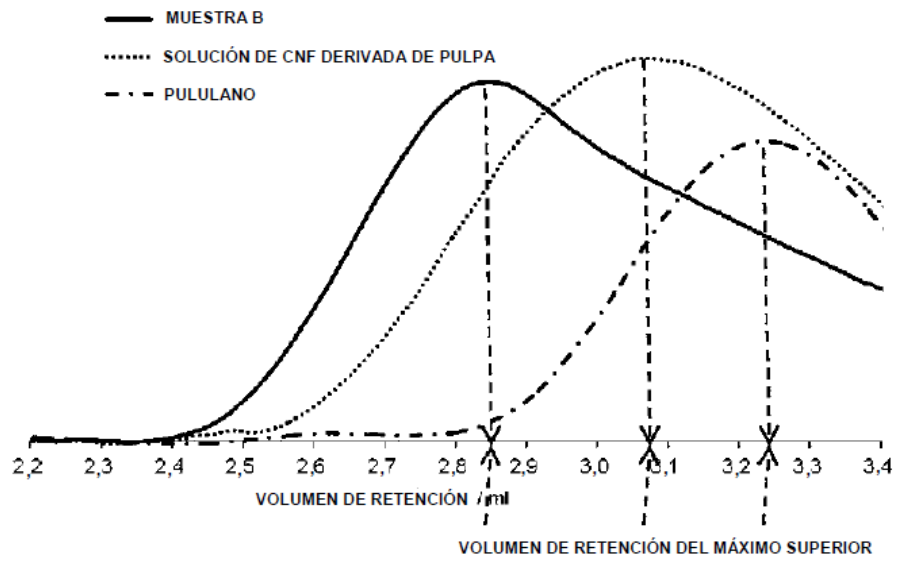
[Figura 7]

BACTERIA	TRANSMITANCIA (%)	NÚMERO DE DÍAS EN CULTIVO PRINCIPAL	CANTIDAD DE BC PRODUCIDA (g/l)	VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE BC (g/l/día)
CEPA NEDO-01 (CEPA SIID9587 DE <i>G. intermedius</i> )	57	3	4,45	1,48
CEPA ATCC23769 DE <i>G. hansenii</i>	20	4	4,19	1,05
CEPA ATCC53582 DE <i>G. xylinus</i>	33	4	4,12	1,03
CEPA ATCC700178 <i>G. xylinus</i> (BPR2001)	29	4	4,44	1,11
CEPA JCM10150 DE <i>G. xylinus</i>	27	4	4,39	1,10
CEPA DSM11804 DE <i>G. intermedius</i>	9	5	2,08	0,42
CEPA KCCM40274 DE <i>G. xylinus</i>	13	4	1,72	0,43

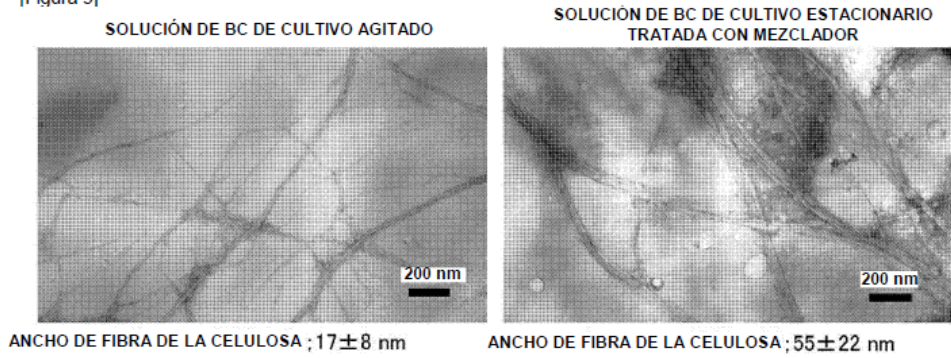




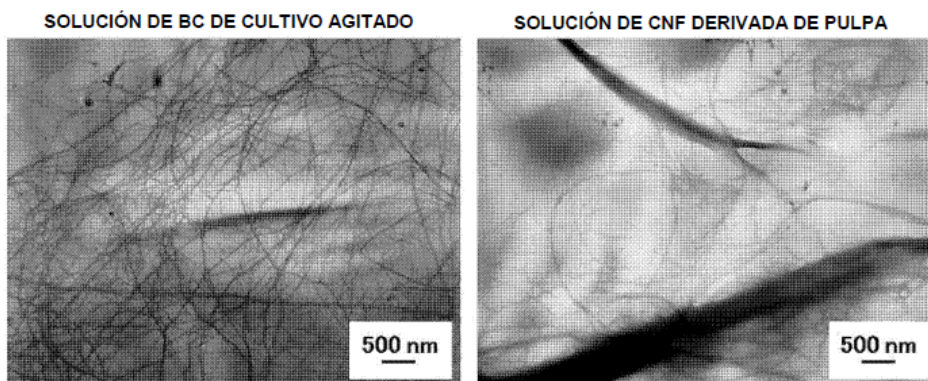
[Figura 8]



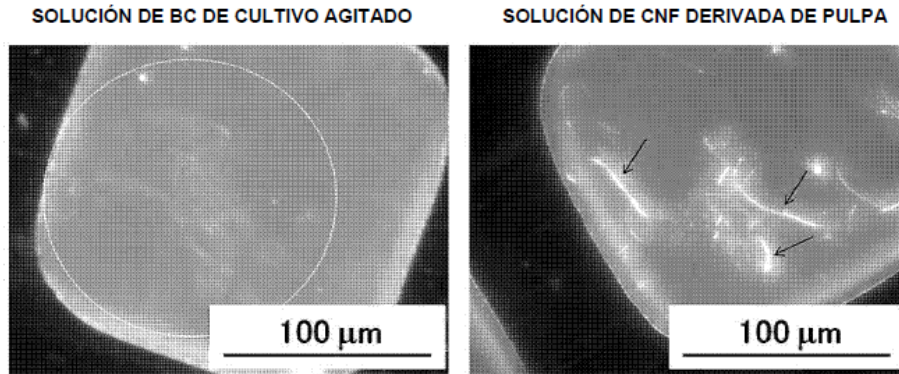
[Figura 9]



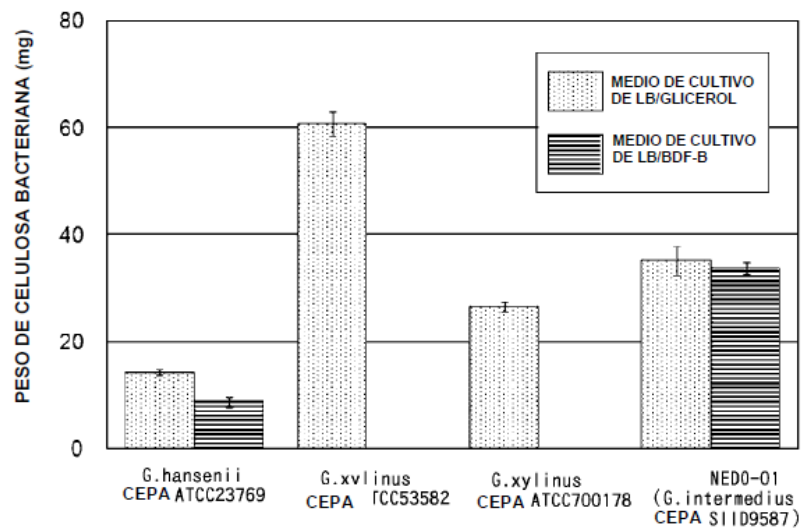
[Figura 10]



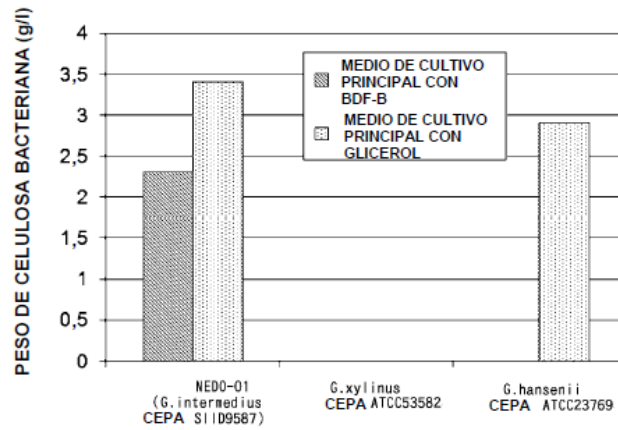
[Figura 11]

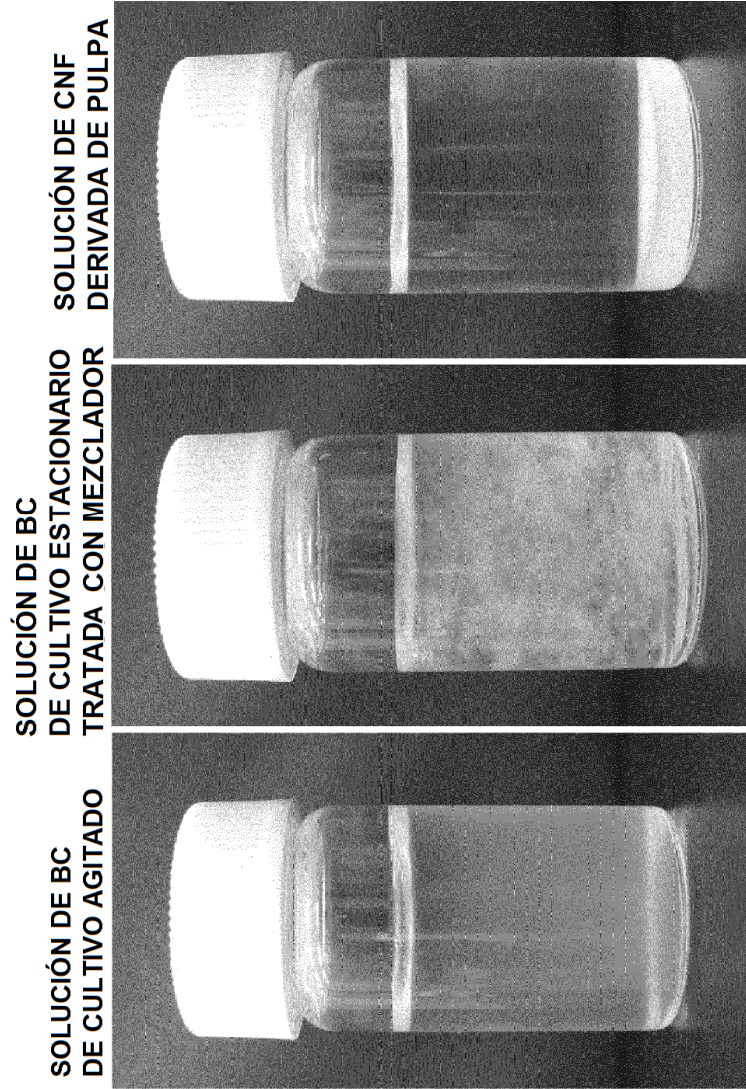


[Figura 12]



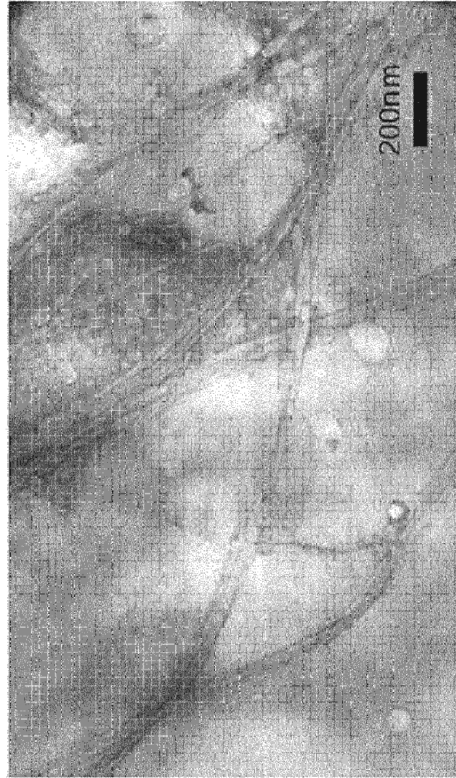
[Figura 13]





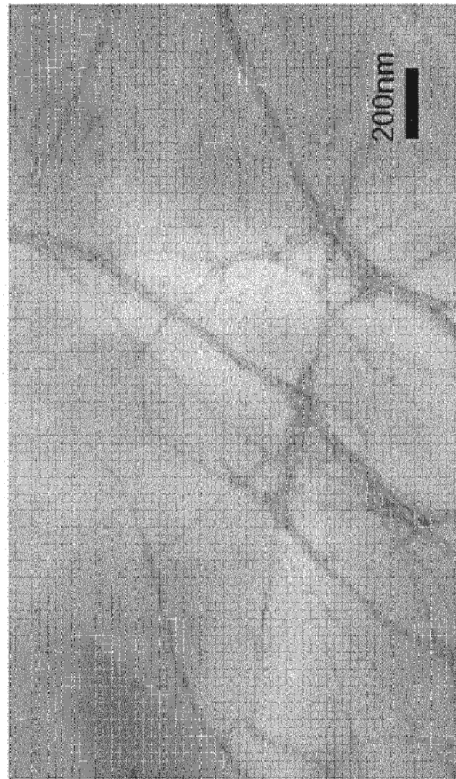


**SOLUCIÓN DE BC DE CULTIVO ESTACIONARIO  
TRATADA CON MEZCLADOR**



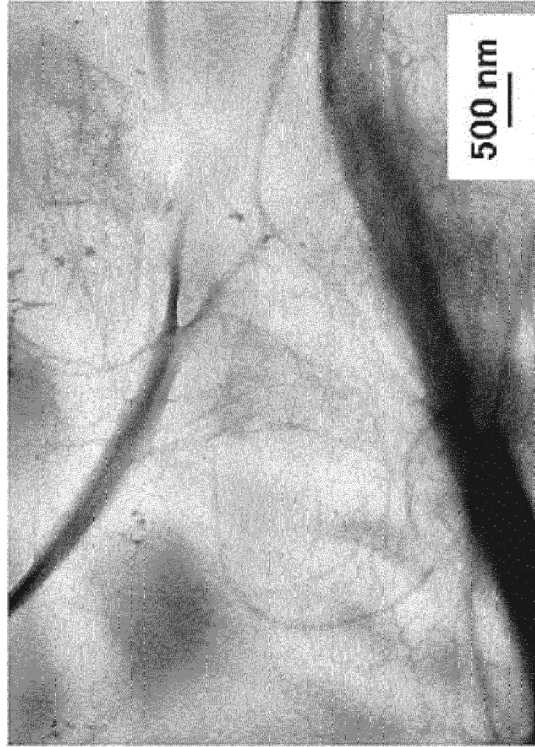
**ANCHO DE FIBRA DE LA CELULOSA;  $55 \pm 22$  nm**

**SOLUCIÓN DE BC DE CULTIVO AGITADO**

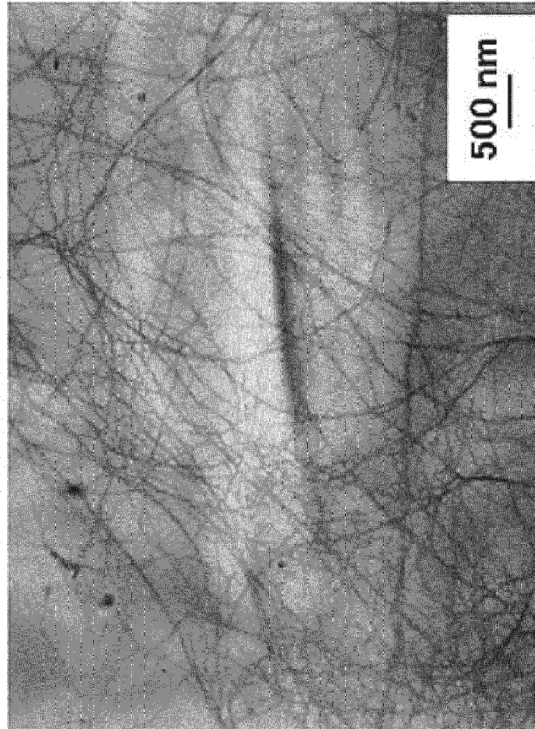


**ANCHO DE FIBRA DE LA CELULOSA;  $17 \pm 8$  nm**

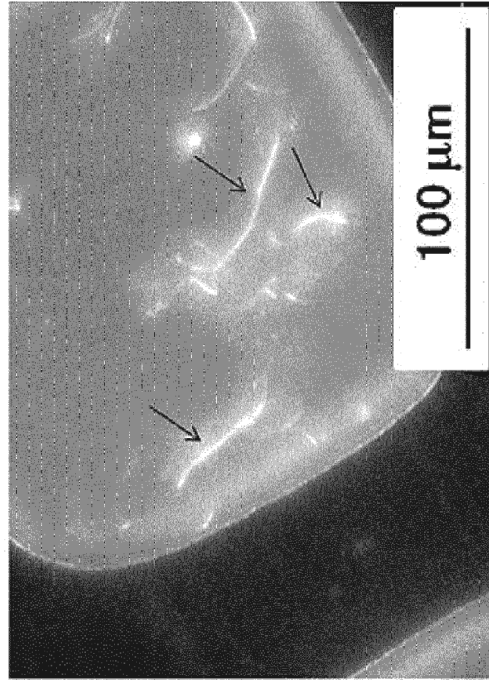
**SOLUCIÓN DE CNF DERIVADA DE PULPA**



**SOLUCIÓN DE BC DE CULTIVO AGITADO**



SOLUCIÓN DE CNF DERIVADA DE PULPA



SOLUCIÓN DE BC DE CULTIVO AGITADO

