

بسم الله الرحمن الرحيم



المملكة العربية السعودية

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

إن المشرف العام على مكتب البراءات السعودي، وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/٢٧ وتاريخ ١٤٢٥/٠٥/٢٩هـ، واستناداً لأحكام اللائحة التنفيذية له الصادرة بالقرار الإداري رقم ٣٦٠٧٣٢٩-٢-١٦١ وتاريخ ١٤٣٦/١٢/٣٠ هـ، يقرر منح:

١) كينجي تاجيما

Kenji TAJIMA

٢) رويتا كوسي

Ryota KOSE

براءة اختراع رقم ٥٩٥٣

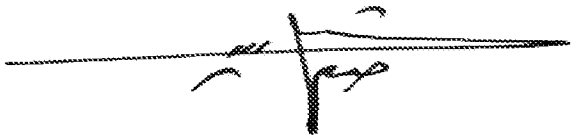
بتاريخ ١٤٣٩/٠٩/٢٨هـ الموافق ٢٠١٨/٠٦/١٢ م

عن الاختراع المسمى/ سيليلوز بكتيري والبكتيريا المنتجة له

Bacterial cellulose and bacterium producing it

ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق التي يمنحها النظام في المملكة العربية السعودية.

المشرف العام على مكتب البراءات السعودي



م. صقر بن ناصر الفطيماني

[19] **المملكة العربية السعودية** SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] **رقم البراءة:** ٥٩٥٣
[45] **تاريخ المنح:** ١٤٣٩/٠٩/٢٨ هـ
الموافـــق: ٢٠١٨/٠٦/١٢ م

[12] براءة اختراع

[72] **اسم المخترع:** كينجي تاجيما، رويتا كوسي

[73] **مالك البراءة :** ١) كينجي تاجيما، ٢) رويتا كوسي
عنوانه: ١) كيتا ١٣ -جيو نيشي٨ -تشوم، كيتا - كو، سابورو -شي، هوكايدو ٠٦٠٨٦٢٨، اليابان، ٢) ٣ -٥ -٨، سايواي -تشو، فوتشو -شي طوكيو ١٨٣٨٥٠٩، اليابان
جنسيته: ١) ياباني، ٢) ياباني

[74] **الوكيل:** مكتب المحامي سليمان ابراهيم العمار

[21] **رقم الطلب:** ٥١٥٣٦٠٦٩٧

[22] **تاريخ دخول المرحلة الوطنية:** ١٤٣٦/٠٩/١١ هـ
الموافق : ٢٠١٥/٠٦/٢٨ م
تاريخ الإيداع للطلب الدولي: ٢٠١٣/١٢/٢٧ م

[86] **رقم الطلب الدولي:** PCT/JP2013/085163

[87] **رقم النشر الدولي:** WO/2014/104318
تاريخ النشر الدولي: ٢٠١٤/٠٧/٠٣ م

[30] **بيانات الأسبقية:**
JP ٢٨٩٠٤٣ -٢٠١٢ ٢٠١٢/١٢/٢٨م

[51] **التصنيف الدولي** (IPC[8]) :
C08L 001/002, C12R 001/001, C12N 001/020, C12P 019/004

[56] **المراجع:**

JP	٠٨٢٩١٢٠١	١٩٩٦/١١/٠٥م
JP	٢٠٠٥٠٨٢٧٠٤	٢٠٠٥/٠٣/٣١م
WO	٢٠٠٧٠٦٣٨٥٤	٢٠٠٧/٠٦/٠٧م
CN	١٠٢١٦٨٠٥٦	٢٠١١/٠٨/٣١م
JP	٢٠١١١٧٧١٧٢	٢٠١١/٠٩/١٥م

WANG J ET AL, "Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial", MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C, ELSEVIER SCIENCE S.A., CH, vol. 30, no. 1, doi:10.1016/J.MSEC.2009.10.006, ISSN 0928-4931, (20100101), pages 214 - 218, (20091022), XP026783545 [X] 1-7 * figure 1 * [A] 8-9

اسم الفاحص: حصة بنت عمر البيز

[54] **اسم الاختراع:** سيليلوز بكتيري والبكتيريا المنتجة له
Bacterial cellulose and bacterium producing it

[57] **الملخص:** يتعلق الاختراع الحالي بسيليلوز بكتيري bacterial cellulose منتج عن طريق بكتيريا، والذي يحتوى على خواص فيزيائية (أ) و(ب) أدناه: (أ) نفاذية للضوء عند طول موجي ٥٠٠ نانومتر من ماء يحتوي على سيليلوز بكتيري بتركيز نهائي يبلغ ٠,١ ± ٠,٠٠٦ (وزن/وزن) بنسبة ٣٥٪ إلى ٩٩٪؛ (ب) مقدار احتجاز لقمة عليا من مُخَطَّط كروماتوغراف في كروماتوجراف نفاذية الجل المنفذ في ظل الظروف التالية i) إلى vi) من ٢,٥ ملي لتر متضمن إلى ٣,٠ ملي لتر مستثنى: i) عمود: عمود ٦,٠ مم في قطر داخلي و١٥ سم في الطول، معبأ بميث أكريلات بوليمر methacrylate polymer له حجم جسيم يبلغ ٩ ميكرومتر؛ ii) عمود واقي: ٤,٦ مم في قطر داخلي و٣,٥ سم في الطول؛ iii) درجة حرارة العمود: ٣٥ درجة مئوية؛ iv) معدل تدفق تيار التغذية: ٠,٠٧ ملي لتر/دقيقة؛ v) ناتج التصفية: من ٤٠ إلى ٤٢٪ (وزن/وزن) محلول مائي من هيدروكسيد تترا بيوتيل فُسْفُونْيُوم tetrabutylphosphonium hydroxide vi) تركيز نهائي من السيليلوز البكتيري في ناتج التصفية: ٠,٢٪ (وزن/وزن)

عدد عناصر الحماية (٧)، عدد الأشكال (١٢)

سيليلوز بكتيري والبكتيريا المنتجة له

Bacterial cellulose and bacterium producing it

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بسيليلوز بكتيري bacterial cellulose والبكتيريا bacterium المنتجة له، وتحديدا بسيليلوز بكتيري ممتاز في السوائل والبكتيريا المنتجة له.

يتكون سيليلوز بكتيري بصورة نمطية من ألياف نانومترية لها عرض يبلغ حوالي ٥٠ نانومتر، وقد جذبت الانتباه كمادة قادرة على أن يتم استخدامها في المجالات الصناعية المتنوعة حيث أنها تتمتع بخصائص، مثل مقاومة ميكانيكية عالية و توافق حيوي biocompatibility وقابلية التحلل الحيوي.

يتم الحصول على السيليلوز البكتيري بصورة نمطية في صورة غشاء يتكون من مادة هلامية gelled (فيما بعد، مشار إليه باسم "غشاء هلامي gelled film ") في سطح وسط المزرعة بواسطة إخضاع بكتيريا، مثل بكتيريا حمض أسيتيك acetic acid bacterium ، لمزرعة ثابتة stationary culture ؛

مع ذلك، يعاني الغشاء الهلامي من مشكلة، مثل أنه منطبق بشكل ضعيف كمادة فعلية حيث يكون ضعيف في قابلية التشكيل وقابلية الامتزاج مع المواد الأخرى عند وضعه على المواد وعالي من حيث التكلفة بسبب أنه منخفض في كفاءة الانتاج.

لمعالجة هذه المشكلة، توجد حاجة إلى سيليلوز بكتيري ليس في صورة غشاء هلامي ولكن يكون قابل للتشتت dispersible في السوائل وبناء عليه يكون ممتاز من حيث قابلية الاستخدام.

على سبيل المثال، يكشف مرجع من غير براءات الاختراع ١ عن سيليلوز بكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع مخمرات سكرية sucrofermentans من جنس فرعي لبكتيريا Acetobacter xylinum لمزرعة مهواه ومقلبة، ومرجع من غير براءات الاختراع ٢ يكشف أيضا عن سيليلوز بكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع سلالة زيليوم جلوكوناسيتوباكتير

JCM10150 Gluconacetobacter xylinum strain لمزرعة ذات اهتزاز دوار في وسط مزرعة يحتوي على كربوكسي ميثيل سيليلوز carboxymethyl cellulose (CMC).

قائمة الاستشهاد : مرجع من غير براءات الاختراع

مرجع من غير براءات الاختراع ١: Yoshinaga, et al., Kagaku To Seibutsu (Chemistry and Biology), vol. 35, no. 11, p. 7-14, 1997

مرجع من غير براءات الاختراع ٢: S. Warashina, et al., 2010 Cellulose R&D Abstracts at the 17th Annual Meeting of the Cellulose Society, p. 98, 2010

الوصف العام للاختراع

ان السيليلوز البكتيري الموصوف في مرجع من غير براءات الاختراع ١ لا يكون عالي من حيث قابلية التشتيت في الماء على النحو المثبت من الوصف أنه لا يمثل ذلك الذي تم إنتاجه باستخدام وسط مزرعة يحتوي على CMC له تأثير تحسين قابلية تشتيت سيليلوز بكتيري وأنه يتم تشتيته "في صورة حبيبات أو ألياف بالغة الصغر tiny grains or fibers " في الماء (ibid; page 9, right column). بالتبعية، يكون السيليلوز البكتيري غير كافي من حيث قابلية التشكيل وقابلية الامتزاج مع المواد الأخرى للاستخدام العملي. لا يكون السيليلوز البكتيري الموصوف في مرجع من غير براءات الاختراع ٢ أيضا عالي من حيث قابلية التشتيت في الماء حيث يكون الماء الذي يحتوي على السيليلوز البكتيري أعلى في العكارة البيضاء في القاع أعلى من القمة وله قدرة على الترسب ملحوظة وتكون حبيبات سيليلوز cellulose grains كبيرة لدرجة مرئية (ibid؛ الشكل ١) في أي من الحالات حيث كمية إضافة CMC إلى وسط المزرعة تبلغ ٠,٥%، ١%، و٢%. بالتبعية، يكون هذا السيليلوز البكتيري غير كافي من حيث قابلية التشكيل وقابلية الامتزاج مع المواد الأخرى، اللازمة للاستخدام العملي.

بالتالي، مركبات السيليلوز البكتيري الموصوفة في كل من المراجع من غير براءات الاختراع ١ و٢ تكون غير كافية في قابلية التشكيل كمادة وقابلية الامتزاج مع المواد الأخرى، وتكون أيضا ضعيفة في قابلية التطبيق العملي من حيث كفاءة إنتاج المادة.

تم عمل الاختراع الحالي لحل هذه المشكلات ويتمثل هدفه في توفير سيليلوز بكتيري عالي من حيث قابلية التشتيت في السوائل، مفضل في قابلية التشكيل وقابلية الامتزاج مع المواد الأخرى من حيث جعله قابل للاستخدام، وممتاز في قابلية الاستخدام كمادة فعلية، وبكتيريا منتجة للسيليلوز البكتيري.

كنتيجة للدراسات المكثفة، اكتشف المخترعون الحاليون أن السيليلوز البكتيري يكون قابل للتشتت في الماء بدرجة عالية، والذي تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة SIID9587 كسلالة جديدة من Gluconacetobacter intermedius (رقم الوصول NITE BP-01495) (فيما بعد، في بعض الأحيان مشار إليها باسم "السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587)") لمزرعة مقلبة في وسط مزرعة يحتوي على CMC باستخدام منتج ثانوي يحتوي على جليسيرول مولد في إنتاج وقود دِيزِل حيوي من الزيت النباتي (منتج ثانوي من وقود الديزل الحيوي؛ BDF-B، جلسرين مهدر waste glycerin)، جليسيرول كاشف reagent glycerol ، أو دبس السكر molasses كمصدر كربون carbon source ، بواسطة هذه الطريقة يتم تحقيق الاختراعات التالية.(١) السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي له خاصية فيزيائية لنفاذية ضوء عند طول موجي wavelength يبلغ ٥٠٠ نانومتر من الماء الذي يحتوي على السيليلوز البكتيري بتركيز نهائي يبلغ ٠,١ ± ٠,٠٠٦% (وزن/وزن) بنسبة ٣٥% أو أكثر.

(٢) السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي له كذلك خاصية فيزيائية مقدار احتجاز للقمة العليا من مُخَطَّط الكروماتوغراف في كروماتوجراف نفاذية الجل المنفذ في ظل الظروف التالية i) إلى vi) من ٢,٥ ملي لتر متضمن إلى ٣,٠ ملي لتر مستثنى:

i) عمود: عمود ٦,٠ مم في قطر داخلي و١٥ سم في الطول، معبأ بميث أكريلات بوليمر له حجم جسيم يبلغ ٩ ميكرومتر؛ ii) عمود واقي: ٤,٦ مم في قطر داخلي و٣,٥ سم في الطول؛ iii) درجة حرارة العمود: ٣٥ درجة مئوية؛ iv) معدل تدفق تيار التغذية: ٠,٠٧ ملي لتر/دقيقة؛ v) ناتج التصفية: من ٤٠ إلى ٤٢% (وزن/وزن) محلول مائي من هيدروكسيد تترا بيوتيل فُسْفُونْيُوم؛ وvi) تركيز نهائي من السيليلوز البكتيري في ناتج التصفية: ٠,٢% (وزن/وزن).

(٣) يتم إنتاج السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي بصورة مفضلة بواسطة استيعاب BDF-B.

(٤) السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي يتم إنتاج بصورة مفضلة بواسطة استيعاب ١ أو ٢ أو أكثر منتقاه منن المجموعة التي تتكون من السكر، منتج ثانوي يحتوي على سَكَرُوز مولد في إنتاج السكر، ونواتج تحلل منها، وسكر تمت أزمرته.

(٥) يكون المنتج الثانوي بصورة مفضلة عبارة عن دبس السكر عندما يتم إنتاج السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي بواسطة استيعاب يحتوي المنتج الثانوي على سَكَرُوز مولد في إنتاج السكر.

(٦) يمكن أن يكون السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي عبارة عن منتج واحد بواسطة Gluconacetobacter intermedius.

(٧) يمكن أن يكون السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي عبارة عن منتج واحد بواسطة Gluconacetobacter intermedius من سلالة SIID9587 (السلالة NEDO-01) (رقم الوصول NITE BP-01495).

(٨) يتم تمييز البكتيريا وفقا للاختراع الحالي بواسطة إنتاج السيليلوز البكتيري وفقا لأي من (١) إلى (٥) أعلاه.

(٩) البكتيريا وفقا للاختراع الحالي يمكن أن يكون عبارة عن Gluconacetobacter intermedius من سلالة SIID9587 (السلالة NEDO-01) (رقم الوصول NITE BP-01495) إنتاج السيليلوز البكتيري وفقا لأي من (١) إلى (٥) أعلاه.

التأثيرات المفيدة للاختراع : يمكن أن يوفر السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي سيليلوز بكتيري تقريبا بانتظام قابل للتشتت في السوائل مثل الماء، ويمكن أن يساهم في تحسين في جودة المنتج النهائي وكفاءة الانتاج أو اختزال في تكاليف الإنتاج حيث هذا السيليلوز البكتيري يكون ممتاز في قابلية التشكيل وقابلية الامتزاج مع المواد الأخرى. يمكن أن يوفر الاختراع الحالي سيليلوز بكتيري قابل للتشتت بانتظام تقريبا في السوائل بواسطة التنقية في ظل ظروف معدلة بدون الحاجة إلى خطوات التصفية باستخدام خلاط وما شابه، ويمكن أن يوفر سيليلوز بكتيري له وزن جزيئي بمتوسط كبير نسبيا. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يساهم الاختراع الحالي في استخدام مورد فعال باستخدام منتج ثانوي يحتوي على سَكَرُوز مولد في إنتاج السكر، مثل BDF-B أو دبس السكر، كمصدر كربون، ويمكّن تحقيق اختزال في السيليلوز البكتيري. كذلك، يمكن أن يوفر الاختراع

الحالي بشكل فعال كمية كبيرة من سيليلوز بكتيري بواسطة الإنتاج باستخدام Gluconacetobacter intermedius أو Gluconacetobacter intermedius من سلالة SIID9587 (السلالة NEDO-01).

شرح مختصر للرسومات

الشكل ١ : عبارة عن مخطط انسيابي يبين بروتوكول لعزل بكتيريا منتجة لسيليلوز بكتيري بواسطة التمثيل الغذائي لـ BDF-B. في الشكل، يتم اختصار السيليلوز البكتيري بـ BC.

الشكل ٢أ : عبارة عن مخطط يبين نقاط الهوية والتباين بين متواليات نيوكليوتيد 16S rDNA للسلالة SIID9587 و G. intermedius strain TF2. في الشكل، تعيين النقاط في متواليات النيوكليوتيد nucleotide sequences يتم تمثيلها بواسطة العلامات* وتباين النقاط يتم تمثيله بواسطة مربعات رباعية الزوايا. في الشكل، يشير G. intermedius إلى G. intermedius strain TF2.

الشكل ٢ب : عبارة عن مخطط يبين نقاط التعيين والتفاوت بين متواليات نيوكليوتيد 16S rDNA للسلالة SIID9587 و G. intermedius strain TF2. في الشكل، تعيين النقاط في متواليات النيوكليوتيد يتم تمثيله بواسطة العلامات* وتباين النقاط يتم تمثيله بواسطة مربعات رباعية الزوايا. في الشكل، يشير G. intermedius إلى G. intermedius strain TF2.

الشكل ٣ : عبارة عن سلسلة من المخططات البيانية تبين IR طيف من سيليلوز بكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) لمزرعة ثابتة (مخطط بياني علوي) ومنتجات تم الحصول عليها بواسطة مزرعة مهواه ومقلبة باستخدام BDF-B وجليسيرول كاشف كمصادر كربون (المخططات البيانية الوسطى والسفلية).

الشكل ٤: عبارة عن سلسلة من صور فوتوغرافية تبين هيئة الصور المائية التي تحتوي كل منها على أنواع سيليلوز بكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G.

intermedius من السلالة SIID9587) لمزرعة مهواه ومقلبة ومزرعة ثابتة (يسرى ووسطى) وألياف نانومترية من سيليلوز بكتيري مشتق من لُبّ (يمنى).

الشكل ٥ : عبارة عن سلسلة من الرسومات تبين نفاذية الضوء عند طول موجي يبلغ ٥٠٠ نانومتر من الصور المائية التي تحتوي على أنواع سيليلوز بكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) لمزرعة مهواه ومقلبة باستخدام دبس السكر وجليسيرول كاشف كمصادر كربون، على التوالي، وكمية السيليلوز البكتيري المنتج (كمية BC المنتج) ومعدل إنتاجه (معدل إنتاج BC).

الشكل ٦ عبارة عن سلسلة من الرسومات تبين نفاذية الضوء عند طول موجي يبلغ ٥٠٠ نانومتر من الصور المائية التي تحتوي على أنواع سيليلوز بكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) والبكتيريا المعروفة المنتجة للسيليلوز البكتيري G. hansenii من سلالة ATCC23769، G. xylinus من سلالة ATCC53582، G. xylinus من سلالة ATCC700178 (BPR2001)، G. xylinus من سلالة JCM10150، G. intermedius من سلالة DSM11804، و G. xylinus من سلالة KCCM40274 لمزرعة مهواه ومقلبة، وكمية BC المنتج، معدل إنتاج BC، ونسبة معدل إنتاج BC.

الشكل ٧ : عبارة عن مخطط بياني يبين مُخَطَّطات كروماتوغراف لكروماتوجراف نفاذية الجل للسيليلوز البكتيري الذي تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) لمزرعة دوران باستخدام BDF-B كمصدر كربون (العينة ب)، ألياف نانومترية nanofiber لسيليلوز مشتق من لُبّ (محلول CNF مشتق من لُبّ)، وبولولان pullulan.

الشكل ٨ : عبارة عن زوج من صور فوتوغرافية تبين قيم عرض الألياف والصور الملحوظة بنقل التصوير المجهري للالكترون لأنواع سيليلوز بكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) لمزرعة مهواه ومقلبة (محلول BC لمزرعة مقلبة) ومزرعة ثابتة (محلول BC لمزرعة ثابتة معالجة بالخلاط).

الشكل ٩ : عبارة عن زوج من صور فوتوغرافية تبين الصور الملحوظة بنقل التصوير المجهري للالكترون للسيليلوز البكتيري الذي تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) لمزرعة مهواه ومقلبة (محلول BC لمزرعة مقلبة) وألياف نانومترية لسيليلوز مشتق من لُبّ (محلول CNF مشتق من لُبّ).

الشكل ١٠ : عبارة عن زوج من صور فوتوغرافية تبين the استقطاب الصور الملحوظة بالتصوير المجهري للسيليلوز البكتيري الذي تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) لمزرعة مهواه ومقلبة (محلول BC لمزرعة مقلبة) وألياف نانومترية لسيليلوز مشتق من لُبّ (محلول CNF مشتق من لُبّ).

الشكل ١١ : عبارة عن رسم بياني يبين وزن أنواع سيليلوز بكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) والبكتيريا المعروفة المنتجة للسيليلوز البكتيري G. hansenii من سلالة ATCC23769، G. xylinus من سلالة ATCC53582، و G. xylinus من سلالة ATCC700178 (BPR2001) إلى مزرعة ثابتة باستخدام جليسيرول كاشف أو BDF-B كمصدر كربون.

الشكل ١٢ : عبارة عن رسم بياني يبين وزن أنواع سيليلوز بكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) والبكتيريا المعروفة المنتجة للسيليلوز البكتيري، السلالة ATCC53582 والسلالة ATCC23769، لهزّ مزرعة باستخدام جليسيرول كاشف أو BDF-B كمصدر كربون.

الوصف التفصيلي:

سيتم وصف السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي والبكتيريا المنتجة له أدناه بالتفصيل. يشير السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي إلى سيليلوز منتج بواسطة بكتيريا.

لغرض الاختراع الحالي، يشير مصطلح سيليلوز بكتيري "يتم تشتيته dispersed " في سائل مثل الماء إلى سيليلوز بكتيري يكون طافي أو معلق في السائل. تشير قابلية التشتيت العالية إلى، على سبيل المثال، حجم الجسيم أو عرض ألياف السيليلوز البكتيري كمادة مشتتة تكون صغيرة نسبيا في سائل، أو السيليلوز البكتيري كمادة مشتتة تكون طافية أو معلقة بانتظام نسبيا في السائل.

يتمتع السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي بقابلية تشتيت عالية بالقدر الذي به مشتت بانتظام تقريبا في سائل. هنا، يمكن أن يكون السائل الذي يتم فيه تشتيت السيليلوز البكتيري عبارة عن أي من مذيب عضوي organic solvent ومذيب مائي aqueous solvent ؛ مع ذلك، يكون مذيب مائي مفضل.

يمكن قياس مدى زيادة أو انخفاض قابلية تشتيت سيليلوز بكتيري، على سبيل المثال، باستخدام نفاذية الضوء كمؤشر؛ تثبت العلاقة مصداقية أن نتائج أعلى قابلية تشتيت في نفاذية ضوء أكبر وقابلية تشتيت أقل ينتج عنه نفاذية ضوء أصغر. يمكن تحديد نفاذية الضوء بواسطة توفير الماء الذي يحتوي على السيليلوز البكتيري بتركيز محدد مسبقا لمقياس الطيف الضوئي، تسليط إشعاع الماء بالضوء عند طول موجي محدد مسبقا، وقياس كمية الضوء المرسل.

السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي له خاصية فيزيائية لنفاذية ضوء عند طول موجي يبلغ ٥٠٠ نانومتر من الماء الذي يحتوي على السيليلوز البكتيري بتركيز نهائي يبلغ ٠,١ ± ٠,٠٠٦% (وزن/وزن) بنسبة ٣٥% أو أكثر. هنا، أمثلة على نفاذية الضوء عند طول موجي يبلغ ٥٠٠ نانومتر من الماء الذي يحتوي على السيليلوز البكتيري بتركيز نهائي يبلغ ٠,١ ± ٠,٠٠٦% (وزن/وزن) وفقا للاختراع الحالي يمكن أن تتضمن ٣٥% أو أكثر إلى جانب ٣٦% أو أكثر، ٣٧% أو أكثر، ٣٨% أو أكثر، ٣٩% أو أكثر، ٤٠% أو أكثر، ٣٥% إلى ٩٩% (كلاهما متضمن)، ٣٦% إلى ٩٩% (كلاهما متضمن)، ٣٧% إلى ٩٩% (كلاهما متضمن)، ٣٨% إلى ٩٩% (كلاهما متضمن)، ٤٠% إلى ٩٩% (كلاهما متضمن)، ٣٥% إلى ٩٥% (كلاهما متضمن)، ٣٦% إلى ٩٥% (كلاهما متضمن)، ٣٧% إلى ٩٥% (كلاهما متضمن)، ٣٨% إلى ٩٥% (كلاهما متضمن)، ٤٠% إلى ٩٥% (كلاهما متضمن)، ٣٥% إلى ٩٠% (كلاهما متضمن)، ٣٦% إلى ٩٠% (كلاهما متضمن)، ٣٧% إلى ٩٠% (كلاهما متضمن)، ٣٨% إلى ٩٠% (كلاهما متضمن)، ٤٠% إلى ٩٠% (كلاهما متضمن)، ٣٥% إلى ٨٥% (كلاهما متضمن)، ٣٦% إلى ٨٥% (كلاهما متضمن)، ٣٧% إلى ٨٥% (كلاهما متضمن)، ٣٨% إلى ٨٥% (كلاهما متضمن)، ٤٠% إلى ٨٥% (كلاهما متضمن)، ٣٥% إلى ٨٠% (كلاهما متضمن)، ٣٦% إلى ٨٠% (كلاهما متضمن)، ٣٧% إلى ٨٠% (كلاهما متضمن)، ٣٨% إلى ٨٠% (كلاهما متضمن)، و٤٠% إلى ٨٠% (كلاهما متضمن).

يمكن أن يتمتع السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي أيضا بمتوسط وزن جزيئي كبير مقارنة بذلك الخاص بسيليلوز مشتق من نبات، مثل ألياف نانومترية لسيليلوز مشتق من لُبّ. يمكن قياس متوسط الوزن الجزيئي لسيليلوز باستخدام، على سبيل المثال، مُخَطَّط كروماتوغراف في كروماتوجراف نفاذية الجل كمؤشر؛ تثبت العلاقة مصداقية أن وزن جزيئي أصغر ينتج عنه مقدار احتجاز أكبر للقمة العليا لمُخَطَّط الكروماتوغراف المذكور ووزن جزيئي أكبر ينتج عنه مقدار احتجاز أصغر. بصفة خاصة، يمكن أن يتمتع السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي بالخاصية الفيزيائية لمقدار احتجاز القمة العليا من مُخَطَّط الكروماتوغراف في كروماتوجراف نفاذية الجل المنفذ في ظل الظروف التالية i) إلى vi) من ٢,٥ ملي لتر متضمن إلى ٣,٠ ملي لتر مستثنى: i) العمود يكون عبارة عن عمود ٦,٠ مم في قطر داخلي و١٥ سم في الطول، معبأ بميث أكريلات بوليمر له حجم جسيم يبلغ ٩ ميكرومتر؛ ii) العمود واقي يكون عبارة عن ٤,٦ مم في قطر داخلي و٣,٥ سم في الطول؛ iii) درجة حرارة العمود يكون عبارة عن ٣٥ درجة مئوية؛ iv) معدل تدفق تيار التغذية يبلغ ٠,٠٧ ملي لتر/دقيقة؛ v) ناتج التصفية يتراوح من ٤٠ إلى ٤٢% (وزن/وزن) محلول مائي من هيدروكسيد تترا بيوتيل فُسْفُونْيُوم tetrabutylphosphonium hydroxide؛ و vi) التركيز النهائي من السيليلوز البكتيري في ناتج التصفية يبلغ ٠,٢% (وزن/وزن).

يمكن إنتاج السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي، على سبيل المثال، بواسطة جعل بكتيريا تقوم بإنتاج سيليلوز بكتيري بواسطة مزرعة في وسط مزرعة يحتوي على مصدر كربون carbon source مناسب.

هنا، أمثلة على مصدر الكربون يمكن أن تتضمن سكريدات أحادية monosaccharides ، مثل جلوكوز glucose وفركتوز fructose ؛ سكريدات ثنائية disaccharides ، مثل سَكَرُوز sucrose ، مالتوز maltose ، ولاكتوز lactose ؛ قليل السكريدات oligosaccharides ؛ السكر؛ منتجات ثانوية تحتوي على سَكَرُوز sucrose منتجة في إنتاج السكر، نواتج تحلل منها، وسكر تمت أزمرته isomerized sugar ؛ سكريدات saccharides ، مثل النشا نواتج تحلل؛ مانيتول mannitol ؛ إيثانول ethanol ؛ حمض أسيتيك acetic acid ؛ حمض سيتريك citric acid ؛ جليسيرول glycerol ؛ و BDF-B. يمكن ضبط مصدر الكربون بصورة مناسبة بناء على نوع البكتيريا، ظروف المزرعة، تكلفة الإنتاج، وما شابه. يتكون BDF-B من ٤١,٥%

من جليسيرول ، ٢١,٤% من حمض دهني، ١٢,٤% من ميثانول، ٦,٣% من بقايا الاحتراق، و١٨,٤% من المواد الأخرى (Japan Food Research Laboratories) كتركيبة نمطية، ويكون عبارة عن تركيبة تحتوي على كمية كبيرة من الجليسيرول المتاح كمصدر كربون للبكتيريا.

هنا، يشير السكر إلى مادة تحلية تتكون بصورة أساسية من سَكَرُوز sucrose (Kohjien, 6th Ed.)، و، لغرض الاختراع الحالي، يمكن أن يكون عبارة عن مادة تم تخليقها كيميائيا، أو مادة تم إنتاجها باستخدام منتج طبيعي، مثل قصب السكر ، بنجر السكر (البنجر الأبيض)، قيقب السكر، gomuti (النخيل الدليب)، الذُرَة السُكّرِيّة (Sorghum bicolor dulciusculum)، كمادة خام. أمثلة على السكر وفقا للاختراع الحالي يمكن أن تتضمن السكر بغير نوع الطرد المركزي، مثل muscovado، shiroshita-to، casonade (سكر بني)، wasanbon، أو سكر قيقب، وسكر من نوع طرد مركزي، مثل سكر خام أو السكر المكرر. أمثلة على السكر المكرر يمكن أن تتضمن السكر الخشن، مثل shirozara-to، سكر ناعم متوسط الحجم ببلورات خشنة، أو سكر حبيبي؛ السكر الناعم، مثل سكر ناعم فائق البياض أو سكر ناعم مصفر؛ سكر معالج، مثل سكر على شكل مكعب، سكر بلوري، سكر مسحوق، أو سكر متبلر؛ وسكر سائل.

يشير المنتج الثانوي الذي يحتوي على سَكَرُوز مولد في إنتاج السكر إلى منتج يحتوي على سَكَرُوز من بين منتجات ثانوية تم إنتاجها في خطوة إنتاج السكر، ويمكن أن تتضمن الأمثلة المحددة لها كسبة المواد الخام الطبيعية، مثل قصب السكر وبنجر السكر على النحو المذكور أعلاه؛ دبس السكر؛ والبقايا التي تم إنتاجها في خطوة تنقية بالترشيح أو راتنج التبادل الأيوني ion-exchange resin.

ناتج تحلل hydrolysate سكريد ثنائي disaccharide ، قليل السكريد oligosaccharide ، السكر، أو منتج ثانوي يحتوي على سَكَرُوز مولد في إنتاج السكر يشير إلى واحد تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السكريد الثنائي، قليل السكريد، السكر، أو منتج ثانوي يحتوي على سَكَرُوز مولد في إنتاج السكر للمعالجة بالتحلل بالماء، مثل التسخين في محلول حمضي acidic solution.

المكونات في وسط المزرعة بخلاف مصدر الكربون يمكن أن تكون هي نفس المكونات مثل تلك الموجودة في وسط المزرعة المعروف جيدا المستخدم لمزرعة البكتيريا، وبصورة مفضلة تحتوي

على CMC. أمثلة محددة على وسط المزرعة المذكور يمكن أن تتضمن أوساط مزرعة مادة غذائية مشتركة تحتوي على CMC، مصادر نيتروجين nitrogen sources ، أملاح غير عضوية inorganic salts ، و، حسب الحاجة، مواد غذائية عضوية بمقدار ضئيل، مثل الأحماض الأمينية amino acids والفيتامينات. أمثلة على مصدر النيتروجين يمكن أن تتضمن مصادر نيتروجين عضوية أو غير عضوية organic or inorganic nitrogen sources ، مثل أملاح الأمونيوم ammonium salts (على سبيل المثال، كبريتات الأمونيوم ammonium sulfate ، الأمونيوم كلوريد ammonium chloride ، وفوسفات الأمونيوم ammonium phosphate)، نيترات nitrates ، يوريا urea ، أو ببتون peptone. أمثلة على الملح غير العضوي يمكن أن تتضمن فوسفات phosphates ، أملاح مغنسيوم magnesium salts ، أملاح الكالسيوم calcium salts ، أملاح حديد iron salts ، وأملاح المنجنيز manganese salts. أمثلة على المادة الغذائية العضوية بمقدار ضئيل يمكن أن تتضمن الأحماض الأمينية ، الفيتامينات، الأحماض الدهنية fatty acids ، الأحماض النووية nucleic acids ، وببتون إضافي، أحماض كازامينو casamino acids ، مستخلصات خمائرية yeast extracts ، ونواتج تحلل بروتين الصويا التي تحتوي على المواد الغذائية. عندما يتم استخدام طافرة عَونِيَّة التَّغَذِّي auxotrophic mutant تتطلب الأحماض الأمينية للنمو، يمكن استكمال المواد الغذائية المطلوبة بصورة إضافية.

لا تكون البكتيريا مقيدة تحديدا شريطة أنها يمكن أن تنتج سيليلوز بكتيري؛ مع ذلك، يكون من المفضل بكتيريا قادرة على إنتاج السيليلوز البكتيري في ظل مزرعة مقلبة أو مزرعة مهواه، بصورة أكثر تفضيلا بكتيريا التمثيل الغذائي لـ BDF-B. الأمثلة المحددة منها يمكن أن تتضمن بكتيريا من نوع Acetobacter، جنس Gluconacetobacter، نوع Pseudomonas، نوع Agrobacterium، نوع Rhizobium، ونوع Enterobacter. أمثلة أكثر تحديدا منها يمكن أن تتضمن Gluconacetobacter intermedius، Gluconacetobacter hansenii، Gluconacetobacter swingsii، Acetobacter pasteurianus، Acetobacter aceti، بكتيريا Acetobacter xylinum، مخمرات سكرية من جنس فرعي لبكتيريا Acetobacter xylinum، بكتيريا Acetobacter xylinum من جنس فرعي nonacetoxidans،

Enterobacter و ،Bacterium xyloides ،Sarcina ventriculi ،Acetobacter ransens sp.؛ مع ذلك، من بينها، Gluconacetobacter intermedius تكون مفضلة. لا تزال أمثلة أكثر تحديدا منها يمكن أن تتضمن Gluconacetobacter intermedius من سلالة SIID9587 (السلالة NEDO-01) (رقم الوصول NITE BP-01495)، Gluconacetobacter xylinus من السلالة ATCC53582، Gluconacetobacter hansenii من السلالة ATCC23769، Gluconacetobacter xylinus من السلالة ATCC700178 (BPR2001)، Gluconacetobacter swingsii من السلالة BPR3001E، بكتيريا Acetobacter xylinum من السلالة JCM10150، ونوع Enterobacter من السلالة CJF-002؛ من بينها، Gluconacetobacter intermedius من سلالة SIID9587 (السلالة NEDO-01) (رقم الوصول NITE BP-01495) تكون مفضلة.

يمكن أن تتضمن طرق الاستنبات، على سبيل المثال، مزرعة مقلبة ومزرعة مهواه. أمثلة محددة على المزرعة المقلبة يمكن أن تتضمن مزرعة باستخدام مخمر، لا تنطوي على التهوية (مزرعة غير مهواه ومقلبة)، زراعة باستخدام مخمر، تنطوي على التهوية (مزرعة مهواه ومقلبة)، مزرعة تحت في ظل تأرجح من جانب لآخر باستخدام دورق بحاجز (مزرعة رجّ)، ومزرعة دوارة باستخدام دورق بحاجز (مزرعة دوران). يمكن أن تكون ظروف المزرعة عبارة عن ظروف مزرعة معروفة جيدا مستخدمة لمزرعة البكتيريا المذكورة أعلاه؛ أمثلة لها يمكن أن تتضمن ظروف مزرعة لحجم تهوية يتراوح من ١ إلى ١٠ لتر/دقيقة، لتر/دقيقة من ١٠٠ إلى ٨٠٠ دورة في الدقيقة، درجة حرارة تتراوح من ٢٠ إلى ٤٠ درجة مئوية، وفترة زراعة تتراوح من ١ يوم إلى ٧ أيام.

في إنتاج السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي، خطوة المعالجة المسبقة لمصدر كربون، خطوة مسبقة لمزرعة مسبقة، خطوة مزرعة مسبقة، خطوة تنقية، تجفيف، وتعليق السيليلوز البكتيري، وما شابه يمكن تنفيذها، حسب الحاجة.

يمكن استخدام السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي، على سبيل المثال، كمادة إضافة لعوامل تقوية الورق، عوامل اكساب قوام للمنتجات الغذائية، مثبتات تعليق، وما شابه.

بعد ذلك، تنتج البكتيريا وفقا للاختراع الحالي السيليلوز البكتيري الموصوف أعلاه. بالنسبة للبكتيريا المنتجة للسيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي، سيتم وصف نفس المكونات أو مكونات مكافئة لتلك الخاصة بالسيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي مرة أخرى.

سيتم وصف السيليلوز البكتيري وفقا للاختراع الحالي والبكتيريا المنتجة له أدناه بناء على الأمثلة. مع ذلك، لا يهدف النطاق الفني للاختراع الحالي إلى أن يكون مقتصر على السمات التي تم عرضها بواسطة تلك الأمثلة.

الأمثلة

المثال ١: عزل وتحديد البكتيريا

(١) عزل البكتيريا

البكتيريا إنتاج سيليلوز بكتيري بواسطة التمثيل الغذائي لـ BDF-B تم عزل. بصفة خاصة، باستخدام البروتوكول المبين في الشكل ١، تم إجراء مزرعة إثراء أولا باستخدام وسط مزرعة يحتوي على ٢% (وزن/حجم) من جليسيرول كاشف (كاشف مضمون من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) بدلا من الجلوكوز في وسط المزرعة قياسي من Hestrin-Schramm (تركيبة؛ bacto pepton ٠,٥% (وزن/حجم)، مستخلص خميرة ٠,٥% (وزن/حجم)، ٤HPO٢Na ٠,٢٧% (وزن/حجم)، حمض سيتريك ٠,١١٥% (وزن/حجم)، جلوكوز ٢% (وزن/حجم)؛ وسط المزرعة HS) (وسط مزرعة HS/جليسيرول) باستخدام التفاح والبرقوق كمصادر فصل. تم تلقيح البكتيريا الناتجة على وسط مزرعة جليسيرول/HS يحتوي على كاشف تلوّن سيليلوز وتمت زراعتها في أطباق عند ٣٠ درجة مئوية، وتم اختيار ١٥ سلالة بكتيرية تنتج أنواع سيليلوز بكتيري. بشكل لاحق، تم تلقيح هذه السلالات في وسط مزرعة LB (تركيبة؛ تريبسين ١% (وزن/حجم)، مستخلص خميرة ٠,٥% (وزن/حجم)، وكلوريد الصوديوم sodium chloride ٠,٥% (وزن/حجم)) يحتوي على ٢% (وزن/حجم) من جليسيرول كاشف (كاشف مضمون من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) وتم إخضاعها لمزرعة ثابتة عند ٣٠ درجة مئوية لتكوين أغشية هلامية. تم قياس الوزن الجاف للأغشية الهلامية (فيما بعد، مشار إليها باسم "وزن غشاء جاف")، وتم اختيار ٨ سلالات كان وزن الغشاء الجاف بالنسبة لها كبير

باعتبارها بكتيريا التمثيل الغذائي لجليسيرول ولها قدرة منتجة لسيليلوز بكتيري عالية. بعد ذلك، تم تلقيح هذه السلالات في وسط مزرعة LB يحتوي على BDF-B وتمت زراعتها في أطباق عند ٣٠ درجة مئوية، وتم تلقيحها كذلك في وسط المزرعة HS وتم إخضاعها لمزرعة ثابتة عند ٣٠ درجة مئوية لتكوين أغشية هلامية. تم تكرار عملية اختيار سلالة بكتيرية كان وزن الغشاء الجاف بالنسبة لها كبير من بين أنواع البكتيريا هذه، زراعة في أطباق باستخدام الجليسيرول-الذي يحتوي على وسط مزرعة LB أو وسط مزرعة HS/جليسيرول، وبعد ذلك إخضاع الناتج لمزرعة ثابتة في وسط المزرعة HS لاختيار سلالة بكتيرية واحدة تتمتع بخاصية تمثيل غذائي-BDF-B ولها قدرة منتجة لسيليلوز بكتيري عالية، والتي تسمى السلالة SIID9587.

(٢) تحديد البكتيريا

تم إجراء التسلسل وفقا لطريقة عادية لسلالة SIID9587 ١ (١) وفقا لهذا المثال لتحديد متوالية النيوكليوتيد لـ 16S rDNA بطول كامل (1367 bp؛ متوالية بهوية رقم: ١). بشكل لاحق، تحليل متوالية نيوكليوتيد 16S rDNA وتم إجراء اختبار خاصية بكتيرية جرثومية في TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.

[٢-١] تحليل متوالية نيوكليوتيد 16S rDNA

تم إجراء تحليل متوالية نيوكليوتيد 16S rDNA باستخدام Aporon 2.0 (TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.) كبرنامج و6.0 Aporon DB-BA (TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.) وقاعدة بيانات متوالية نيوكليوتيد الدولية (GenBank/DDBJ/EMBL) باعتبارها قاعدة بيانات. كنتيجة لتطابق البحث مع Aporon DB-BA 6.0، تم اكتشاف أن متوالية نيوكليوتيد 16S rDNA للسلالة SIID9587 (متوالية بهوية رقم: ١) تتمتع بتطابق عالي لمتوالية نيوكليوتيد 16S rDNA للجنس Gluconacetobacter وتتمتع بأعلى تطابق لمتوالية نيوكليوتيد 16S rDNA لـ G. intermedius strain TF2 (رقم الوصول Y14694) (معدل التطابق: ٩٩,٨%). كنتيجة لتطابق البحث مع GenBank/DDBJ/EMBL، تم أيضا اكتشاف أن متوالية نيوكليوتيد 16S rDNA للسلالة SIID9587 (متوالية بهوية رقم: ١) تتمتع بتطابق عالي لمتوالية نيوكليوتيد 16S

rDNA للجنس Gluconacetobacter، ولسلالة النوع تم اكتشاف أنها تتمتع بتطابق عالي لمتوالية نيوكليوتيد 16S rDNA the لـ G. intermedius strain TF2 (رقم الوصول NR_026435) (معدل التطابق: ٩٩,٨%). تكون متوالية رقم الوصول Y14694 متطابقة مع متوالية رقم الوصول NR_026435. تم توضيح نتائج المقارنة بين متواليات نيوكليوتيد 16S rDNA للسلالة SIID9587 و G. intermedius strain TF2 (رقم الوصول Y14694 أو NR_026435) في الأشكال ٢-١ و٢-٢. على النحو المبين في الأشكال ٢-١ و٢-٢، كانت ٤ نيوكليوتيدات متباينة بين كلا المتواليتين. في بحث التطابق مع Aporon DB-BA 6.0، كنتيجة لتحليل تطور السلالات الجزيئية البسيط بناء على متواليات نيوكليوتيد 16S rDNA لأعلى ١٥ سلالة بها تطابق عالي، تم اكتشاف أن السلالة SIID9587 متضمنة في المجموعة العنقودية المكونة بواسطة نوع من جنس Gluconacetobacter.

[٢-٢] اختبار خاصية بكتيرية جرثومية

نتائج اختبار خاصية بكتيرية جرثومية تم توضيحها في الجدول التالي.

بند الاختبار	SIID9567
درجة حرارة المزرعة (°م)	٣٠
البنية التشابكية للخلية	عضوي (٠,٧ -٠,٨ × ١,٥-٢,٥ ميكرومتر)
زيادة النمو بالجرام	-
وجود او غياب البذرة	-
ثنائية الحركة	-
التنمية التشابكية للمستعمرة	وسط مزرعة GYCACAR
	زمن المزرعة ٨٤ ساعة

	قطر : ١٠٠-٢٠٠مم
	درجة اللون : ابيض مصفر
	الشكل / دائري
	حالة الرفع : نصف كروي
	المحيط : باكمله
	الشكل والارتباط بالسطح : املس
	درجة الشفافية : معتم
	اللزوجة : مثل الزبدة
اختبار درجة حرارة النمو (°م)	+
تفاعل المحفز	–
تفاعل الاكسدة	+
انتاج حمض/غاز من جلوكوز (انتاج حمض/ انتاج غاز)	–
اختبار الاكسدة والتخمر	غير مختبر
+ موجب – سالب لم يتم اختباره غير مختبر	
بند الاختبار	–
انتاج الصبغة في وسط مزرعة GYC	–
النمو في ظروف لاهوائية	+

النمو في ظل اسيتات الصوديوم	+
الاكسدة	
n – بروبانول Propanol	+
جليكوز	+
ايثانول	+
تمثيل غذائي	
ايثانول	+
جليسرين	+
لاكتات الصوديوم Sodium lactate	+
سكروز	W+
النمو في ٣ % ايثانول	+
النمو في ٥% حمض اسيتيك	–
النمو في ٣٠ % جلوكوز متوسط الاحتواء	+
النمو في MR.SAGAP	+

على النحو المبين في الجدول اعلاه، كانت السلالة SIID9587 مختلفة في الخاصية من حيث عدم النمو على وسط مزرعة يحتوي على ٥% حمض أسيتيك acetic acid عن G. intermedius المعروف ولا تختلف في الخواص الأخرى لها (BRENNER et al., Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. The Proteobacteria, Part C The Alpha–, Beta–, Delta–, and Epsilonproteobacteria. 2005. Springer. p72–77).

أبدت النتائج الخاصة بـ (٢) [٢-١] و[٢-٢] لهذا المثال ١ أن السلالة SIID9587 انتمت إلى Gluconacetobacter intermedius. من الناحية الأخرى، تم توضيح أن السلالة SIID9587 كانت عبارة عن سلالة جديدة من G. intermedius حيث تظهر الفروق في متوالية نيوكليوتيد 16S rDNA والخاصية البكتيرية الجرثومية بين السلالة SIID9587 وسلالة Gluconacetobacter intermedius TF2 كنوع سلالة لـ G. intermedius المبين أعلاه. بالتالي، هذه الاحتفاظ بهذه السلالة البكتيرية في المعهد الوطني للتكنولوجية والتقييم، مستودع الكائنات الدقيقة لبراءات الاختراع (NITE-IPOD; #122, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japan) في ظل رقم الوصول NITE BP-01495، ٢١ ديسمبر، ٢٠١٢. فيما بعد، تمت تسمية الGluconacetobacter intermedius من سلالة SIID9587 (رقم الوصول NITE BP-01495) السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587).

(٣) تحديد منتج

تمت زراعة السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) أوليا من أجل تكاثر الخلايا البكتيرية. بشكل لاحق، تمت إضافة محلول المزرعة الذي تم الحصول عليه بواسطة المزرعة الأولية (محلول المزرعة الأولية) إلى وسط المزرعة HS (مصدر كربون ؛ جلوكوز)، والتي تم بعد ذلك إخضاعها لمزرعة ثابتة عند ٣٠ درجة مئوية لمدة حوالي ٨ أيام لتنفيذ المزرعة الأساسية لتكوين غشاء هلامي في سطح وسط المزرعة. تم الحصول على طيف الآشعة تحت الحمراء infrared spectroscopy (IR) وهيئة حيود الآشعة السينية للغشاء الهلامي وتم التحليل وفقا لطريقة عادية. نتيجة لذلك، أبدى الغشاء الهلامي أنه عبارة عن سيليلوز بتصمن بنية بلورية من النوع I. كنتيجة للحصول على وتحليل لمسح صورة تصوير مجهري لإلكتروني وفقا لطريقة عادية، ألياف السيليلوز لها عرض يبلغ حجم النانو (ألياف السيليلوز نانومترية cellulose nanofibers) والتي أبدت أنها تكون بنية شبكة في الغشاء الهلامي. من هذه النتائج، يتم تحديد السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) لإنتاج سيليلوز.

المثال ٢: تقييم منتج تم الحصول عليه بواسطة مزرعة مهواه ومقلبة

(١) تحضير منتج بواسطة مزرعة مهواه ومقلبة

تم إخضاع BDF-B لمعالجة معادلة وتم الإخضاع بعد ذلك إلى معالجة بأوتوكلاف لتقديم BDF-B المعالج أوليا.

تم تحضير أوساط مزرعة حيث تمت إضافة جليسيرول كاشف (كاشف مضمون من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) بدلا من الجلوكوز كمصدر كربون في وسط المزرعة HS التي تحتوي على ٢% (وزن/حجم) CMC (الدرجة الكيميائية، من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) وحيث تمت إضافة BDF-B المعالجة أوليا إلى تركيز من ٢% (وزن/حجم) بدلا من جلوكوز في وسط المزرعة HS الذي يحتوي على CMC، ويسمى وسط المزرعة الأساسي مع جليسيرول ووسط المزرعة الأساسي بـ BDF-B، على التوالي. تمت زراعة السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) أولا لتكاثر الخلايا البكتيرية. بعد ذلك، تم تلقيح محلول المزرعة الأولية على ٥ لتر لكل من وسط المزرعة الأساسي بجليسيرول ووسط المزرعة الأساسية بـ BDF-B وباستخدام المخمر، تم الاخضاع لمزرعة مهواه ومقلبة لمدة ٤ أيام في ظل ظروف مقدار تهوية يتراوح من ٧ إلى ١٠ لتر/دقيقة، عدد دورات يتراوح من ٢٠٠ إلى ٨٠٠ دورة في الدقيقة، ودرجة حرارة تتراوح من ٣٠ درجة مئوية لتنفيذ المزرعة الأساسية. تمت إضافة محلول مائي من ١% (وزن/حجم) من NaOH إلى محلول المزرعة الذي تم الحصول عليه بواسطة المزرعة الأساسية (محلول المزرعة الأساسية)، والتي تم رجها بعد ذلك عند ٦٠ درجة مئوية و٨٠ دورة في الدقيقة لمدة ٤ إلى ٥ ساعات من أجل تحليل الخلايا البكتيرية. بعد إخضاع الناتج للطرد المركزي، تمت إزالة المواد الطافية لاستخلاص المواد المترسلة لإزالة مكونات الخلايا البكتيرية القابلة للذوبان في الماء. تم تكرار عملية إضافة الماء فائق النقاء إليها قم تنفيذ الطرد المركزي وبعد ذلك إزالة المواد الطافية لحين وصول الرقم الهيدروجيني للمواد المترسبة في الحالة الرطبة ٧ أو أقل لتنقية المنتج، وتمت تسمية الناتج محلول BC لمزرعة مقلبة.

(٢) تحضير السيليلوز البكتيري بواسطة المزرعة الثابتة

تم الحصول على غشاء هلامي بواسطة الطريقة الموصوفة في (٣) وفقا للمثال ١ وتم القطع إلى حجم حوالي ١ سم × ١ سم. بشكل لاحق، محلول مائي من ١% (وزن/حجم) من هيدروكسيد

الصوديوم Sodium hydroxide (NaOH)، والتي تم رجها عند ٦٠ درجة مئوية و٨٠ شوط/دقيقة لمدة ٤ إلى ٥ ساعات وبعد ذلك يتم الرج طوال الليل عند ٢٠ درجة مئوية. تمت إزالة السائل بواسطة الترشيح باستخدام شبكة معدنية لاستخلاص غشاء هلامي. تم تكرار عملية إضافة الماء فائق النقاء إليه ورج الناتج طوال الليل عند ٢٠ درجة مئوية لحين وصول الرقم الهيدروجيني إلى ٧ أو أقل للتنقية المتبوعة بالمعالجة بالتعليق باستخدام خلاط لعدة دقائق، وتمت تسمية الناتج محلول BC لمزرعة ثابتة معالجة بالخلاط.

(٣) التحليل

تمت إضافة كل من محلول BC لمزرعة مقلبة من (١) لهذا المثال ٢ والمحلول BC لمزرعة ثابتة معالجة بالخلاط من (٢) لهذا المثال ٢ قطرة قطرة على لوح سيليكون silicon plate ، وتم التجفيف، وبعد ذلك تم تقديمها إلى مقياس الطيف الضوئي بالآشعة تحت الحمراء (FT/IR-4200; JASCO Corporation)، وتم القياس عند رقم تراكمي بمقدار ٣٢ ومحلول ٢ سم-١ أو ٤ سم-١ لتوفير طيف IR. تم توضيح النتائج في الشكل ٤. على النحو المبين في الشكل ٤، كان طيف IR لمحلول BC لمزارع مقلبة تم الحصول عليها باستخدام وسط المزرعة الأساسي مع BDF-B ووسط المزرعة الأساسي مع جليسيرول ذو أشكال مشابهة لطيف IR لمحلول BC لمزرعة ثابتة معالجة بالخلاط. من هذه النتائج، تم تحديد أن المنتج الذي تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) إلى مزرعة مقلبة باستخدام BDF-B أو جليسيرول كاشف كمصدر كربون عبارة عن سيليلوز.

المثال ٣: قابلية التشتيت للسيليلوز البكتيري في الماء

(١) مظهر الماء الذي يحتوي على سيليلوز بكتيري

تم توفير المحلول BC لمزرعة مقلبة باستخدام محلول المزرعة الأساسية مع BDF-B لـ (١) وفقا للمثال ٢ ومحلول BC لمزرعة ثابتة معالجة بالخلاط لـ (٢) وفقا للمثال ٢.

تمت إضافة الألياف النانومترية لسيليلوز مشتق من الألباب إلى الماء للتشتيت، وتمت تسمية الناتج محلول CNF مشتق من لُبّ. تم السماح لمحلول BC لمزرعة مقلبة، محلول BC لمزرعة ثابتة

معالجة بالخلاط، ومحلول CNF مشتق من لُبّ بالبقاء هادئا لمدة يوم، متبوعا بملاحظة مظهرها. تم توضيح النتائج في الشكل ٤.

على النحو المبين في الشكل ٤، تمت ملاحظة ترسيب السيليلوز في محلول CNF المشتق من لُبّ. تمت ملاحظة سيليلوز بكتيري هائل في محلول BC لمزرعة ثابتة معالجة بالخلاط، يبين أن حالة التشتيت للسيليلوز البكتيري كانت غير متجانسة.

على العكس، في محلول BC لمزرعة مقلبة، لم تتم ملاحظة وجود ترسيب أو سيليلوز بكتيري هائل وتمت ملاحظة أن السيليلوز البكتيري في حالة تشتيت بانتظام. أظهرت هذه النتائج أن السيليلوز البكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) إلى مزرعة مقلبة لها قابلية تشتيت عالية وتم تشتيتها بانتظام في سائل، مثل الماء، مقارنة بالسيليلوز البكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع the ألياف نانومترية لسيليلوز مشتق من ألباب أو السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) إلى مزرعة ثابتة.

(٢) نفاذية ضوء للماء الذي يحتوي على سيليلوز بكتيري

[٢-١] المقارنة بين سيليلوز بكتيري تم الحصول عليه بواسطة مزرعة ثابتة ومشتق من لُبّ سيليلوز

في الطريقة المبينة في (١) وفقا للمثال ٢، تمت تنفيذ دورات مزرعة في ظل ظروف ١٥٠ دورة في الدقيقة ودرجة حرارة تتراوح من ٣٠ درجة مئوية لمدة ٣ أيام باستخدام دورق بحاجز بدلا من المخمر كمزرعة أساسية لتحضير محلول BC لمزارع مقلبة، والتي تمت تسميتها العينة A (تم الحصول عليه باستخدام وسط المزرعة الأساسي مع جليسيرول) والعينة ب (تم الحصول عليه باستخدام وسط المزرعة الأساسي مع BDF-B).

المحلول BC لمزرعة مقلبة تم الحصول عليه باستخدام وسط المزرعة الأساسي مع BDF-B لـ (١) وفقا للمثال ٢ تمت تسمينها العينة ج، ومحلول BC لمزرعة مقلبة تم الحصول عليها باستخدام وسط المزرعة الأساسي مع جليسيرول تمت تسميتها العينة د.

تم توفير محلول BC لمزرعة ثابتة معالجة بالخلاط لـ (٢) وفقا للمثال ٢ والمحلول CNF المشتق من لُبّ (١) وفقا للمثال ٣.

تم تعديل هذه المحاليل إلى تركيز سيليلوز نهائي لـ ٠,١ ± ٠,٠٠٦% (وزن/وزن) وتمت إضافة ١ ملي لتر لكل منها إلى الخلايا وتم إخضاعها لمقياس الطيف الضوئي (U-2001 double-beam spectrophotometer; Hitachi, Ltd.) لقياس نفاذية الضوء عند طول موجي يبلغ ٥٠٠ نانومتر. تم استخدام كفيت من البولي إيثيلين يستخدم لمرة واحدة (شبه ميكرو، لها طول مسار ضوئي قدره ١٠ مل متر وعرض مسار ضوئي قدره ٤ مم) تم استخدام ككل خلية، وتم استخدام الماء فائق النقاء كمرجع. تم توضيح النتائج في الجدول ١.

[الجدول ١]

	طريقة الاستنبات	مصدر الكربون	التركيز النهائي للسيليلوز (%(وزن/وزن))	النفاذية (%)
العينة أ	مزرعة مقلَّبة (دورق احتجاز)	كاشف جليسرول	٠,١٠٥٠٥	٧٤,٧٥
العينة ب	مزرعة مقلَّبة (دورق احتجاز)	EBDF-B	٠,١٠٣٠٩	٧٠,٥٣
العينة ج	مزرعة مقلَّبة (وسيلة تحريض)	BDF—B	٠,٠٩٥٧٠	٦٣,٨٢
العينة د	مزرعة مقلَّبة (وسيلة تحريض)	كاشف جليسرول	٠,١٠٣٧٥	٤٩,٦٨

خلاَّط- مزرعة معالجة على نحو ثابت- محلول BC	مزرعة ثابتة	جلوكوز	٠,٠٩٩٦٤	١٩,١٩
محلول CNF مشتق من اللُبّ			٠,١٠٥١٤	١٢,٧٢

على النحو المبين في الجدول ١، نفاذية العينات أ، ب، ج و د بلغت ٧٤,٧٥%، ٧٠,٥٣%، ٦٣,٨٢%، و٤٩,٦٦%، على التوالي، عالية بوضوح مقارنة بـ ١٩,١٩% لمحلول BC لمزرعة ثابتة معالجة بالخلاط و١٢,٧٢% لمحلول CNF المشتق من لُبّ، وبقوة في النطاق الذي يتراوح من ٤٠% إلى ٨٠% (كلاهما متضمن).

[٢-٢] المقارنة بين وجود وغياب CMC في وسط المزرعة

في الطريقة الموصوفة في (١) وفقا للمثال ٢، تم استخدام كل من وسط المزرعة HS الذي يحتوي على ٢% (وزن/حجم) CMC ووسط المزرعة HS الذي لا يحتوي على CMC لتقديم محاليل BC لمزرعة مقلبة. مع ذلك، تم استخدام دبس السكر بدلا من الجلوكوز كمصدر كربون.

عندما تم استخدام دبس السكر كمصدر كربون، تم تحديد عدد الأيام في المزرعة الأساسية لتصل إلى ٣ أيام بدلا من ٤ أيام حيث اختفى مصدر الكربون في وسط المزرعة بشكل ظاهري في اليوم الثالث من المزرعة الأساسية.

بشكل لاحق، تم قياس نفاذية الضوء للصور المائية التي تحتوي على السيليلوز البكتيري بواسطة الطريقة الموصوفة في (٢) [٢-١] وفقا للمثال ٣. تم توضيح النتائج في الجدول التالي ٢.

[الجدول ٢]

CMC في وسط مزرعة	طريقة الاستنبات	مصدر الكربون	النفاذية (%)
موجود	مزرعة مقلَّبة	دبس السكر	٥٧
غير موجودة	مزرعة مقلَّبة	دبس السكر	١٨

على النحو المبين في الجدول ٢، النفاذية عندما تم استخدام وسط المزرعة HS الذي يحتوي على CMC بلغت ٥٧%، حيث النفاذية عندما تم استخدام وسط المزرعة HS الذي لا يحتوي على CMC بلغت ١٨%. النتائج المذكورة أعلاه وفقا لـ (٢) [٢-١] و[٢-٢] لهذا المثال ٣ أظهرت أن الماء الذي يحتوي على السيليلوز البكتيري تم الحصول عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) لمزرعة مقلبة في وسط المزرعة الذي يحتوي على CMC بتركيز نهائي يبلغ ٠,١ ± ٠,٠٠٦% (وزن/وزن) كان يتمتع بنفاذية ضوء عند طول موجي يبلغ ٥٠٠ نانومتر بنسبة ٤٠% إلى ٨٠% (كلاهما متضمن). بعبارة أخرى، تم توضيح المزرعة المقلبة للسلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) في وسط المزرعة الذي يحتوي على CMC لتقديم سيليلوز بكتيري له قابلية تشتيت عالية بوضوح في سائل وقابل للتشتت في السائل بانتظام.

المثال ٤: المقارنة في نفاذية ومعدل إنتاج سيليلوز بكتيري بين مصادر الكربون المختلفة

تم الحصول على كل من محاليل BC لمزرعة مقلبة بواسطة الطريقة الموصوفة في (١) وفقا للمثال ٢. مع ذلك، تم استخدام دبس السكر وجليسيرول كاشف كمصادر كربون بدلا من الجلوكوز. عندما تم استخدام دبس السكر كمصدر كربون، تم تحديد عدد الأيام في المزرعة الأساسية لتصل إلى ٣ أيام بدلا من ٤ أيام. بشكل لاحق، تم قياس نفاذية الضوء لكل ماء يحتوي على سيليلوز بكتيري بواسطة الطريقة الموصوفة في (٢) [٢-١] وفقا للمثال ٣. تم تجفيف المحلول BC لمزرعة مقلبة لقياس الوزن الجاف المطلق للسيليلوز البكتيري، وتم حساب تركيز السيليلوز البكتيري لكل ١ لتر من وسط المزرعة بناء على نتائج القياس وتحديده باعتباره كمية السيليلوز البكتيري المنتج (كمية BC المنتج؛ جرام/لتر). تم حساب قيمة تم تقديمها بواسطة تقسيم

كمية BC المنتج بواسطة عدد الأيام في المزرعة الأساسية، وتم تحديد القيمة باعتبارها معدل إنتاج السيليلوز البكتيري (معدل إنتاج BC؛ جرام/لتر/يوم). تم توضيح النتائج في الجدول التالي الخاصة بشكل ٥.

مصدر كربون	النفاذية (%)	عدد الايام في المزرعة الاساسية	كمية BC المنتجة	معدل انتاج BC (جم /ل/ يوم)
دبس السكر	٥٧	٣	٤,٤٥	١,٤٨
جليسرول كاشف	٥٧	٤	٣,٨٠	٠,٩٥

على النحو المبين في الجدول والرسم البياني للعمود الأيسر وفقا للشكل ٦، النفاذية عندما تم استخدام دبس السكر كمصدر كربون بلغت ٥٧% وكانت هي نفسها (٥٧%) كما هو الحال عندما تم استخدام جليسيرول كاشف كمصدر كربون. أظهرت هذه النتائج أن مزرعة السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) باستخدام دبس السكر كمصدر كربون قدمت سيليلوز بكتيري له نفاذية ضوء عالية عند طول موجي يبلغ ٥٠٠ نانومتر من الماء الذي يحتوي على السيليلوز البكتيري بتركيز نهائي يبلغ ٠,١ ± ٠,٠٠٦% (وزن/وزن) وكانت هي نفسها كما هو الحال عندما تم استخدام جليسيرول كاشف كمصدر كربون. بعبارة أخرى، تم إظهار مزرعة السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) باستخدام دبس السكر كمصدر كربون لتقديم سيليلوز بكتيري له قابلية تشتيت عالية وبانتظام قابل للتشتت في سائل.

على النحو المبين في الجدول ورسم بياني للعمود الأيمن وفقا للشكل ٥، معدل إنتاج BC عندما تم استخدام دبس السكر كمصدر كربون بلغ ١,٤٨ جرام/لتر/يوم وبلغ حوالي ١,٥ ضعف أعلى منه (٠,٩٥ جرام/لتر/يوم) عندما تم استخدام جليسيرول كاشف كمصدر كربون. أظهرت هذه النتائج أن مزرعة السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) باستخدام دبس السكر كمصدر كربون قدمت سيليلوز بكتيري له قابلية تشتيت عالية بكميات عالية في فترة زمنية قصيرة.

المثال ٥: المقارنة في النفاذية ومعدل إنتاج سيليلوز بكتيري بين البكتيريا المختلفة

تم الحصول على محلول BC لمزرعة مقلبة بواسطة الطريقة الموصوفة في (١) وفقا للمثال ٢. مع ذلك، تم استخدام دبس السكر كمصدر كربون بدلا من الجلوكوز. السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) و Gluconacetobacter hansenii من السلالة ATCC23769، Gluconacetobacter xylinus من السلالة ATCC53582، Gluconacetobacter xylinus من السلالة ATCC700178 (BPR2001)، Gluconacetobacter xylinus من السلالة JCM10150، Gluconacetobacter intermedius من السلالة DSM11804، و Gluconacetobacter xylinus من السلالة KCCM40274 على النحو المعروف بكتيريا منتجة لسيليلوز بكتيري تم استخدامها كبكتيريا، على التوالي. عندما تم استخدام السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587)، تم تحديد عدد الأيام في المزرعة الأساسية لتصل إلى ٣ أيام بدلا من ٤ أيام حيث اختفى مصدر الكربون في وسط المزرعة بشكل ظاهري في اليوم الثالث من المزرعة الأساسية. من الناحية الأخرى، عندما تم استخدام السلالة DSM11804، تم تحديد عدد الأيام في المزرعة الأساسية لتصل إلى ٥ أيام بدلا من ٤ أيام حيث كان الانخفاض في مصدر الكربون في وسط المزرعة صغير من حيث المقدار حتى في اليوم الرابع من المزرعة الأساسية. بشكل لاحق، تم قياس نفاذية الضوء لكل ماء يحتوي على سيليلوز بكتيري بواسطة الطريقة الموصوفة في (٢) [٢-١] وفقا للمثال ٣. تم حساب كمية BC الناتجة (جرام/لتر) ومعدل إنتاج BC (جرام/لتر/يوم) بواسطة الطريقة الموصوفة في المثال ٤، وتم تحديد كمية النفاذية ومعدل إنتاج BC في الرسومات البيانية للعمود. تم توضيح النتائج في الجدول التالي الخاصة بشكل ٦ :

البكتيريا	النفاذية (%)	عند الأيام في المزرعة الاساسية	كمية إنتاج BC (جم/ل)	معدل إنتاج BC (جم/ل/يوم)
سلالة NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius)	٥٧	٣	٤,٤٥	١,٤٨
	٢٠	٤	٤,١٩	١,٠٥
سلالة ATCC53582 من G. xylinus	٣٣	٤	٤,١٢	١,٠٣
سلالة ATCC700178 من G. xylinus	٢٩	٤	٤,٤٤	١,١١
سلالة JCM10150 من G. xylinus	٢٧	٤	٤,٣٩	١,١٠
سلالة DSM11804 من G. intermedius	٩	٥	٢,٠٨	٠,٤٢
سلالة KCCM40274 من G. xylinus	١٣	٤	١,٧٢	٠,٤٣

على النحو المبين في الجدول اعلاه والرسم البياني للعمود الأيسر وفقا للشكل ٧، النفاذية عندما تم استخدام السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) بلغت ٥٧%، حيث النفاذية عندما G. hansenii من سلالة ATCC23769، G. xylinus من سلالة ATCC53582، G. xylinus من سلالة ATCC700178 (BPR2001)، G. xylinus من سلالة JCM10150، G. intermedius من سلالة DSM11804، و G. xylinus من سلالة KCCM40274 التي تم استخدامها بلغت ٢٠%، ٣٣%، ٢٩%، ٢٧%، ٩%، و١٣%، على التوالي. أظهرت هذه النتائج أن نفاذية الضوء عند طول موجي يبلغ ٥٠٠ نانومتر للماء الذي يحتوي على السيليلوز البكتيري تم الحصول عليه بواسطة زراعة السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) بتركيز نهائي يبلغ ٠,١ ± ٠,٠٠٦% (وزن/وزن) كانت عالية بوضوح (٣٥% أو أكثر) مقارنة بنفاذية ضوء الماء الذي يحتوي على السيليلوز البكتيري الذي تم الحصول عليه بواسطة زراعة كل السلالات بخلاف NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587). بعبارة أخرى، تم إظهار مزرعة السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) على أنها قادرة على تقديم سيليلوز بكتيري له قابلية

تشتيت عالية وبانتظام قابل للتشتت في سائل. على النحو المبين في الجدول اعلاه ورسم بياني للعمود الأيمن وفقا للشكل ٥، معدل إنتاج BC عندما تم استخدام السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) بلغ ١,٤٨ جرام/لتر/يوم، حيث معدل إنتاج BC عندما G. hansenii من سلالة ATCC23769، G. xylinus من سلالة ATCC53582، G. xylinus من سلالة ATCC700178 (BPR2001)، G. xylinus من سلالة JCM10150، G. intermedius من سلالة DSM11804، و G. xylinus من سلالة KCCM40274 التي تم استخدامها بلغ ١,٠٥ جرام/لتر/يوم، ١,٠٣ جرام/لتر/يوم، ١,١١ جرام/لتر/يوم، ١,١٠ جرام/لتر/يوم، ٠,٤٢ جرام/لتر/يوم، و ٠,٤٣ جرام/لتر/يوم، على التوالي. بعبارة أخرى، معدل إنتاج BC عندما تم استخدام السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) كان عاليا بوضوح مقارنة بمعدل إنتاج BC عندما تم استخدام سلالات بخلاف NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587). أظهرت هذه النتائج أن مزرعة السلالة NEDO-01 (G. intermedius من السلالة SIID9587) يجب أن تقدم سيليلوز بكتيري له قابلية تشتيت عالية بكميات عالية في فترة زمنية قصيرة.

المثال ٦: وزن جزيئي للسيليلوز البكتيري : تم تقديم العينات A، B، C، و D ومحلول CNF المشتق من اللُبّ (٢) المثال ٣ كعينات. تم تجفيف هذه العينات بالتجميد، إضافتها إلى إلى ما يتراوح من ٥٧ إلى ٥٩% محلول مائي من هيدروكسيد تترا بيوتيل فُسْفُونْيُوم tetrabutylphosphonium hydroxide ، وتمت إذابتها بالبقاء عند ٣٥ درجة مئوية، متبوعًا بإضافة الماء إلى هيدروكسيد تترا بيوتيل فُسْفُونْيُوم بتركيز يتراوح من ٤٠ إلى ٤٢% (وزن/وزن) وعينة بتركيز ٠,٢% (وزن/وزن).

لاحقًا، تم إجراء طرد مركزي لترسيب الشوائب من أجل استخلاص المادة الطافية. تم تعريض المادة الطافية لكروماتوجراف انفاذ الجل في ظل الظروف التالية لقياس مقدار احتجاز القمة العليا من مُخَطَّط الكروماتوغراف. تم قياس المادة الطافية ٣ مرات في ظل الظروف نفسها. تم توضيح النتائج في الجدول ٣، وانتقائها عشوائيًا من مُخَطَّط الكروماتوغراف المبيَّن في الشكل ٧.

ظروف كروماتوجراف انفاذ الجل : الأداة؛ كروماتوجراف سائل عالي الأداء (Shimadzu Corporation)

عمود؛ عمود ٦,٠ مم في قطر داخلي و١٥ سم في الطول، معبأ بميث أكريلات بوليمر له حجم جسيم يبلغ ٩ ميكرو متر (Corporation Tosoh ؛AWM-H super TSKgel)

عمود واقي؛ ٤,٦ مم في قطر داخلي و٣,٥ سم في الطول (super guardcolum TSK AW-H؛ Corporation Tosoh)

درجة حرارة العمود؛٣٥ درجة مئوية ، معدل تدفق تيار التغذية؛ ٠,٠٧ ملي لتر/دقيقة

حجم حقن العينة؛ ١٠ ميكرو لتر ، ناتج التصفية؛ من ٤٠ إلى ٤٢% (وزن/وزن) محلول مائي من هيدروكسيد تترا بيوتيل فُسْفُونْيُوم ، تركيز نهائي من سيليلوز بكتيري في ناتج التصفية؛٠,٢% (وزن/وزن) ، عينة المقارنة؛ بولولان له وزن جزيئي يبلغ ٨٥,٣ × ٤١٠ (Shodex standard P-82)

[الجدول ٣]

	الاحتجاز الوقت/الدقيقة	حجم المحتجز/مل	المتوسط/ مل	الانحراف المعياري/ مل
العينة A(الأولى)	٤٠,٤	٢,٨٢٨	٢,٧٩	٠,٠٥
العينة A (الثانية)	٣٩,١	٢,٧٣٧		
العينة A(الثالثة)	٤٠	٢,٨		
العينة B(الأولى)	٣٩,٨	٢,٧٨٦	٢,٨١	٠,٠٣
العينة B(الثانية)	٣٩,٩	٢,٧٩٣		
العينة B الثالثة	٤٠,٧	٢,٨٤٩		
العينة C(الأولى)	٤٠,١	٢,٨٠٧	٢,٨٢	٠,٠٢

العينة C(الثانية)	٤٠,٥	٢,٨٣٥		
العينة C(الثالثة)	٤٠,١	٢,٨٠٧		
العينة D(الأولى)	٣٩,٢	٢,٧٤٤	٢,٧٦	٠,٠٢
العينة D(الثانية)	٣٩,٤	٢,٧٥٨		
العينة D(الثالثة)	٣٩,٨	٢,٧٨٦		
محلول CNF مشتق من اللُبّ (الأول)	٤٢,٩	٣,٠٠٣	٣,٠٤	٠,٠٤
محلول CNF مشتق من اللُبّ (الثاني)	٤٣,٤	٣,٠٣٨		
محلول CNF مشتق من اللُبّ (الثالث)	٤٣,٩	٣,٠٧٣		
بولان (الأول)	٤٥,٧	٣,١٩٩	٣,٢٤	٠,٠٤
بولان (الثاني)	٤٦,٨	٣,٢٧٦		
بولان (الثالث)	٤٦,٤	٣,٢٤٨		

على النحو المبين في الجدول ٣ والشكل ٧، بلغ مقدار احتجاز القمة العليا لكلٍ من العينات A، B، C، وD في المتوسط ٢,٧٩ ملي لتر، ٢,٨١ ملي لتر، ٢,٨٢ ملي لتر، و٢,٧٦ ملي لتر، على التوالي وتم إجراء مقارنة صغيرة بـ ٣,٠٤ ملي لتر لمحلول CNF مشتق من لُبّ و٣,٢٤ ملي لتر للبولولان. أظهرت هذه النتائج أن متوسط الوزن الجزيئي للسيليلوز البكتيري المتحصل عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius) إلى مزرعة

مقلَّبة كان أكبر من المشتق من اللُبّ السيليلوز وأكثر من ٨٥,٣ × ٤١٠ من حيث بولولان. أظهر أيضًا الجدول ٣ أن السيليلوز البكتيري المتحصل عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius) إلى مزرعة مقلَّبة تم تعريضه لكروماتوجراف انفاذ الجل في ظل الظروف المذكورة أعلاه، بلغ مقدار احتجاز القمة العليا من مُخَطَّط الكروماتوغراف ٢,٥ ملي لتر (الشامل) إلى ٣,٠ ملي لتر (الخاص) حيث تراوح مقدار احتجاز القمة العليا لكلٍ من العينات A، B، C، وD في نطاق من ٢,٧٣٧ إلى ٢,٨٤٩ ملي لتر.

المثال ٧: شكل السيليلوز البكتيري

(١) قياس عرض ألياف

تم توفير محلول BC لمزرعة مقلَّبة باستخدام وسط المزرعة الأساسي باستخدام جليسيرول (١) للمثال ٢ ومحلول BC لمزرعة ثابتة معالجة بالخلاط (٢) للمثال ٢. تم تعديل كل من محاليل السيليلوز المذكورة إلى تركيز يبلغ حوالي ٠,٠٠١% (وزن/وزن)، وبعد ذلك، تمت إضافة ١٠ ميكرولتر من كل محلول قطرة قطرة على شبكة نحاس مغطاة بفورمار وتم تجفيفها بالهواء. لاحقًا، تمت إضافة ٥ ميكرولتر ٥% (وزن/حجم) من محلول جادولينيوم أسيتات gadolinium acetate مائي قطرة قطرة إليه، وتمت إزالة المحلول الزائد باستخدام ورقة ترشيح بعد ١٠ ثواني للتبقيع السلبي. تمت ملاحظة المادة الناتجة في ظل التصوير المجهري لإنتقال الإليكترون عند تسارع جهد يبلغ ٨٠ كيلو فولط وتم تكبير ما تمت ملاحظته إلى ٣٠٠٠٠ مرة لقياس عرض ألياف السيليلوز cellulose fibersبناءًا على الصورة التي تمت ملاحظتها. تم عرض النتائج في الشكل ٨.

على النحو المبين في الشكل ٨، بلغ عرض ألياف السيليلوز ١٧ ± ٨ نانو متر لمحلول BC للمزرعة المقلَّبة، والذي كان صغيرًا بدرجة ملحوظة مقارنة بـ ٥٥ ± ٢٢ نانو متر لمحلول BC للمزرعة الثابتة المعالجة بالخلاط، وله انحراف عياري صغير. أظهرت هذه النتائج أن السيليلوز البكتيري المتحصل عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius) إلى مزرعة مقلَّبة كوَّن ألياف دقيقة ومنتظمة مع تنوع بسيط في العرض بين الألياف.

(٢) تحديد انتظام عرض الألياف وحالة التجمُّع

تم توفير محلول BC لمزرعة مقلَّبة باستخدام وسط المزرعة الأساسي باستخدام BDF-B من (١) للمثال ٢ ومحلول CNF المشتق من اللُبّ من (١) للمثال ٣. تم تعديل كل من محاليل السيليلوز المذكورة إلى تركيز يبلغ حوالي ٠,٠١% (وزن/وزن)، وبعد ذلك، تم تكرار تشغيل رش المحلول على شبكة نحاس مغطاة بفورمار وتجفيفها باستخدام وسيلة تجفيف ١٠ مرات. لاحقًا، تمت إضافة ٥ ميكرولتر ٥% (وزن/حجم) من محلول جادولينيوم أسيتات مائي قطرة قطرة إليه، وتمت إزالة المحلول الزائد باستخدام ورقة ترشيح. بالإضافة إلى ذلك، تم تكرار خطوات إضافة ٥ ميكرولتر قطرة قطرة من الماء عالي النقاء وبعد ذلك إزالة المحلول الزائد باستخدام ورقة ترشيح مرتين، متبوعًا بالتبقيع السلبي بواسطة التجفيف بالهواء. تمت ملاحظة المادة الناتجة في ظل التصوير المجهري لانتقال الإليكترون عند تسارع جهد يبلغ ٨٠ كيلو فولط وتكبير ما تمت مراقبته لـ ١٠٠٠٠ مرات. تم عرض النتائج في الشكل ٩. تم أيضًا ملاحظتها باستخدام موشورات نيكول متقاطعة باستخدام التصوير المجهري المستقطب. تم عرض النتائج في الشكل ١٠.

على النحو المبين في الشكل ٩، تمت ملاحظة عدة ألياف سيليلوز لها قياسات عرض قابلة للمقارنة بمقياس النانو في محلول BC لمزرعة مقلَّبة، في حين تمت ملاحظة قياسات عرض مختلفة لألياف السيليلوز، تضم قياسات عرض تبلغ حوالي ٥٠٠ نانو متر أو أكثر، في محلول CNF المشتق من اللُبّ. من هذه النتائج، تم تحديد مرة أخرى أن السيليلوز البكتيري المتحصل عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius) إلى مزرعة مقلَّبة كوَّن ألياف لها عرض موَّحد بمقياس النانو.

على النحو المبين في الشكل ١٠، تم على نحو مؤكد ملاحظة ألياف سميكة نسبيًا بحسب ما هو مبيَّن بالأسهم في محلول CNF المشتق من اللُبّ، حيث تمت ملاحظة صور خافتة في القسم المحتجز بالخط المنقَّط في محلول BC لمزرعة مقلَّبة. أظهرت هذه النتائج وجود الألياف السميكة نسبيًا، مثل الألياف المجهرية الفرعية والألياف المجهرية، بالنسبة للمشتق من لُبّ السيليلوز، حيث كانت الألياف الرفيعة بمقياس النانو موزَّعة بانتظام للسيليلوز البكتيري المتحصل عليه بواسطة إخضاع السلالة NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius) إلى مزرعة مقلَّبة.

المثال ٨: تقييم القدرة على إنتاج السيليلوز البكتيري

(١) قدرة الإنتاج في مزرعة ثابتة

تم تحضير أوساط مزرعة يتم فيها إضافة BDF-B معالج مسبقًا وجليسيرول كاشف، على التوالي، بدلاً من الجلوكوز كمصدر كربون في LB وسط المزرعة، وتتم تسميتها وسط مزرعة BDF-/LB B ووسط مزرعة LB/جليسيرول، على التوالي. تم تلقيح كلاً من السلالة NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius)، Gluconacetobacter xylinus من السلالة ATCC53582، Gluconacetobacter hansenii من السلالة ATCC23769، و Gluconacetobacter xylinus من السلالة ATCC70017٨ (BPR2001) على كلٍ من وسط مزرعة LB/جليسيرول ووسط مزرعة BDF-B/LB وتعريضها لمزرعة ثابتة عند ٣٠ درجة مئوية لمدة ٧ أيام لتكوين غشاء هلامي. تم تكرار عملية إضافة ١% (وزن/حجم) محلول مائي NaOH إليه وإجراء معالجة موصدة إلى أن يصبح الغشاء الهلامي أبيض اللون. بعد ذلك، تم تكرار عملية إضافة الماء وإجراء معالجة موصدة إلى أن يبلغ الرقم الهيدروجيني pH ٧ أو أقل بالنسبة من التنقية. تم قياس السيليلوز البكتيري المتحصل عليه بالتجفيف بعد التنقية للحصول على الوزن الجاف المطلق. تم عرض النتائج في الشكل ١١.

على النحو المبين في الشكل ١١، أنتجت سلالة ATCC23769 من G. hansenii أوزان صغيرة من أنواع السيليلوز البكتيري في كلٍ من وسط مزرعة LB/جليسيرول ووسط مزرعة BDF-B/LB. أنتجت سلالة ATCC53582 من G. xylinus وسلالة ATCC700178 من G. xylinus (BPR2001) أوزان كبيرة نسبيًا من أنواع السيليلوز البكتيري في وسط مزرعة LB/جليسيرول، حيث لم يتم ملاحظة إنتاج سيليلوز بكتيري في وسط مزرعة BDF-B/LB. على العكس، أنتجت السلالة NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius) أوزان كبيرة نسبيًا من أنواع السيليلوز البكتيري في كلٍ من وسط مزرعة LB/جليسيرول ووسط مزرعة BDF-B/LB. أظهرت هذه النتائج أن السلالة NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius) يمكنها بشكل فعَّال إنتاج سيليلوز بكتيري عن طريق تعريضها لمزرعة ثابتة باستخدام أيًا من الجليسيرول الكاشف أو BDF-B كمصدر كربون. تعد قدرتها على إنتاج السيليلوز البكتيري باستخدام BDF-B كمصدر كربون تعد ميزة لا تمتلكها السلالات الأخرى التي

تتم مقارنتها بها، إلى جانب كونها مفيدة على الجانب العملي حيث يمكن استخدام المنتج الثانوي، وتساهم بشكل كبير في تقليل تكاليف الإنتاج.

(٢) القدرة على الإنتاج في مزرعة مقلَّبة

تم تلقيح كل من السلالات NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius)، السلالة ATCC53582، والسلالة ATCC23769 على ١٠ ملي لتر من وسط مزرعة HS وتعريضها لمزرعة ثابتة عند ٣٠ درجة مئوية لمدة ٣ أيام لمزرعة سابقة. لاحقًا، تم تلقيح محلول المزرعة المتحصل عليه بالمزرعة السابقة على ١٠ ملي لتر لوسط مزرعة HS وتعريضها لمزرعة ثابتة عند ٣٠ درجة مئوية لمدة ٣ أيام لمزرعة سابقة. بعد ذلك، تم وضع ١٠٠ ملي لتر لكلٍ من وسط المزرعة الأساسي باستخدام جليسيرول ووسط المزرعة الأساسي باستخدام BDF-B من (١) للمثال ٢ في دورق Erlenmeyer له نصول، وتم تلقيح محلول المزرعة المسبقة بكمية مناظرة لنفس عد خلايا البكتيريا لكل سلالة بكتيرية منها وتعريضها لرجّ المزرعة لمدة ٣ أيام في ظل ظروف ١٥٠ دورة في الدقيقة و٣٠ درجة مئوية للمزرعة الأساسية. لاحقًا، تمت تنقية السيليلوز البكتيري في محلول المزرعة الأساسية بواسطة الطريقة الموصوفة في (١) للمثال ٢. مع ذلك، تم الرَّج عند ٦٠ درجة مئوية و٨٠ دورة في الدقيقة لمدة تتراوح من ٤ إلى ٥ ساعات، متبوعًا بالرجّ أكثر عند ٢٠ درجة مئوية طوال الليل. تم تجفيف السيليلوز البكتيري المجَّفف وقياسه للحصول على الوزن الجاف المطلق. تم عرض النتائج في الشكل ١٣.

على النحو المبين في الشكل ١٢، لم يلاحظ إنتاج سلالة ATCC53582 من G. xylinus سيليلوز بكتيري في كلٍ من وسط المزرعة الأساسية باستخدام جليسيرول ووسط المزرعة الأساسية باستخدام BDF-B. بالنسبة لسلالة ATCC23769 من G. hansenii، كان الوزن الجاف المطلق للسيليلوز البكتيري أكبر نسبيًا عند استخدام وسط المزرعة الأساسية مع الجليسيرول، ولكن لم تتم ملاحظة إنتاج سيليلوز بكتيري عند استخدام وسط المزرعة الأساسية مع BDF-B. على العكس، بالنسبة لسلالة NEDO-01 (سلالة SIID9587 من G. intermedius)، كان الوزن الجاف المطلق للسيليلوز البكتيري أكبر عن استخدام كلاً من وسط المزرعة الأساسي مع الجليسيرول ووسط المزرعة الأساسي مع BDF-B. أظهرت هذه النتائج أن السلالة NEDO-01

(سلالة SIID9587 من G. intermedius) يمكنها بشكل فعَّال إنتاج السيليلوز البكتيري بواسطة إما مزرعة ثابتة أو مزرعة مقلَّبة باستخدام إما جليسيرول كاشف أو BDF-B كمصدر كربون.

عناصر الحماية

١- سليلوز بكتيري bacterial cellulose منتج بواسطة بكتيريا bacterium ، له خاصية فيزيائية تتمثل في (أ) و (ب) أدناه:

(أ) نفاذية ضوء عند طول موجي يبلغ ٥٠٠ نانومتر من الماء الذي يحتوي على السليلوز البكتيري bacterial cellulose بتركيز نهائي يبلغ ٠,١ ± ٠,٠٠٦ % (وزن/وزن) بنسبة ٣٥% إلى ٩٩%؛ و

(ب) مقدار احتجاز لقمة عليا من مُخَطَّط كروماتوجراف في كروماتوجراف نفاذية الجل المنفذ في ظل الظروف التالية i) إلى vi) من ٢,٥ ملي لتر متضمن إلى ٣,٠ ملي لتر مستثنى:

i) عمود: عمود ٦,٠ مم في قطر داخلي و١٥ سم في الطول، معبأ بميث أكريلات بوليمر methacrylate polymer له حجم جسيم يبلغ ٩ ميكرومتر؛

ii) عمود واقي: ٤,٦ مم في قطر داخلي و١٥ سم في الطول؛

iii) درجة حرارة العمود: ٣٥ درجة مئوية؛

iv) معدل تدفق تيار التغذية: ٠,٠٧ ملي لتر/دقيقة؛

v) ناتج التصفية: من ٤٠ إلى ٤٢% (وزن/وزن) محلول مائي من هيدروكسيد تترا بيوتيل فُسْفُونْيُوم tetrabutylphosphonium hydroxide؛ و

vi) تركيز نهائي من السليلوز البكتيري bacterial cellulose في ناتج التصفية: ٠,٢% (وزن/وزن).

٢- السليلوز البكتيري bacterial cellulose وفقا لعنصر الحماية ١، المنتج بواسطة استيعاب منتج ثانوي يحتوي على جليسيرول glycerol مولد في إنتاج وقود دِيزِل حيوي من الزيت النباتي باستخدام البكتيريا bacterium.

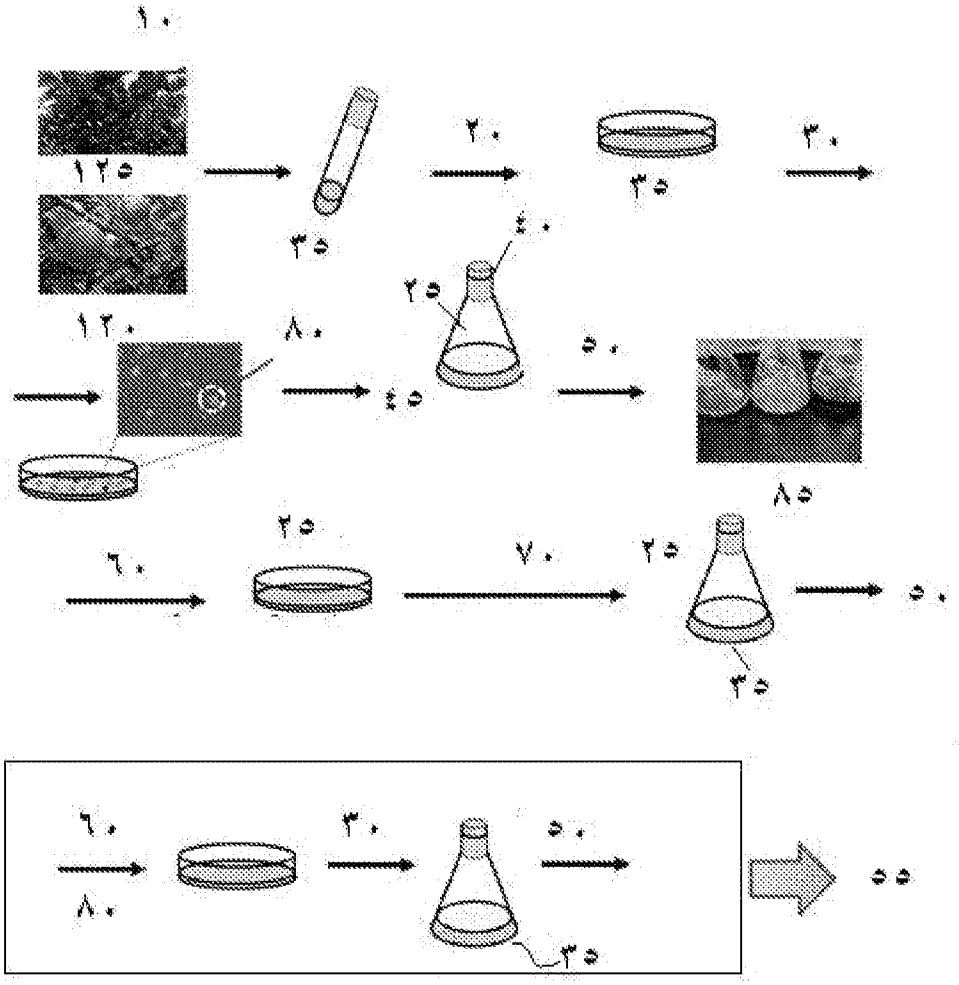
٣- السليلوز البكتيري bacterial cellulose وفقا لعنصر الحماية ١، المنتج بواسطة استيعاب السكر، منتج ثانوي يحتوي على سَكَرُوز sucrose مولد في إنتاج السكر، ونواتج تحلل منها سكر تمت أزمرته isomerized، باستخدام البكتيريا bacterium.

٤- السليلوز البكتيري bacterial cellulose وفقا لعنصر الحماية ٣، حيث يكون المنتج الثانوي عبارة عن دبس السكر.

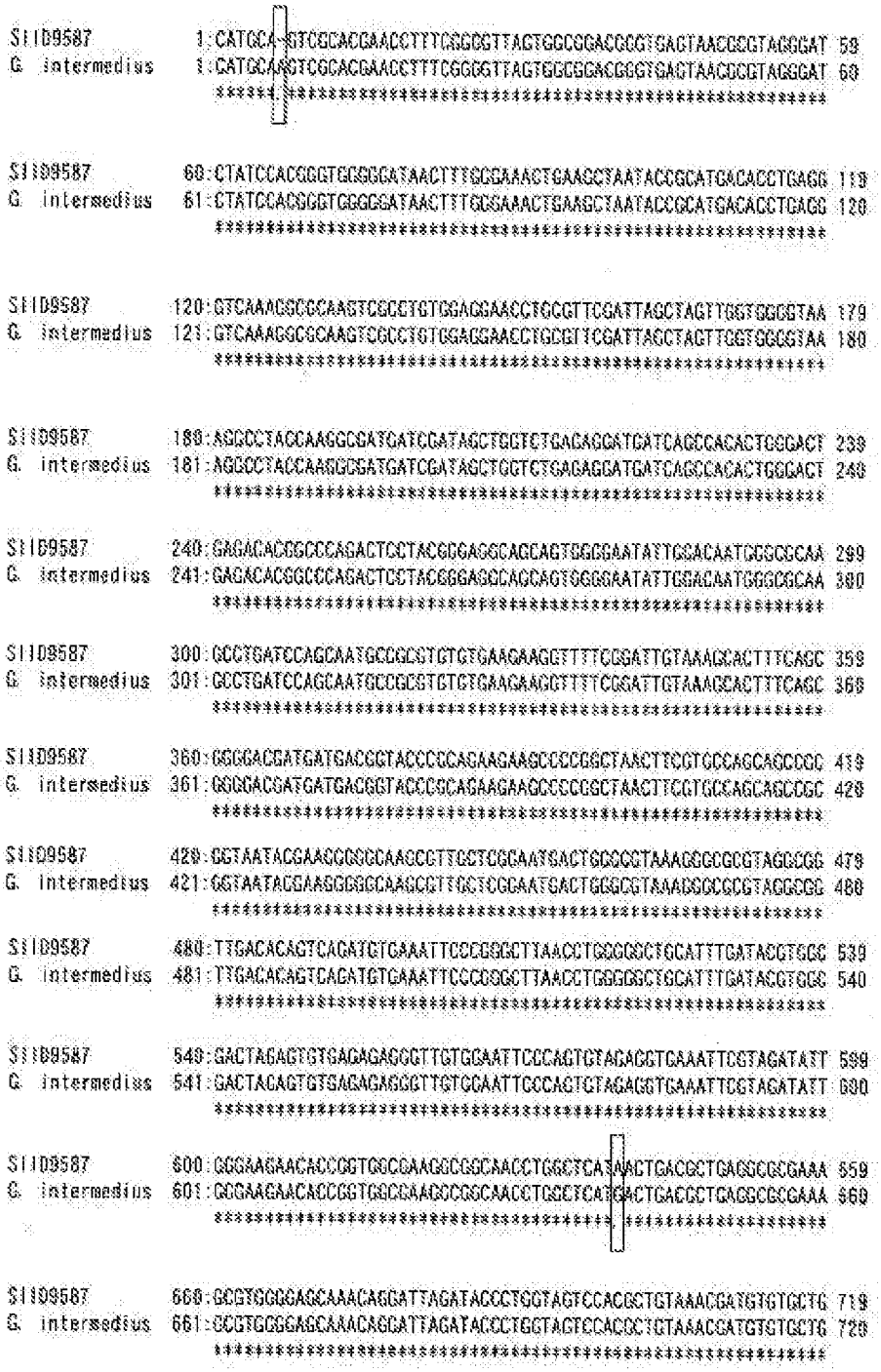
٥- السليلوز البكتيري bacterial cellulose وفقا لعنصر الحماية ١، حيث تكون البكتيريا bacterium عبارة عن سلالة بكتريا حمض الخليك المتوسطة Gluconacetobacter intermedius.

٦- السليلوز البكتيري bacterial cellulose وفقا لعنصر الحماية ١، حيث تكون البكتيريا عبارة عن سلالة بكتريا حمض الخليك المتوسطة Gluconacetobacter intermedius من سلالة SIID9587 (رقم الوصول NITE BP-01495).

٧- بكتريا حمض الخليك المتوسطة Gluconacetobacter intermedius من سلالة SIID9587 (رقم الوصول NITE BP-01495).


١٠
١٢٥
٣٥
٢٠
٣٥
٣٠
١٢٠
٤٠
٢٥
٨٠
٤٥
٥٠
٨٥
٦٠
٢٥
٧٠
٢٥
٥٠
٣٥
٦٠
٨٠
٣٠
٥٠
٣٥
٥٥

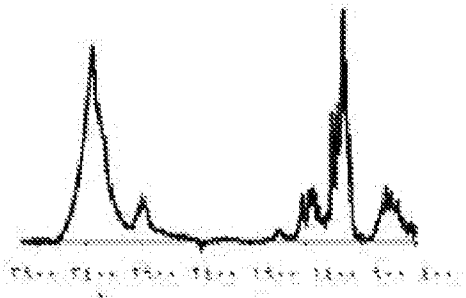
شكل ١


S1109587 1:CATGCA-GTCGCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGAT 59
G. intermedius 1:CATGCAAGTCGCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGAT 60
S1109587 60:CTATCCACGGGTGGGGGATAACTTTGCGAAAGTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGG 119
G. intermedius 61:CTATCCACGGGTGGGGGATAACTTTGCGAAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGG 120
S1109587 120:GTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA 179
G. intermedius 121:GTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA 180
S1109587 180:AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT 239
G. intermedius 181:AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT 240
S1109587 240:GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA 299
G. intermedius 241:GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA 300
S1109587 300:GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGC 359
G. intermedius 301:GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGC 360
S1109587 360:GGGGACGATGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC 419
G. intermedius 361:GGGGACGATGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC 420
S1109587 420:GGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG 479
G. intermedius 421:GGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG 480
S1109587 480:TTGACACAGTCAGATGTGAAATTCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGC 539
G. intermedius 481:TTGACACAGTCAGATGTGAAATTCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGC 540
S1109587 540:GACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGCAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT 599
G. intermedius 541:GACTACAGTGTGAGAGAGGGTTGTGCAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT 600
S1109587 600:GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAA 659
G. intermedius 601:GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAA 660
S1109587 660:GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG 719
G. intermedius 661:GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG 720

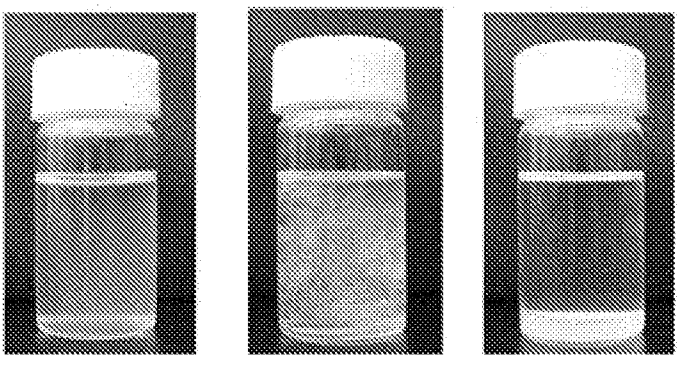
شكل ٢-١


SIID9587 720:GATGTTGCGTGACTTTGTCATTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGC 779
G. intermedius 721:GATGTTGCGTCACTTTGTCATTCAGTGTCGTAGTTAACCCGATAAGCACACCCCCTGGGC 780
SIID9587 780:AGTACGGCCGCAAGCTTGAAACTCAAAGGAATTGACCGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC 839
G. intermedius 781:AGTACGGCCGCAAGCTTGAAACTCAAAGGAATTGACCGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC 840
SIID9587 840:ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCCGACGCTCGT 899
G. intermedius 841:ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCCGACGCCCGT 900
SIID9587 900:GTCCAGAGATGGGCATTTCTCGCAAGACACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC 959
G. intermedius 901:GTCCAGAGATGGGCATTTCTCGCAAGACACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC 960
SIID9587 960:AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTT 1019
G. intermedius 961:AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTT 1020
SIID9587 1020:GCCATCACGTTTGGGTGGGCACTCTAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGG 1079
G. intermedius 1021:GCCATCACGTTTGGGTGGGCACTCTAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGG 1080
SIID9587 1080:GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGG 1139
G. intermedius 1081:GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGG 1140
SIID9587 1140:TGACAGTGGGAAGCCAGGTGGTGACACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGA 1199
G. intermedius 1141:TGACAGTGGGAAGCCAGGTGGTGACACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGA 1200
SIID9587 1200:TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTCGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC 1259
G. intermedius 1201:TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTCGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC 1260
SIID9587 1260:CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTT 1319
G. intermedius 1261:CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGCGAGTTGGTTT 1320
SIID9587 1320:GACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCGCAAGGACGGAGCCGACCACG-TCG 1366
G. intermedius 1321:GACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCGCAAGGACGCAGCCGACCACGGTCG 1368

شكل ٢ -٢


٣٩٠٠ ٣٤٠٠ ٢٩٠٠ ٢٤٠٠ ١٩٠٠ ١٤٠٠ ٩٠٠ ٤٠٠
عدد الموجات (سم$^{-1}$)
٣٩٠٠ ٣٤٠٠ ٢٩٠٠ ٢٤٠٠ ١٩٠٠ ١٤٠٠ ٩٠٠ ٤٠٠
عدد الموجات (سم$^{-1}$)
٣٩٠٠ ٣٤٠٠ ٢٩٠٠ ٢٤٠٠ ١٩٠٠ ١٤٠٠ ٩٠٠ ٤٠٠
عدد الموجات (سم$^{-1}$)

شكل ٣



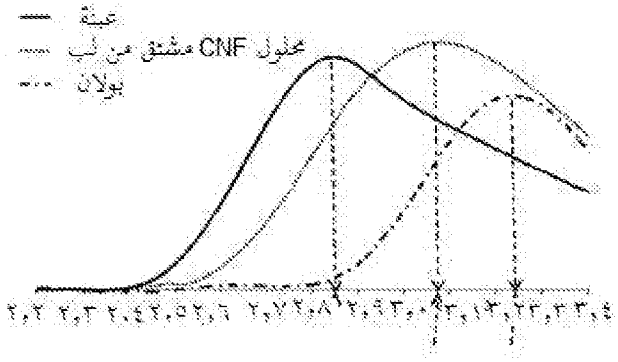
شكل ٤

جليسرول كاشف
دبس السكر
جليسرول كاشف
دبس السكر

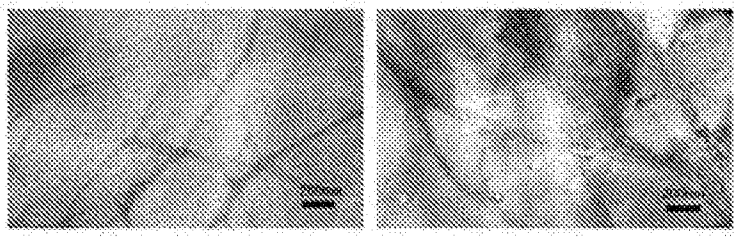
شكل ٥

NEDO-01 سلالة
(G. intermedius من SID9587 سلالة)
G. lansenii من ATCC23769 سلالة
G. xylinus من ATCC53582 سلالة
G. xylinus من ATCC700178 سلالة
G. xylinus من JCM10150 سلالة
G. intermedius من DSM11804 سلالة
G. xylinus من KCCM40274 سلالة
NEDO-01 سلالة
(G. intermedius من SID9587 سلالة)
G. lansenii من ATCC23769 سلالة
G. xylinus من ATCC53582 سلالة
G. xylinus من ATCC700178 سلالة
G. xylinus من JCM10150 سلالة
G. intermedius من DSM11804 سلالة
G. xylinus من KCCM40274 سلالة

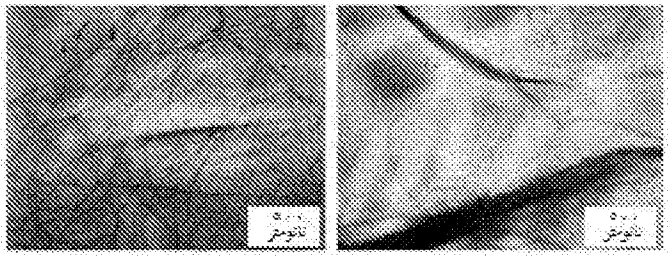
شكل ٦



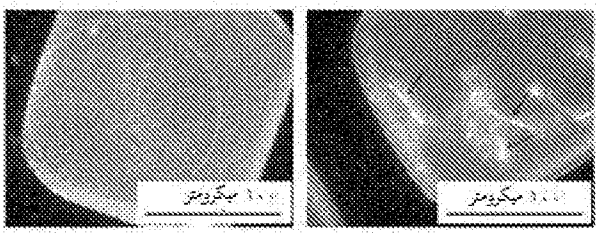
شكل ٧



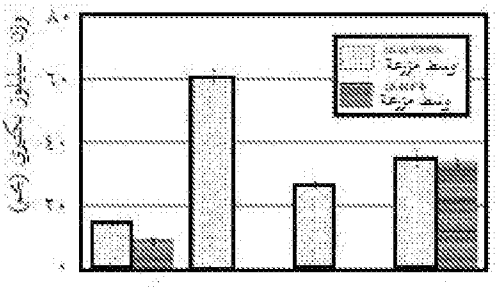
شكل ٨



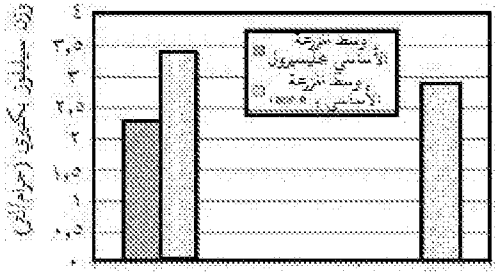
شكل ٩



شكل ١٠



شكل ١١



شكل ١٢

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشرط تسديد المقابل المالي السنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية

صادرة عن
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية ، مكتب البراءات السعودي
ص ب ٦٠٨٦ ، الرياض ١١٤٤٢ ، المملكة العربية السعودية
بريد الكتروني: patents@kacst.edu.sa