



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00861

(22) Data de depozit: 05/12/2019

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CONSTĂNTINESCU- ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

• BALA IOANA, STR.POIANA CU ALUNI,
NR.1, BL.4, SC.4, ET.4, AP.60, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CĂLIN MARIANA,
STR. CETATEA DE BALTĂ NR. 41, BL. 07A,
SC. 2, ET. 6, AP. 91, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
SC.1, ET.4, AP.54, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DIMITRIU LUMINIȚA,
ALEEA BARAJULUI BICAZ, NR.9, BL.M31,
SC.B, ET.2, AP.408, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) METODĂ PENTRU SELECȚIA TULPINILOR
MICROBIENE PRODUCĂTOARE DE STEREOIZOMERI
AI 2,3-BUTANDIOLULUI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de selecție a tulpinilor microbiene producătoare de stereoizomeri ai 2,3-butandiolului, utilizați pentru sinteze de compuși bioactivi. Metoda, conform invenției, constă în etapele de:

(I) selecție a izolatelor microbiene care produc 2,3-butandiol prin cultivare pe mediu lichid care susține producerea de 2,3-butandiol, distribuit câte 250 microl în fiecare godeu dintr-o placă cu 96 godeuri, la

temperatura de 28°C, timp de 24 h, în condiții aerobe, urmată de determinarea calorimetrică a producerii de 2,3-butandiol și

(II) determinarea tipului de stereoizomeri produși prin evidențierea efectelor asupra plantelor de *Arabidopsis thaliana*, cultivate în condiții de stres hidric.

Revendicări: 3



METODĂ PENTRU SELECȚIA TULPINILOR MICROBIENE PRODUCĂTOARE DE STEREOIZOMERI AI 2,3 BUTANDIOLULUI

Prezenta invenție se referă la o metodă pentru selecția tulpinilor microbiene producătoare de stereoizomeri ai 2,3 butandiolului, utilizați pentru sinteze chirale a unor compuși bioactivi cu valoare adăugată mare sau pentru obținerea bioproduselor destinate biostimulării plantelor de cultură.

Sunt cunoscute procedee de selecție a tulpinilor care produc 2,3 butandiol. Cererea de brevet CN 102634563 descrie un procedeu de selecție a tulpinilor producătoare de acetoină – 2,3 butandiol, care implică: incubarea timp de 48 ore a probelor de sol la 80°C, pentru a selecta numai bacteriile sub formă de spori termorezistenți; izolarea de tulpini din probele incubate, prin cultivare pe mediu lichid, diluarea mediului lichid până la singularizarea celulelor bacteriene și inoculare pe mediu agarizat, pentru a obține colonii provenite dintr-o singură celulă; cultivarea izolatelor bacteriene astfel obținute pe mediu lichid și determinarea conținutului de acetoină, precursorul 2,3 butandiolului, prin lichid cromatografie de înaltă presiune. Prin metoda descrisă a fost izolată tulpina *Bacillus amyloliquefaciens* FMME044.

Metoda nu permite identificare tulpinilor producătoare de stereoizomeri ai butandiolului și nu este aplicabilă ca tehnică de înalt randament, pentru testarea concomitentă a mai multor tulpini / izolate microbiene.

2, 3-Butandiol (2, 3-BD) este un important produs chimic cu aplicații extinse în industria chimică (Ji et al. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 351–364), iar precursorul său, acetoina (în care se poate cu ușurință converti, prin dehidrogenare), este unul dintre cei 30 de intermediari chimici - platformă, considerați prioritari de către Departamentul de Energie al Statelor Unite în ceea ce privește dezvoltarea și utilizarea lor (Zhang et al. *Green Chem.* **2015**, *18*, 1560–1570). 2, 3-butandiolul are trei stereoizomeri - (2*S*, 3*S*)-2, 3-butandiol, (2*R*, 3*R*) - 2, 3-Butandiol, și *meso*-2, 3 - butandiol. Acetoina are doi stereoizomeri, respectiv (3*R*) - acetoină și (3*S*) - acetoină (Ge et al. *Green Chem.* **2016**, *18*, 4693–4703). Stereoizomerii (2*S*, 3*S*) de 2, 3-Butandiol și 2*S* de acetoină sunt importanți pentru sinteza unor compuși chirali cu activitate biologică ridicată. Tulpinile bacteriene utilizate pentru biosinteza 2,3 butandiolului produc un amestec de izomeri de 2, 3-Butandiol și acetoină, din care este dificilă separarea stereoizomerilor (2*S*, 3*S*) de 2, 3-Butandiol și 2*S* de acetoină (He et al. *Molecules* **2018**, *23*, 691).

Una din soluțiile utilizate pentru a produce izomer (2*S*, 3*S*) de 2, 3-BD (și respectiv 2*S* de acetoină) este cea a obținerii și utilizării de microorganisme modificate genetic, care să aibă inhibate enzimele care inhibă producerea de stereoizomeri (2*R*, 3*R*) de 2,3-BD și de *meso*-2,3-BD. Cererea de brevet EP3234163



A1 se referă la o bacterie lactică modificată genetic, capabilă să producă izomer (2S, 3S) de 2, 3-BD din glucoză în condiții aerobe. Bacteria lactică este modificată genetic pentru a exprima gene heterologe care codifică enzime care catalizează sinteza stereo-specifică a (2S, 3S) 2, 3-BD, și, în plus, prin eliminarea unor gene, pentru a maximiza producția de (2S, 3S) 2, 3-BD în comparație cu alte produse de fermentație aerobă. Cererea de brevet KR20150128114 A1 descrie modificarea tulpinii ABR76070 derivate din *Klebsiella pneumonia* prin eliminarea acetoin reductazei.

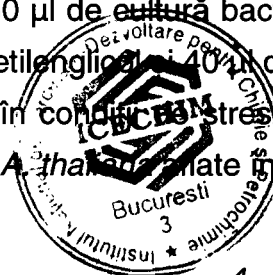
Utilizarea microorganismelor modificate genetic este restricționată la mediul industrial, iar selectarea exclusiv a tulpinilor producătoare de stereozomeri (2S, 3S) 2, 3-BD elimină tulpinile producătoare de stereozomeri (2R, 3R) 2,3 - BD. Stereozomerul (2R, 3R) 2, 3-BD, ca și tulpinile care îl produc, determină efecte de biostimulant pentru plante, asociate reducerii atacului agenților fitopatogeni (Kong et al. *Frontiers in plant science*, **2019**, 9, 90) sau creșterii rezistenței la secetă (Cho et al. *The plant pathology journal*, **2013**, 29, 427). Astfel de efecte de biostimulant pentru plante sunt specifice izomerului (2R, 3R) 2,3 – BD, stereozomerul (2S, 3S) 2, 3-BD neavând nici un efect asupra plantelor de cultură (Cortes-Barco et al. *Annals of Applied Biology*, **2010**, 157, 179-189).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un procedeu de înalt randament, prin care să fie selectate tulpinile producătoare de 2,3 – butandiol, atât de stereozomeri (2R, 3R) în amestec, cât și de stereozomeri (2S, 3S) puri.

Metoda, conform invenției, este constituită din următoarele etape: (i) selecția izolatelor bacteriene care produc 2,3 butandiol, prin cultivare pe mediu lichid care susține producerea de 2,3 butandiol, distribuit câte 250 μl în fiecare godeu dintr-o placă cu 96 godeuri, la temperatura de 28°C, timp de 24 ore, în condiții aerobe, urmată de determinarea colorimetrică a producerii de 2,3 butandiol și (ii) determinarea tipului de stereozomeri produși prin evidențierea efectelor asupra plantelor de *Arabidopsis thaliana*, cultivate în condiții de stres hidric.

Pentru determinarea colorimetrică a producerii de 2,3 butandiol se adaugă, peste cei 250 μl de mediu de cultură pe care au crescut izolatele bacteriene, 50 μl soluție acid periodic H₅IO₆ 0,1M, se incubă la temperatura camerei timp de 30 min, se adaugă 10 μl etilenglicol și 10 μl soluție CuSO₄ 1% și se agită 5 min la temperatura camerei, se adaugă 30 μl soluție p-hidroxidifenil 0,5% în 0,5% NaOH, se incubă timp de 30 min la temperatura camerei, după care se citește densitatea optică la 572 nm, față de un martor în care peste cei 250 μl de cultură bacteriană s-au adăugat 50 μl soluție acid periodic H₅IO₆ 0,1M, 10 μl etilenglicol și 40 μl de apă.

Evidențierea efectelor asupra plantelor crescute în condiții de stres hidric se realizează prin evaluarea vizuală a veștejirii plantelor de *A. thaliana* cultivate în fenofază



de rozetă, cultivate timp de 3 zile, fără udare, cu un ciclu de 16 ore lumină/ 8 ore întuneric, la $120 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ și o umiditate relativă de 50–60%, pe un mediu Murashige Skoog diluat la jumătate și agarizat, distribuit în fiecare din godeurile unei plăci cu 48 godeuri, placă care este acoperită cu o folie care permite schimbul de gaze, și este expusă compuşilor volatili produși de izolatele bacteriene producătoare de 2,3 butandiol, prin acoperirea plăcii cu plante test cu o placă cu 48 godeuri în care se cultivă pe mediu agarizat izolatele bacteriene producătoare de 2,3 butandiol, în așa fel încât fiecare godeu din placa superioară cu izolate bacteriene corespunde unui godeu din placa de bază, cu plante *A. thaliana*.

Metoda descrisă are următoarele avantaje:

- Permite selectarea rapidă a izolatelor care produc cantități semnificative de 2,3 butandiol, datorită faptului că se aplică concomitent mai multor tulpini;
- Evidențiază stereoizomerii 2,3 butandiolului produs de izolatele bacteriene, prin utilizarea unui biotest de înalt randament, care are costuri reduse în comparație cu metodele cromatografice care necesită coloane chirale, echipamente costisitoare și personal înalt calificat.

În continuare se exemplifică realizarea invenției.

Exemplul 1. Se realizează un mediu de cultură alcătuit din 20 g glucoză, 5 g extract de drojdie, 3,5 g triptonă, hidrolizat proteic format prin acțiunea tripsinei asupra cazeinei, 0,2 g MgSO_4 și 3,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dizolvate într-un litru de apă bidistilată. La 1 litru de mediu se adaugă 0,9 ml tampon fosfat (pH 6,5) și 0,09 ml de soluție de microelemente. Tamponul fosfat (pH 6,5) conține (g/L): 3,5 KH_2PO_4 și 2,75 K_2HPO_4 , iar soluția de microelemente este preparată prin adăugarea a 0,4 g FeSO_4 în 3 ml 25% HCl, urmată de adăugarea a 500 ml apă bidistilată (ddH_2O) și a următoarelor cantități de microelemente / factori de creștere (g); 0,8 H_3BO_3 , 0,04 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,04 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5,0 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,1 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,08 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,0 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 0,01 biotină.

Se distribuie aseptice câte 225 μl mediu în godeurile unei plăci sterile cu 96 de godeuri din polipropilenă (de ex. F-bottom / chimney well, Greiner BioOne, Frickenhausen, Germania). Se inoculează cu 25 μl suspensie de izolate bacteriene de testat, care are un conținut de 10^7 ufc/ml bacterii. Inocularea se face randomizat, câte 6 repetiții pentru 16 izolate bacteriene. Se menține la temperatura de 28°C , timp de 24 ore, în condiții aerobe. La sfârșitul acestei perioade se determină colorimetric formarea de 2,3 butandiol. Reacția de culoare se realizează pe trei dintre repetițiile fiecărui izolat. Se adaugă, peste cei 250 μl de mediu de cultură pe care au crescut izolatele bacteriene, 50 μl soluție acid periodic H_5IO_6 și se incubă la temperatura camerei timp de 30 min. După cele 30 min, se adaugă în 10 μl glicol



și 10 μ l soluție CuSO_4 1% și se agită 5 min la temperatura camerei. Pentru dezvoltarea reacției de culoare se adaugă 30 μ l soluție p-hidroxidifenil 0,5% în 0,5% NaOH, se incubă timp de 30 min la temperatura camerei, după care se citește densitatea optică la 572 nm. Densitatea optică a celor 3 repetiții din fiecare izolat se citește față de trei martori, repetiții ale aceluiași izolat, în care peste cei 250 μ l de cultură bacteriană s-au adăugat 50 μ l soluție acid periodic H_5IO_6 0,1M, 10 μ l etilenglicol și 40 μ l de apă.

Evidențierea efectelor asupra plantelor crescute în condiții de stres hidric se realizează prin evaluarea vizuală a veștejirii plantelor de *A. thaliana* aflate în fenofază de rozetă. Semințele de *A. thaliana* (ecotip Columbia) se sterilizează la suprafață și se mențin timp de 48 ore la 4°C, pentru vernalizare. Plantulele germinate se trec în godeurile unei plăci de 48 godeuri, câte o plantă pe fiecare godeu, care conține mediu Murashige Skoog diluat la jumătate și agarizat. Plantulele sunt crescute timp de 15 zile, într-o cameră de creștere (de ex. Economic Delux, Snijders BRS, Drogenbos, Belgia), cu un ciclu de 16 ore lumină/ 8 ore întuneric, la 120 μ mol fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la 22 ± 1 °C și o umiditate relativă de 50–60%, până la fenofaza de rozetă. Peste placa cu 48 godeuri se adaugă o folie care permite schimbul de gaze (de ex. Breathe-Easy® sealing membrane, Sigma-Aldrich, Merck Group, Darmstadt, Germania), iar peste aceasta se depune o placă similară cu 48 godeuri, în care au fost inoculate izolatele producătoare de 2,3 butandiol, pe mediu de cultură conform celui descris mai sus, agarizat cu 20 g agar la litru de mediu. Placa cu izolatele producătoare de 2,3 butandiol este depusă în așa fel încât fiecare godeu din placa superioară cu izolate bacteriene corespunde și închide un godeu din placa de bază cu plante *A. thaliana*. Plăcile se lipesc cu film adeziv și se incubă timp de 3 zile, fără udare, cu un ciclu de 16 ore lumină/ 8 ore întuneric, la 120 μ mol fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la 22 ± 1 °C și o umiditate relativă de 50–60%. La sfârșitul perioadei de incubare se evaluează vizual ofilirea. În cazul în care plantele au fost expuse compușilor volatili ale unui izolat producător de 2,3 butandiol, deci inclusiv de 2,3 butandiol, dar au veștejit, aceasta implică producerea de stereoizomeri (2S, 3S) de 2,3 - BD puri, care nu au capacitatea de a crește toleranța plantelor la stresul hidric. 2,3 butandiolul produs de aceste izolate este util pentru sinteza compușilor biologic activi chirali, dar nu este util pentru biostimularea plantelor. În cazul în care plantele de *A. thaliana* nu s-au ofilit, aceasta înseamnă că au fost expuse stereoizomerului (2R, 3R) de 2,3 - BD, cu efect de biostimulant pentru plante. Izolatele respective sunt utile pentru dezvoltarea de noi bioproduse destinate utilizării ca inputuri în tehnologiile de cultivare a plantelor.



Revendicări

1. Metodă pentru selecția tulpinilor microbiene producătoare de stereoizomeri ai 2,3 butandiolumului, conform invenției, **caracterizată prin aceea că** este constituită din următoarele etape: (i) selecția izolatelor bacteriene care produc 2,3 butandiol, prin cultivare pe mediu lichid care susține producerea de 2,3 butandiol, distribuit câte 250 μl în fiecare godeu dintr-o placă cu 96 godeuri, la temperatura de 28°C, timp de 24 ore, în condiții aerobe, urmată de determinarea colorimetrică a producerii de 2,3 butandiol și (ii) determinarea tipului de stereoizomeri produși prin evidențierea efectelor asupra plantelor de *Arabidopsis thaliana*, cultivate în condiții de stres hidric.
2. Metodă pentru selecția tulpinilor microbiene producătoare de stereoizomeri ai 2,3 butandiolumului, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** pentru determinarea colorimetrică a producerii de 2,3 butandiol se adaugă, peste cei 250 μl de mediu de cultură pe care au crescut izolatele bacteriene, 50 μl soluție acid periodic H_5IO_6 0,1M, se incubă la temperatura camerei timp de 30 min, se adaugă 10 μl etilenglicol și 10 μl soluție CuSO_4 1% și se agită 5 min la temperatura camerei, se adaugă 30 μl soluție p-hidroxidifenil 0,5% în 0,5% NaOH, se incubă timp de 30 min la temperatura camerei, după care se citește densitatea optică la 572 nm, față de un martor în care peste cei 250 ml de cultură bacteriană s-au adăugat 50 μl soluție acid periodic H_5IO_6 0,1M, 10 μl etilenglicol și 40 μl de apă.
3. Metodă pentru selecția tulpinilor microbiene producătoare de stereoizomeri ai 2,3 butandiolumului, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** evidențierea efectelor asupra plantelor crescute în condiții de stres hidric se realizează prin evaluarea vizuală a veștejirii plantelor de *A. thaliana* aflate în fenofază de rozetă, cultivate timp de 3 zile, fără udare, cu un ciclu de 16 ore lumină/8 ore întuneric, la 120 μmol fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la 22 ± 1 °C și o umiditate relativă de 50–60%, pe un mediu Murashige Skoog diluat la jumătate și agarizat, distribuit în fiecare din godeurile unei plăci cu 48 godeuri, placă care este acoperită cu o folie care permite schimbul de gaze, și este expusă compuşilor volatili produși de izolatele bacteriene producătoare de 2,3 butandiol, prin acoperirea plăcii cu plante test cu o placă cu 48 godeuri în care se cultivă izolatele bacteriene producătoare de 2,3 butandiol, în așa fel încât fiecare godeu din placa superioară cu izolate bacteriene corespunde unui godeu din placa de bază, cu plante *A. thaliana*.

