



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2012 00487**

(22) Data de depozit: **03.07.2012**

(41) Data publicării cererii:
28.02.2014 BOPI nr. **2/2014**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "BABEȘ- BOLYAI" DIN
CLUJ-NAPOCA,
STR.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• CARPA RAHELA,
STR. M. KOGĂLNICEANU NR. 1, PARTER,
CAMERA 59, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE MICRO-EXTRACȚIE DE POLI-BETA-
HIDROXIBUTIRAȚI DIN TULPINI BACTERIENE SĂLBATICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a poli-beta-hidroxibutiraiților, utilizat în biotehnologie. Procedeu conform invenției constă din extracția din tulpini bacteriene sălbatice de tip *Azobacter sp* izolate, din

pajiște alpină, xerofilă, carstică și higrofilă, din luncă, cultivate în condiții de creștere controlate.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



PROCEDEU DE MICRO-EXTRACȚIE DE POLI- β -HIDROXIBUTIRAȚI DIN TULPINI BACTERIENE SĂLBATICE

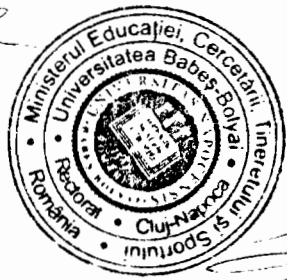
Această invenție descrie un procedeu de micro-extracție a poli- β -hidroxibutiraiților din bacterii de tip *Azotobacter* izolate din soluri cu condiții de mediu heterogene (zona alpină, zona carstică, xerofilă și luncă). Poli- β -hidroxibutiraiții (PHB) sunt polimeri biodegradabili de rezervă, produși intracelular de către anumite bacterii mai ales în condiții de mediu nefavorabile. Pentru a obține acești biopolimeri celulele bacteriene trebuie lizate. Extracția poli- β -hidroxibutiraiților este un pas esențial pentru obținerea și utilizarea practică a acestora. Principala utilitate a invenției constă în producerea și extracția biopolimerului cu multiple aplicații în biotehnologie, în special cea medicală. De asemenea, obținerea acestor biopolimeri se face din surse regenerabile, reducându-se astfel presiunea asupra mediului.

Studiul acestor biopolimeri privind biosinteza, microstructura, proprietatile mecanice și termice precum și biodegradarea lor, a luat amploare în ultimii ani (Suriyamongkol *et al.*, 2007). Este cunoscut procedeu de extracție bazat pe metoda chimică a dispersiei cu hipoclorit de sodiu și cloroform (Chang *et al.* 1994; Singh și Parmar, 2011). Acesta presupune următoarea linie de protocol: creșterea bacteriilor pe diferite medii de cultură, la 30 sau 37 °C cu agitare; colectarea celulelor prin centrifugare la 15000 rpm pentru 10 minute urmată de spălare cu tampon PBS; uscare 20 minute la temperatura camerei; calcularea și adăugarea de cloroform și hipoclorit de sodiu 6% câte 12,5 μ L/mg pellet din fiecare; depozitarea mixturii peste noapte la 30 °C; a doua zi centrifugare la 8000 rpm, 10 minute; transferul fazei de la baza în tub curat cu volum măsurat; adăugare 5x volum de mix de metanol:apa (7:3 v/v); centrifugare 10 min la 15000 rpm; adăugare peste pellet 0,1 acid sulfuric concentrat și se transferă în eprubete de sticlă; fierbere 20 min la 100 °C și răcire; citirea absorbantei în UV la 235 nm.

Printre dezavantajele acestui protocol se numără: cantitatea mare de reactivi, numărul mare de etape și respectiv timp și folosirea de tulpini standard specializate în producerea de PHB. Aceste tulpini bacteriene nefiind selectate pe baza adaptării lor la condiții de stress sintetizează cantități mai mici de PHB.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a asigura un procedeu cât mai eficient și accesibil laboratoarelor pentru extracția la scară redusă a biopolimerului PHB.

1 *2012*



[Signature]

Noutatea acestui procedeu de micro-extracție constă în utilizarea unor tulpini bacteriene provenite din zone cu condiții de mediu mai vitrege, care au un potențial mai ridicat de sinteză a PHB, reducerea cantității de PBS adăugat pelletului și eliminarea etapei de uscare după adăugarea acestuia, reducerea cantității de cloroform și hipoclorit de sodiu și reducerea vitezei de centrifugare. Prin acestea crește eficiența extracției mărindu-se cantitatea extrasă și diminuându-se timpul de lucru și costurile.

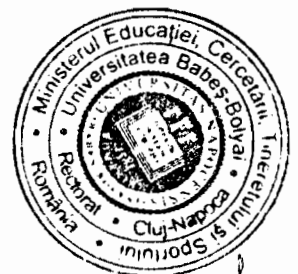
Se dă în continuare un exemplu de aplicare a acestui procedeu de extracție realizat pe tulpini bacteriene sălbatice de tip *Azotobacter sp.* izolate din pajiște alpină, pajiște carstică, pajiște xerofilă și pajiște higrofilă de luncă. Pentru creșterea acestor bacterii s-a utilizat mediul de cultură YE (yeast extract) în mai multe variante: cu 10 g manitol (sau cu 1% glucoză, zaharoză sau arabinoză ca sursă de carbon); 0,5 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g NaCl; 2,5 g peptonă; 2,5 g triptonă; (sau 1% L cisteina; L glicina; DL triptofan) și 2,5 g extract de drojdie și 1000 mL apă distilată. Câte 50 mL din mediile preparate au fost repartizate în flacoane Erlenmeyer de 250 mL, autoclavate și apoi inoculate cu 4% inocul. Acestea au fost puse la incubat la 28 °C, agitare 120 rpm timp de 48 de ore. După incubare suspensiile se centrifughează la 6500 rpm 20 minute. Se spală pelletul cu tampon PBS (mai puțin de 100 μL) și se cătărește. Apoi se calculează pentru fiecare proba cantitatea de cloroform și hipoclorit de sodiu 6% care trebuie adăugată astfel să corespundă câte 12 μL din fiecare pentru 1 mg pellet. Mixul se lasă peste noapte la 30 °C.

A doua zi se centrifughează la 6500 rpm, 15 minute rezultând 3 faze iar cea de la fundul tubului este faza ce conține PHB. Această fază cu cloroform se transferă în tub curat cu volum măsurat. Apoi se adaugă 5x volume de mix de metanol:apă (7:3 v/v). Se centrifughează 20 min la 6500 rpm. Peste pellet se adaugă 0,1 acid sulfuric concentrat și se transferă în eprubete de sticlă. Acest mix se fierbe 20 min la 100 °C și apoi se răcește. La tulpinile bacteriene studiate, poli- β -hidroxibutiratii s-au cuantificat prin citirea absorbanței în UV la 235 nm.

Prin aplicarea acestui nou procedeu, se obțin următoarele avantaje:

- eficientizarea producției de PHB prin folosirea unor tulpini bacteriene capabile să producă cantități mai ridicate de PHB datorită condițiilor de stress ale mediului din care provin.
- simplificarea protocolului de bază prin minimizarea volumului de tampon de spalare și eliminarea etapei de uscare.

Cooper



- creșterea accesibilității utilizării procedului prin reducerea numărului de rotații per minut la centrifugare.

- reducerea volumului de cloroform și hipoclorit de sodiu utilizate.

Procedeul de extracție a poli- β -hidroxibutiraiilor din tulpini bacteriene sălbatice este susceptibil de a fi aplicat la scara mai largă (industrial) prin constituirea unor colecții bacteriene și utilizarea bioreactoarelor în care condițiile de creștere sunt controlate. Avantajele enumerate permit designul unei instalații simplificate de producere a PHB, a carei utilizare presupune număr de operații și timp de producție reduse. Posibilitatea de control automatizat al acestei instalații permite reducerea costurilor de producție aferente resurselor materiale și umane.

Bibliografie

Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M, Shah S., 2007, Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review, *Biotechnol Adv.* 25: 148–175.

Chang Y, Hahn S, Kim B, Chang H., 1994, Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol. Bioeng.* 44(2): 256-261.

Singh P., Parmar N., 2011, Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)-producing bacteria, *African Journal of Biotechnology*, 10(24), 4907-4919.

Cooper R



[Handwritten signature]

REVENDICĂRI

Procedeu de micro-extracție de poli- β -hidroxibutirați din (1) tulpini bacteriene sălbatice izolate din soluri cu condiții de mediu vitrege, (2) cu centrifugare la 6500 rpm, (3) folosind 12 μ L cloroform și 12 μ L hipoclorit de sodiu 6% care se adaugă după etapa de spălare cu tampon PBS, în scopul (4) simplificării procedurii eliminându-se și etapa de uscare a pelletului.

