



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00909**

(22) Data de depozit: **27/11/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2020** BOPI nr. **3/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2015 BOPI nr. **12/2015**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-
FARMACEUTICĂ - ICCF, CALEA VITAN
NR.112, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **LUPESCU IRINA, STR. PREVEDERII
NR.15 A, BL.C 1, SC.A, ET.2, AP.9,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **STĂNESCU PAUL-OCTAVIAN,
STR.VATRA DORNEI NR.9, BL.E4, SC.2,
ET.2, AP.30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **EREMIA MIHAELA-CARMEN,
STR.CÂMPIA LIBERTĂȚII NR.29, BL.B 6,
SC.4, ET.2, AP.127, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SAVOIU GABRIELA,
STR.MOISE NICOARĂ NR.41, BL.D 3,
SC.C, ET.4, AP.113, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **PETRESCU MARIA MONICA,
ȘOS. ȘTEFAN CEL MARE NR. 58, BL. 39,
SC. 1, AP. 14, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **ȘTEFANIU AMALIA, STR. MINIȘ NR. 4,
BL. X6, AP. 114, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **SPIRIDON MARIA, ALEEA FUIORULUI
NR.2, BL.Y 3 B, SC.3, AP.117, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 8685700 B2; KAREN M. TOBIN, KEVIN
E. O'CONNOR,
"POLYHYDROXYALCANOATE
ACCUMULATING DIVERSITY OF
PSEUDOMONAS SPECIES UTILISING
AROMATIC HYDROCARBONAS", FEMS
MICROBIOLOGY LETTERS, VOL. 253,
PP. 111-118, 2005**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A ACIDULUI POLI
3-HIDROXIOCTANOIC**



RO 130766 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a acidului poli 3-hidroxi-
3 octanoic, în cantități și la randamente de interes biotehnologic, cu ajutorul unui microorga-
nism denumit *Pseudomonas fluorescens* ICCF 392.

5 Polihidroxi-*alcanoatii* (PHA) sunt polioxoesteri optic activi compuși din acizi grași R-3-
hidroxi și reprezintă o clasă complexă de poliesteri de rezervă pentru bacterii. Polihidroxi-
7 *alcanoatii* sunt sintetizați și acumulați intracelular în majoritatea bacteriilor în condiții de dez-
voltare nefavorabile (concentrații scăzute de azot, fosfor, oxigen sau magneziu), în prezența
unui exces de sursă de carbon [1].

9 În prezent, polihidroxi-*alcanoatii* sunt clasificați în două categorii principale: cei
alcătuiți din monomeri cu 3...5 atomi de carbon, denumiți PHA cu catene laterale scurte, scl-
11 PHA (*short - chain - lenght* - PHA) și cei alcătuiți din monomeri cu 6-14 atomi de C, denumiți
PHA cu catene laterale medii, mcl-PHA (*medium - chain - lenght* - PHA) [2, 3].

13 Proprietățile fizice ale acestor polimeri sunt strict dependente de structura mono-
merilor din care sunt alcătuiți [4]; de aici concluzia că, prin încorporarea unor monomeri cu
15 număr diferit de atomi de C, se pot obține polimeri biodegradabili cu proprietăți și, respectiv,
utilizări variind într-o gamă foarte largă [5, 6].

17 Până în prezent, numai câțiva polihidroxi-*alcanoatii*, cum ar fi: poli 3-hidroxi-*butiratul*
(PHB), copolimeri ai 3-hidroxi-*butiratului* și 3-hidroxi-*valeratului* (PHBV), poli 4-hidroxi-*butiratul*
19 (P4HB), copolimeri ai 3-hidroxi-*butiratului* și 3-hidroxi-*hexanoatului* (PHBHx), precum și poli
3-hidroxi-*octanoatul* (PHO) sunt studiați pentru cercetarea aplicativă în domeniul medical [7].

21 De exemplu, Stodian și colaboratorii săi [8] au realizat mai multe studii, folosind
diferite modele animale, pentru construirea de suporturi pentru valve cardiace utilizând
23 polimerii P4HB și PHO. Acestea au demonstrat avantajele utilizării polimerilor, și anume:
capacitatea de a forma un model stereolitografic fără a fi nevoie de suturi și reproducerea
25 structurilor anatomice complexe, utile pentru a fabrica țesuturile valvelor cardiace.

27 Cele mai cunoscute microorganisme producătoare de PHA sunt *Ralstonia eutropha*,
Metilobacterium și *Pseudomonas*. Studiile efectuate pe acestea au utilizat ca surse de
carbon pentru producerea de PHA materii prime disponibile și regenerabile. Calea de bio-
29 sinteză a PHA în tulpinile de *Pseudomonas* conduce la obținerea preferențială a monomerilor
C₈-C₁₀ [9].

31 Conform datelor din literatura de specialitate, prelucrarea biomasei bacteriene în
scopul izolării PHA se bazează pe două tipuri de procedee:

33 - degradarea chimică sau enzimatică a celulelor și extracția în mediu apos a tuturor
constituenților celulari, cu excepția PHA;

35 - extracția polimerului din amestecul cu celelalte componente celulare, cu ajutorul
solvenților organici.

37 Extracția cu solvenți organici convenționali implică dizolvarea PHA, preferențial față
de celelalte componente celulare, și se poate realiza cu ajutorul mai multor tipuri de solvenți
39 [10]. Se utilizează fie solvenți capabili să solubilizeze cantități mari de PHA (ca, de exemplu,
cloroformul), fie solvenți care sunt foarte selectivi pentru PHA (ca, de exemplu, dicloretanul).
41 În principiu, cei mai buni solvenți pentru extracția scl-PHA sunt hidrocarburile halogenate:
cloroformul, diclormetanul, 1,2-dicloretanul, 1,2-dicloropropanul. Pe lângă aceștia și în funcție
43 de tipul de polimer sintetizat, se pot utiliza și alți solvenți, ca de pildă hexanul, alcoolii C3 și
acetații acestora, cum ar fi alcoolul izoamilic și acetatul de amidon, cetone, toluen, [11] esteri
45 ciclici ai acizilor carbonici, lactatul de metil sau de etil, acidul acetic sau anhidrida acetică etc.

47 De cele mai multe ori, pentru extracția PHA se utilizează cantități mari de solvent, din
cauza solubilității nu foarte mari a polimerilor, în special a mcl-PHA. În aceste condiții se
formează soluții foarte vâscoase de PHA, greu de separat de ceilalți constituenți celulari.

RO 130766 B1

Metoda extracției cu solvent organic a fost îmbunătățită prin utilizarea așa-numiților "non-solvenți marginali" din clasa alcanilor, a alcoolilor sau a compușilor carbonilici [12]. Non-solvenții marginali (ca de exemplu acetona) se caracterizează prin faptul că aceștia favorizează solubilizarea PHA în cloroform sau alți solvenți tipici, permițând obținerea unor soluții de PHA mai puțin vâscoase [13].	1 3 5
Biosinteza, separarea și purificarea acidului poli 3-hidroxiocetanoic, P(3HO), au făcut subiectul mai multor cercetări care sunt prezentate pe scurt în cele ce urmează.	7
Prin utilizarea microorganismului <i>Pseudomonas sp.</i> DSM 1650 cultivat în condiții aerobe, cu ajustarea pH-ului la 7,0 și la temperatură de 32°C, fermentația s-a efectuat într-un mediu care a conținut acid octanoic 15,12 g/l. După separarea biomasei, aceasta s-a suspendat în acetonă sau isopropanol, după filtrare și uscare s-a tratat cu un solvent organic inert (acetonă, metilisobutilcetonă, diisopropilcetonă, dietilcetonă, etil acetat, propil acetat, butil acetat, dietil eter, diisopropil eter sau tetrahidrofuran), iar după evaporare s-a format un film polimeric cu conținut de P(3HO) [14].	9 11 13
De asemenea, cu ajutorul microorganismului <i>Pseudomonas putida</i> , GPo1 s-a produs polihidroxiocetanoat pe cale microbiană într-un bioreactor cu o capacitate de 650 l și într-un mediu ce conține săruri minerale cu 20 mM octanoat de sodiu ca sursă de carbon [15].	15 17
Producerea polimerului P(3HO) s-a studiat și cu ajutorul microorganismului <i>Pseudomonas mendocina</i> într-un mediu de fermentație conținând săruri minerale, sursa de carbon, octanoat de sodiu în proporție de 20:1 (g/g) față de sursa de azot; pH-ul mediului (6,8...7,5) menținut cu NaOH 2M și H ₂ SO ₄ 2M. Biomasa rezultată s-a centrifugat și liofilizat, iar polimerul s-a extras prin diferite metode [16].	19 21
Extracția s-a realizat cu hipoclorit de sodiu și cloroform, în diferite rapoarte de concentrații. Biomasa uscată s-a incubat pe de o parte într-o dispersie conținând NaOCl 30% și CHCl ₃ în raport 1:1 la 30°C, și pe de altă parte NaOCl 80% și CHCl ₃ în raport 1:4, timp de 2,5 h și 150 rpm. După centrifugare la 4000 g timp de 18 min, se observă formarea a trei straturi, un strat superior de hipoclorit, un strat la mijloc care conține resturi de celule și stratul de jos de cloroform care conține polimerul dizolvat. După separare, polimerul se precipită cu 10 vol de metanol rece, sub agitare continuă.	23 25 27 29
Prin altă metodă de extracție, biomasa spălată și liofilizată s-a tratat cu metanol (1 g în 20 ml metanol) timp de 5 min la 22 ± 10°C la 140 g. Biomasa astfel pretrată se introduce în extracție cu Soxhlet, utilizând 5 vol de acetonă, timp de 5 h, urmată de precipitarea polimerului cu 10 vol metanol rece.	31 33
Pentru extracția cu cloroform, biomasa uscată s-a incubat în CHCl ₃ , timp de 24 h, la 30°C cu agitare. Soluția se concentrează la evaporator rotativ cu vid și se precipită apoi polimerul în 10 vol de metanol.	35
Polimerul extras a fost supus purificării prin etape consecutive, repetate, de precipitare pentru a reduce sau elimina contaminarea cu lipopolizaharide. Polimerul se precipită întâi utilizând un amestec de 70% metanol și etanol (1:1). Polimerul precipitat se dizolvă apoi în acetonă și din nou precipitat utilizând același amestec metanol și etanol.	37 39
Randamentul maxim obținut pentru obținerea acidului poli 3-hidroxiocetanoic a fost de 35% raportat la celulele uscate.	41
Din polimerul rezultat s-au obținut filme utilizând metoda de turnare, cu solvent. Filmele au fost realizate prin utilizarea a 5 și 10% din polimer în 10 ml de CHCl ₃ . Polimerul s-a dizolvat bine, după care soluția de polimer s-a filtrat. Filmele s-au realizat prin turnarea soluției de polimer în vase de sticlă Petri. Soluția s-a lăsat să se usuce la temperatura camerei timp de 1 săptămână, urmată de liofilizare [17].	43 45 47

RO 130766 B1

1 Polimerul polihidroxiocetanoat s-a obținut și cu ajutorul microorganismul *Pseudomonas*
2 *oleovorans* pe două medii de cultură, unul ce a conținut 20% glicerol și altul cu glucoză
3 2,5...3,0 g/l, iar ca sursă de carbon acid octanoic 20 mM, condiții de fermentare identice 30°C
și pH 7, timp de 24 h cu agitare continuă la 180 rpm. Biomasa rezultată în urma fermentației
5 s-a liofilizat, iar polimerul s-a izolat cu adaos de 80 ml cloroform la 1 g celule liofilizate, prin
6 agitare la 180 rpm și la 30°C timp de 2 zile. Soluția rezultată s-a concentrat, iar polimerul s-a
7 precipitat prin adaos a 9 ml metanol rece, la 1 ml soluție polimer, cu agitare. Precipitatul
separat prin centrifugare se redizolvă în cloroform, rezultând un film polimeric de PHO. Anali-
9 zele efectuate prin gaz cromatografie au arătat că cele două medii nu au influențat producția
de PHO fiind similară, 0,043 g/l/h [18].

11 Dintre metodele descrise în literatura de specialitate pentru obținerea PHO, rezultă
că printre speciile de *Pseudomonas*, producătoare de PHO nu se regăsesc tulpini de
13 *Pseudomonas fluorescens*.

Fermentațiile descrise pentru producerea de PHA, printre care și PHO, se desfășoară
15 la pH 7,0...7,5 menținut prin corecție cu acizi sau baze în funcție de caz.

În ceea ce privește procesarea postbiosinteză, pentru izolarea ulterioară a PHA,
17 aceasta implică o etapă de uscare a biomasei, prin liofilizare, după separarea ei din mediul
de fermentație.

19 Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere
a acidului poli 3-hidroxiocetanoic, cu ajutorul microorganismului *Pseudomonas fluorescens*
21 ICCF 392, izolat din natură de autorii acestui brevet, în cadrul unui program de izolare-
identificare de tulpini de bacterii și fungi de interes industrial, și întreținută în colecția ICCF
23 sub denumirea de *Pseudomonas sp* ICCF 392. Fermentația se desfășoară fără corecție de
pH pe parcursul biosintezei și acumulării biopolimerului, iar pentru izolarea PHA (PHO) se
25 prelucrează biomasa umedă nativă. Extracția polimerului se realizează cu un amestec format
din hipoclorit și cloroform în proporție de 1:3, ușurând astfel separarea fazei cloroformice ce
27 conține polimerul, obținându-se un amestec de polimeri cu un conținut preponderent de PHO
de peste 35%, valoare menționată în literatura de specialitate.

29 Procedeu conform invenției constă în aceea că: tulpina de *Pseudomonas fluorescens*
ICCF 392 este crescută pe mediu de inocul cu următoarea compoziție: 1% glucoză, 1,5%
31 extract de porumb, 1% KH_2PO_4 , 1% NaCl, 0,05% MgSO_4 timp de 24 h și apoi cultivată pentru
acumularea de PHA, pe un mediu cu următoarea compoziție: 2% citrat de sodiu, 0,35%
33 $\text{NaNH}_4\text{HPO}_3$, 0,75% K_2HPO_4 , 0,37% KH_2PO_4 , soluție de microelemente: 0,1 ml la 100 ml mediu;
soluția de microelemente conține: 1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,78 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ în 1M HCl; 1,98
35 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,81 g $\text{CaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,47g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,17 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,29 g ZnSO_4
 $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se suplimentează cu 3 ml soluție stoc de octanoat de sodiu, de concentrație 8,33%,
37 adăugându-se la 0, 24 și 30 h, pentru o concentrație finală de octanoat de sodiu de 0,25 g
la 100 ml mediul de fermentație. Condițiile de cultivare sunt: 28...32°C, pH inițial de 7...7,5,
39 agitare pe un agitator rotativ cu 220 rpm și 2 cm excentritatea agitatorului, timp de 48 h.

Mediul de fermentație final se centrifughează la 6000 rpm, 20 min la 9°C pentru sepa-
41 rarea biomasei, care se spală cu apă distilată pentru îndepărtarea resturilor celulare și cu
metanol pentru eliminarea lipopolizaharidelor. Biomasa umedă nativă rezultată este supusă
43 prelucrării pentru izolarea polimerului, prin tratare cu un amestec format din NaOCl și CHCl_3
de 1:3, menținut timp de 2 h la 37...40°C, sub agitare moderată. Separarea fazelor formate
45 se face rapid printr-o pâlnie de separare, reținându-se faza inferioară, cloroformică, ce
conține PHA. În aceste condiții se realizează:

- 47 - un mediu de fermentație la 48 h cu un pH final de 8,81 și concentrație celulară de
15,8575 g/l;
- 49 - concentrație PHA de 8,80 g/l;
- conținut PHO in PHA determinări prin GC-FID = 79,6%, respectiv 80,71% moli.

RO 130766 B1

Procedeul, conform invenției prezintă următoarele avantaje:	1
- procedeul utilizează tulpină izolată din lemn putred de fag, din Colecția de Micro-organisme de Importanță Industrială a ICCF (CMII);	3
- prin cultivarea tulpinii nou izolate de <i>Pseudomonas fluorescens</i> pe un mediu conținând ca surse de carbon citrat de sodiu 2% și octanoat de sodiu 0,25%, la o temperatură de 28...32°C și aerare prin agitare pe un agitator rotativ cu 220 rpm și 2 cm excentritatea agitatorului, în decurs de 48 h de cultivare, se obțin rezultate de interes biotehnologic mai mari decât cele cunoscute din literatură;	5
- procedeul este realizat în condiții optime prin extracția polimerului din biomasa umedă nativă și folosind un amestec de NaOCl:CHCl ₃ în proporție de 1:3, față de 1:1 sau 1:4 întâlnit în publicațiile de specialitate, ceea ce a condus la obținerea unui procent mai mare de poli 3-hidroxi octanoat în compoziția filmului polimeric.	7
În continuare, se vor prezintă exemple de realizare a invenției.	9
Exemplul 1	11
Obținerea culturii inocul de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ICCF 392 s-a realizat folosind un mediu cu următoarea compoziție: 1% glucoză, 1,5% extract de porumb, 1% KH ₂ PO ₄ , 1% NaCl, 0,05% MgSO ₄ , sub agitare 220 rpm, timp de 24 h.	13
Pentru fermentație și acumularea PHA s-a folosit un mediu cu următoarea compoziție: 0,25% octanoat de sodiu ca sursă de carbon și energie, 0,35% NaNH ₄ HPO ₃ , 0,75% K ₂ HPO ₄ , 0,37% KH ₂ PO ₄ , soluție de microelemente 0,1 ml la 100 ml mediu; soluția de microelemente conține: 1M MgSO ₄ · 7H ₂ O; 2,78 g FeSO ₄ · 7H ₂ O în 1M HCl; 1,98 MnCl ₂ · 4H ₂ O, 2,81 g CaSO ₄ · 7H ₂ O, 1,47 g CaCl ₂ · 2H ₂ O, 0,17 g CuCl ₂ · 2H ₂ O, 0,29 g ZnSO ₄ · 7H ₂ O.	15
Pe parcursul fermentației se adaugă octanoat de sodiu pentru a obține o concentrație finală de 0,25% (g/v) la 24 h și 30 h. Condițiile de cultivare au fost următoarele: 28...32°C, pH inițial 7,5, aerarea prin agitare pe un agitator rotativ cu 220 rpm și 2 cm excentritatea agitatorului. La sfârșitul celor de 48 h, pH-ul mediului de fermentație este 7,55 și densitatea optică de 0,3559.	17
Izolarea și purificarea PHA din biomasa rezultată în urma fermentației s-a realizat după cum urmează:	19
- centrifugare mediu final de fermentație la 6000 rpm, 20 min la 9°C pentru separarea biomasei;	21
- spălare cu aprox 150...200 ml apă distilată pentru îndepărtarea resturilor celulare;	23
spălare cu metanol aproximativ 200 ml pentru delipidizare;	25
- centrifugare 20 min, 9°C, 6000 rpm;	27
- cantitate biomasă umedă nativă rezultată = 2,5 g%;	29
- 2,5 g biomasă umedă nativă s-au suspendat într-un amestec format din NaOCl:CHCl ₃ 1:1 (25 ml hipoclorit și 25 ml chloroform);	31
- amestecul s-a menținut 2 h la 37...40°C (ușor reflux), sub agitare moderată;	33
- separarea fazelor amestecului s-a efectuat rapid și eficient într-o pâlnie de separare; s-a reținut faza cloroformică în care s-a extras PHA-ul.	35
- formarea filmului polimeric se realizează prin turnarea cloroformului ce conține PHA într-un Petri și se lasă 24 h la temperatura camerei.	37
- cantitatea de PHA rezultată în urma extracției sub formă de film polimeric a fost de 0,011 g, cu un conținut de PHO de 79% determinat prin GC-FID, respectiv 53,16% moli.	39
Exemplul 2	41
Obținerea culturii inocul de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ICCF 392 s-a realizat în aceleași condiții ca cele prezentate la exemplul 1, iar pentru fermentație și acumularea PHA s-a folosit un mediu de fermentație în care s-a introdus, pe lângă 0,25% octanoat de sodiu,	43
	45

RO 130766 B1

1 2% citrat de sodiu ca sursă de carbon și energie. Pe parcursul fermentației, se adaugă
octanoat de sodiu pentru a obține o concentrație finală de 0,25% (g/v) la 24 h și 30 h.
3 Condițiile de lucru și cultivare au fost identice cu exemplul 1.

La sfârșitul celor de 48 h, pH-ul mediului de fermentație este 8,80 și densitatea optică
5 de 0,6343.

Izolarea și purificarea biomasei rezultate în urma fermentației s-a realizat urmând
7 aceleași etape prezentate în exemplul 1, în urma cărora s-au obținut:

- cantitatea de biomasă umedă nativă = 8,6 g/l;
- 9 - biomasă uscată = 2,5284 g/l (su 29,4%);
- 0,3963 g biomasă umedă nativă s-au suspendat într-un amestec format din
11 NaOCl:CHCl₃ 1:1 (25 ml hipoclorit și 25 ml chloroform);
- amestecul s-a menținut 2 h la 37...40°C (ușor reflux), sub agitare moderată;
- 13 - separarea fazelor amestecului s-a efectuat rapid și eficient într-o pâlnie de separare;
s-a reținut faza cloroformică în care s-a extras PHA-ul;
- 15 - formarea filmului polimeric se realizează prin turnarea cloroformului ce conține PHA
într-un Petri și se lasă 24 h la temperatura camerei;
- 17 - cantitatea de PHA rezultată în urma extracției, sub formă de film polimeric a fost de
0,0787 g, cu un conținut de PHO 66,1% determinat prin GC-FID, respectiv 79,33% moli.

19 Exemplul 3

Prin cultivarea bacteriei *Pseudomonas fluorescens* ICCF 392 în aceleași condiții ca
21 în exemplul 2, la sfârșitul celor de 48 h, pH-ul mediului de fermentație este 8,80 și densitatea
optică de 0,6343.

23 Pentru obținerea polimerului din biomasă rezultată în urma fermentației s-au urmat
aceleași etape prezentate în exemplele 1 și 2. În etapa de izolare a polimerului din biomasă,
25 aceasta s-a suspendat într-un amestec format din NaOCl:CHCl₃ 1:3, obținându-se astfel din
4,8 g biomasă umedă nativă, suspendate în amestecul format din 25 ml hipoclorit și 75 ml
27 cloroform, un film polimeric de PHA de 0,5641 g, cu un conținut de PHO 79,6% determinat
prin GC-FID, respectiv 80,71% moli.

29

31 Bibliografie

- 33 1. Escapa If, Garcia JI, Bühler B., Blank Lm, Prieto Ma. 2012. *The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in Pseudomonas putida*. Environ. Microbiol. 14: 1049-1063. Medline.
- 35 2. Ojumu T. V., Yu J. Și Solomon B. O., 2004, "*Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer*", African J. of Biotechnology, 3 (1), pp. 18-24.
- 37 3. Xuan Jiang și colab. 2012, „*Medium chain length polyhydroxyalkanoate polymer and method of making same*”, US 8273852 B2, sep. 25, 2012.
- 39 4. Imam S., Greene R. și Zaidi B., 1999, "*Biopolymers. Utilizing Nature's Advanced Materials*", American Chemical Society, Washington, DC. 112 p.
- 41 5. Curley J. M., și colab., 1996, *Macromolecules*, 29, 1762-1766.
- 43 6. Byrom D., 1992, "*Production of poly-b-hydroxybutyrate:poly-b-hydroxyvalerate Copolymers*", Fems microbiol. Rev., 103 , 247-250].
- 45 7. Guo-Qiung Chen și Qiong Wu, 2005, *The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials*, Biomaterials 26, 6565-6578.
- 47 8. Sodian R., Loebe M., Hein A., Martin D. P., Hoerstrup S. P., Potapov E. V., Hausmann H., Lueth T., Hetzer R., *Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves*. ASAIO J 2002;48:12-6.

RO 130766 B1

9. Lupescu Irina, Constantinescu-Groposila Diana, Cornea Petruța Călina, Voaides Cătălina, Eremia Mihaela, Gabriela-Valeria Savoiu, Moscovici Misu, 2008, "*The influence of carbon source upon the biosynthesis of PHA by a mutant strain of Pseudomonas putida*", XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology & XII. International Congress of Mycology, IUMS 2008, august 5-9, Istambul, Turcia, Abstracts. 1
3
5
10. Steinbuchel A., Fuchtenbusch B., Trends Biotechnol., 16, 419-427, 1998 5
11. Choi, J., Lee, S.Y., *Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 13-21, 51, 1999. 7
12. Lee S.Y., *Bacterial polyhydroxyalkanoates*, Biotechnol. Bioeng. 49, 57-79, 1996. 9
13. Koichi Kinoshita, 2006, *Method for production polyhydroxyalkanoate crystal*, US 7098298 B2, aug. 29, 2006. 11
14. Eric Ohleyer, Firmenich S. A., 1993, *Method for obtaining poly-b-hydroxyoctanoic acid via solvent extraction*, Patent nr. US 5422257, Jun. 6, 1995. 13
15. Elbahloul Y., Steinbuchel A., Appl Environ Microbiol. 2009, *Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by Pseudomonas putida GPo1 and a simplified downstream process*. Feb;75(3):643-51. doi: 10.1128/AEM.01869-08. Epub 2008 Dec 1. 15
16. Ranjana Rai, *Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and its medical applications*. This is an electronic version of a PhD thesis awarded by the University of Westminster. © The Author, 2010. 17
19
17. Ranjana Rai și colab. *The homopolymer, poly(3hydroxyoctanoate), P(3HO), as a matrix material for soft tissue engineering*, <http://eprints.soton.ac.uk> 2011. 21
18. Catharine Woolnough, *Biodegradation, surface rugosities and biofilm coverage of biopolymers*, thesis submitted for the degree of doctor of philosophy, 2006. 23

Revendicare

1

3

5

7

9

11

Procedeu de obținere a acidului poli 3-hidroxi octanoat, **caracterizat prin aceea că** este compus dintr-un mediu mineral care conține octanoat de sodiu 0,25% și citrat de sodiu 2%, și cu ajutorul microorganismului *Pseudomonas fluorescens*, cultivat în decurs de 48 h, în condiții de aerare prin agitare, pe un agitator rotativ cu 220 rpm, la o temperatură de 28...32°C și un pH inițial de 7,5, după care se centrifughează mediu și biomasa umedă nativă rezultată este supusă unor serii de spălări cu apă distilată și metanol, apoi biomasa se suspendă într-un amestec format din hipoclorit și cloroform 1:3, se menține 2 h la 37...40°C, sub agitare moderată, după care se separă fazele formate, rapid, printr-o pâlnie de separare, reținându-se faza cloroformică care prezintă un conținut de 79,6% de PHO, determinat prin GC-FID, respectiv, 80,71% moli.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 122/2020