



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00909

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

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

(71) Solicitant:
• 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

(54) PROCEDEU DE OBTINERE A ACIDULUI POLI
3-HIDROXIOCTANOIC

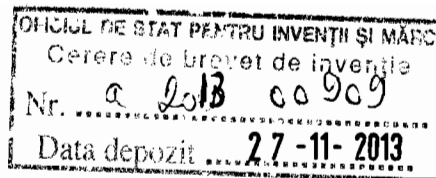
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a acidului poli 3-hidroxiocetanoic (PHO). Procedeu conform invenției constă în cultivarea microorganismului *Pseudomonas fluorescens* într-un mediu mineral care conține 0,25% octanoat de sodiu și 2% citrat de sodiu, timp de 48 h, în condiții de aerare prin agitare, pe un agitator rotativ cu 220 rpm, la o temperatură de 28...32°C și pH inițial de 7,5, după care se centrifughează mediul, 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 în raport 1:3, se menține 2 h la o temperatură de 37...40°C, sub agitare moderată, după care se separă rapid fazele formate, printr-o pâlnie de separare, reținându-se faza cloroformică ce prezintă un conținut de 79,6% moli PHO.

Revendicări: 1





PROCEDEU DE OBTINERE A ACIDULUI POLI 3-HIDROXIOCTANOIC

Prezenta se referă la un procedeu de obținere a acidului poli 3-hidroxiocetanoic, în cantități și la randamente de interes biotehnologic, cu ajutorul unui microorganism denumit *Pseudomonas fluorescens* ICCF 392.

Polihiidroxiacanoații (PHA) sunt polioxoeșteri optic activi compuși din acizi grași R-3-hidroxi și reprezintă o clasă complexă de polieșteri de rezervă pentru bacterii. Polihiidroxiacanoații sunt sintetizați și acumulați intracelular în majoritatea bacteriilor în condiții de dezvoltare nefavorabile (concentrații scăzute de azot, fosfor, oxigen sau magneziu), în prezența unui exces de sursă de carbon. [1]

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

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

Până în prezent, numai câțiva polihiidroxiacanoați, cum ar fi: poli 3-hidroxiacanoatul (PHB), copolimeri ai 3-hidroxiacanoatului și 3-hidroxiacanoatului (PHBV), poli 4-hidroxiacanoatul (P4HB), copolimeri ai 3-hidroxiacanoatului și 3-hidroxiacanoatului (PHBHHx), precum și poli 3-hidroxiacanoatul (PHO) sunt studiați pentru cercetarea aplicativă în domeniul medical [7]

De exemplu, Stodian și colaboratorii săi [8] au realizat mai multe studii, folosind diferite modele animale, pentru construirea de suporturi pentru valve cardiace utilizând 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 structurilor anatomice complexe, utile pentru a fabrica țesuturile valvelor cardiace.

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 biosinteză a PHA în tulpinile de *Pseudomonas* conduce la obținerea preferențială a monomerilor C₈-C₁₀. [9]

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

- degradarea chimică sau enzimatică a celulelor și extracția în mediu apos a tuturor constituenților celulari, cu excepția PHA.
- extracția polimerului din amestecul cu celelalte componente celulare, cu ajutorul solvenților organici.

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 [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). 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 de tipul de poliester sintetizat, se pot utiliza și alți solvenți, ca de pildă hexanul, alcoolii C 3 și acetatii acestora, cum ar fi alcoolul izoamilic și acetatul de amil, cetone, toluen, [11] esteri ciclici ai acizilor carbonici, lactatul de metil sau de etil, acidul acetic sau anhidrida acetică etc.

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

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 ex. acetona) se caracterizează prin faptul că ei favorizează solubilizarea PHA în cloroform sau alți solvenți tipici, permițând obținerea unor soluții de PHA mai puțin vâscoase [13].

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.

Prin utilizarea microorganismului *Pseudomonas sp.* 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 ce a conținut acid octanoic 15,12g/L. După separarea biomasei, aceasta s-a sususpendat în acetonă sau isopropanol, după filtrare și uscare s-a tratat cu un solvent organic inert (acetonă, metilisobutilcetonă, diisopropilcetonă, dietilcetonă, etilacetat, propilacetat, butilacetat, dietil eter, diisopropil eter sau tetrahidrofuran), iar după evaporare s-a format un film polimeric cu conținut de P(3HO) [14].

Deasemeni, cu ajutorul microorganismului *Pseudomonas putida*, GPo1 s-a produs polihidroxiocetanoat pe cale microbiană într-un bioreactor cu o capacitate de 650 litri și într-un mediu ce conține săruri minerale cu 20 mM octanoat de sodiu ca sursă de carbon [15].

Producerea polimerului P(3HO) s-a studiat și cu ajutorul microorganismului *Pseudomonas mendocina* 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 H₂SO₄ 2M. Biomasa rezultată s-a centrifugat și liofilizat, iar polimerul s-a extras prin diferite metode [16].

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 CHCl₃ în raport 1:1 la 30°C, și pe de alta parte NaOCl 80% și CHCl₃ în raport 1:4, timp de 2,5 ore și 150 rpm. După centrifugare la 4000g timp de 18 minute 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 volume de metanol rece, sub agitare continuă.

Prin altă metodă de extracție, biomasa spălată și liofilizată, s-a tratat cu metanol (1g în 20 ml metanol) timp de 5 minute la 22±10° C la 140g. Biomasa astfel pretrată

se introduce în extracție cu Soxhlet, utilizând 5 volume de acetonă, timp de 5 ore, urmată de precipitarea polimerului cu 10 volume metanol rece.

Pentru extracția cu cloroform, biomasa uscată s-a incubat în CHCl_3 , timp de 24 ore, la 30°C cu agitare. Soluția se concentrează la evaporator rotativ cu vid și se precipită apoi polimerul în 10 volume de metanol.

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.

Randamentul maxim obținut pentru obținerea acidului poli 3-hidroxiocetanoic a fost de 35% raportat la celulele uscate.

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].

Polimerul polihidroxiocetanoat s-a obținut și cu ajutorul microorganismul *Pseudomonas oleovorans* pe două medii de cultură, unul ce a conținut 20% glicerol și altul cu glucoză 2,5 – 3,0g/L, iar ca sursă de carbon acid octanoic 20 mM, condiții de fermentare identice 30°C și pH 7, timp de 24 ore cu agitare continuă la 180 rpm. Biomasa rezultată în urma fermentației s-a liofilizat, iar polimerul s-a izolat cu adăugarea de 80 ml cloroform la 1g celule liofilizate, prin agitare la 180 rpm și la 30°C timp de 2 zile. Soluția rezultată s-a concentrat, iar polimerul s-a precipitat prin adăugarea de 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. Analizele efectuate prin gaz cromatografie au arătat ca cele două medii nu au influențat producția de PHO fiind similară, 0,043 g/L/h [18].

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

Fermentațiile descrise pentru producerea de PHA printre care și PHO se desfășoară 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, aceasta implică o etapă de uscare a biomasei, prin liofilizare, după separarea ei din mediul de fermentație.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere a acidului poli 3-hidroxiocetanoic, cu ajutorul microorganismului *Pseudomonas fluorescens* 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 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 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 conține polimerul, obținându-se un amestec de polimeri cu un conținut preponderent de PHO de peste 35 %, valoare menționată în literatura de specialitate.

Procedeul 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% extract de porumb, 1% KH_2PO_4 , 1% NaCl , 0,05% MgSO_4 timp de 24h și apoi cultivată pentru acumularea de PHA, pe un mediu cu următoarea compoziție: 2% citrat de sodiu, 0,35% $\text{NaNH}_4\text{HPO}_3$, 0,75% K_2HPO_4 , 0,37% KH_2PO_4 , soluție de microelemente: 0,1ml la 100ml mediu; soluția de microelemente conține: 1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,78g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ în 1M HCl ; 1,98g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,81g $\text{CaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,47g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,17g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,29g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se suplimentează cu 3ml soluție stoc de octanoat de sodiu, de concentrație 8,33%, adăugându-se la 0, 24 și 30h, 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 initial de 7 - 7,5 , agitare pe un agitator rotativ cu 220rpm și 2cm excentritatea agitatorului, timp de 48 de ore.

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

În aceste condiții se realizează:

- ✓ un mediu de fermentație la 48 ore cu un pH final de 8,81 și concentrație celulară de 15,8575g/L
- ✓ concentrație PHA de 8.80 g/L
- ✓ conținut PHO in PHA determinări prin GC-FID = 79,6%, respectiv, 80,71% moli

Procedeul, conform invenției prezintă următoarele avantaje:

1. Procedeul utilizează tulpină izolată din lemn putred de fag, din Colecția de Microorganisme de Importanță Industrială a ICCF (CMII)
2. Prin cultivarea tulpinii nou izolată de *Pseudomonas fluorescens* 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 220rpm și 2cm excentritatea agitatorului, în decurs de 48 ore de cultivare se obțin rezultate de interes biotehnologic mai mari decât cele cunoscute din literatură
3. 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-hidroxiocetanoat în compoziția filmului polimeric.

În continuare se vor prezinta exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

Obținerea culturii inocul de *Pseudomonas fluorescens* ICCF 392 s-a realizat folosind un mediu cu următoarea compoziție: 1% glucoză, 1,5% extract de porumb, 1% KH_2PO_4 , 1% NaCl , 0,05% MgSO_4 , sub agitare 220 rpm, timp de 24h.

Pentru fermentație și acumularea PHA s-a folosit un mediu cu următoarea compoziție: 0,25 % octanoat de sodiu ca sursa de carbon și energie, 0,35% $\text{NaNH}_4\text{HPO}_3$, 0,75% K_2HPO_4 , 0,37% KH_2PO_4 , soluție de microelemente: 0,1mL la 100ml mediu; soluția de microelemente conține: 1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,78g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ în 1M HCl ; 1,98g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,81g $\text{CaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,47g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,17g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,29g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Pe parcursul fermentației se adaugă octanoat de sodiu pentru a obține o concentrație finală de 0,25%(g/v) la 24h și 30 de ore. Condițiile de cultivare au fost următoarele: 28°-32°C, pH initial 7,5 aerarea prin agitare pe un agitator rotativ cu 220rpm și 2cm excentritatea agitatorului. La sfârșitul celor de 48 ore, pH-ul mediului de fermentație este 7,55 și densitatea optică de 0,3559.

Izolarea și purificarea PHA din biomasa rezultată în urma fermentației s-a realizat după cum urmează:

- centrifugare mediu final de fermentație la 6000rpm, 20 minute la 9°C pentru separarea biomasei,
- spălare cu aprox 150-200 mL apă distilată pentru îndepărtarea resturilor celulare;
- spălare cu metanol aprox 200 ml pentru delipidizare
- centrifugare 20 min, 9°C, 6000 rpm;
- cantitate biomasa umedă nativă rezultată = 2.5 g%
- 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) ;
- amestecul s-a menținut 2 ore la 37- 40° C (ușor reflux), sub agitare moderată;
- 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
- formarea filmului polimeric se realizează prin turnarea cloroformului ce conține PHA într-un Petri și se lasă 24 de ore la temperatura camerei.
- 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

Exemplul 2

Obținerea culturii inocul de *Pseudomonas fluorescens* 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, 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 24h și 30 de ore. Condițiile de lucru și cultivare au fost identice cu exemplul 1.

La sfârșitul celor de 48 ore, pH-ul mediului de fermentație este 8,80 și densitatea

optică de 0,6343

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

- cantitatea de biomasă umedă nativă = 8,6 g/L
- biomasă uscată = 2,5284 g/L (su 29,4 %)
- 0,3963 g biomasă umedă nativă s-au suspendat într-un amestec format din NaOCl : CHCl₃ 1:1 (25 ml hipoclorit și 25 ml chloroform) ;
- amestecul s-a menținut 2 ore la 37- 40° C (ușor reflux), sub agitare moderată;
- 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
- formarea filmului polimeric se realizează prin turnarea cloroformului ce conține PHA într-un Petri și se lasă 24 de ore la temperatura camerei.
- 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

Exemplul 3

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

- Pentru obținerea polimerului din biomasa rezultată în urma fermentației s-au urmat aceleași etape prezentate în exemplele 1 și 2. În etapa de izolare a polimerului din biomasă, 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 cloroform, un film polimeric de PHA de 0,5641g, cu un conținut de PHO 79,6% determinat prin GC-FID, respectiv, 80,71% moli

BIBLIOGRAFIE

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
2. Ojumu T.V., Yu J. si Solomon B.O., 2004, "Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer", African J. of Biotechnology, **3** (1), pp 18-24
3. Xuan Jiang si colab. 2012, „Medium chain length polyhydroxyalkanoate polymer and method of making same”, US 8273852 B2, sep. 25, 2012
4. Imam, S., Greene, R. și Zaidi, B. 1999, "Biopolymers. Utilizing Nature's Advanced Materials." American Chemical Society, Washington, DC. 112 p.
5. Curley J. M., și colab., 1996, Macromolecules, **29**, 1762–1766;

6. Byrom, D., 1992, "Production of poly-b-hydroxybutyrate:poly-b-hydroxyvalerate Copolymers", *Fems microbiol. Rev.*, **103**, 247–250].
7. Guo-Qiung Chen și Qiong Wu, 2005, The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials *Biomaterials* 26, 6565–6578
8. Sodian R, Loebe M, Hein A, Martin DP, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Lueth T, Hetzer R. Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. *ASAIO J* 2002;48:12–6.
9. Lupescu Irina, Constantinescu-Groposila Diana, Cornea Petruta Calina, Voaides Catalina, 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, Istanbul, Turcia, Abstracts.
10. Steinbuchel A., Fuchtenbusch B., *Trends Biotechnol.*, 16, 419 – 427, 1998
11. Choi, J., Lee, S.Y., Factors affecting the economics of polyhydroxyalcanoates production by bacterial fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 13-21, 51, 1999
12. Lee, S.Y., Bacterial polyhydroxyalcanoates, *Biotechnol. Bioeng.* 49, 57-79, 1996
13. Koichi Kinoshita, 2006, Method for production polyhydroxyalkanoate crystal US 7098298 B2, aug. 29, 2006
14. Eric Ohleyer, Firmenich SA, 1993, Method for obtaining poly-b-hydroxyoctanoic acid via solvent extraction Patent nr. US 5,422,257, Jun. 6, 1995
15. Elbahloul Y, Steinbüchel 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.
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. Ranjana Rai și colab. The homopolymer, poly(3hydroxyoctanoate), P(3HO), as a matrix material for soft tissue engineering <http://eprints.soton.ac.uk> 2011
18. Catharine Woolnough, Biodegradation, surface rugosities and biofilm coverage of biopolymers, thesis submitted for the degree of doctor of philosophy, 2006

PROCEDEU DE OBTINERE A ACIDULUI POLI 3-HIDROXIOCTANOIC

REVENDICARE

Procedeu de obținere a acidului poli 3-hidroxi octanoat **caracterizat prin aceea că**, dintr-un mediu mineral care conține octanoat de sodiu 0.25 % și citrat de sodiu 2% și cu ajutorul microorganismului *Pseudomonas fluorescens* ICCF 392, cultivat în decurs de 48 de ore, 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 ore 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.