



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00619

(22) Data de depozit: 29/08/2018

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. 3/2020

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA TEHNICĂ " GHEORGHE
ASACHI " DIN IAȘI,
STR.PROF.DR.DOC.DIMITRIE
MANGERON, NR.67, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• MAIER STELIAN SERGIU,
STR.FÂNTÂNILOR NR.37, BL.B 2, ET.7,
AP.69, IAȘI, IS, RO;
• MAIER VASILICA, STR.FÂNTÂNILOR
NR.37, BL.B 2, ET.7, AP.69, IAȘI, IS, RO

(54) **PROCEDEU PENTRU IZOLAREA ȘI PURIFICAREA
VIOLACEINEI DESTINATE APLICAȚIILOR BIOMEDICALE,
DIN CULTURI DE *JANTHINOBACTERIUM LIVIDUM***

(57) Rezumat:

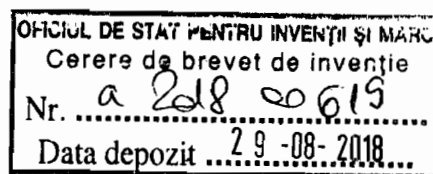
Invenția se referă la un procedeu pentru izolarea și purificarea violaceinei destinate aplicațiilor biomedicale. Procedeu conform invenției constă în cultivarea bacteriei *Janthinobacterium lividum* pe un mediu solid specific formulat, prelevarea biofilmului generat, separarea violaceinei în solvenți organici volatili, izolarea avansată prin sorbție pe substraturi anorganice inerte, purificarea primară și apoi avansată prin tehnici de

eluare cromatografică, aducerea violaceinei în faza organică hidrofilă, formularea opțională a fazei organice cu conținut de violaceină, utilizând compuși chimici de puritate farmaceutică, admiși de farmacopee și de organismele de reglementare, în funcție de aplicația vizată.

Revendicări: 12

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 pentru izolarea și purificarea violaceinei destinate aplicațiilor biomedicale, din culturi de *Janthinobacterium lividum*

Invenția se referă la un procedeu pentru izolarea și purificarea violaceinei destinate aplicațiilor biomedicale, caracterizat prin aceea că furnizează soluții înalt concentrate de violaceină în fază organică lichidă, avansat eliberate de compușii de însoțire non-indolici regăsiți în biofilmele generate prin cultivarea bacteriei *Janthinobacterium lividum* pe substraturi nutritive cu compoziție controlată, suplimentate cu triptofan. Respectivul soluții conțin violaceina individualizată la nivel molecular, alături de fracții net minoritare ale unor co-metaboliți indolici imediat înrudiți, fiind lipsite de cristale sau agregate supramoleculare rezultate în cursul purificării, fapt care îi asigură dispersarea rapidă și uniformă în medii apoase aglomerate macromolecular, inclusiv prin asocierea fizică la catenele și grupările laterale ale (bio)macromoleculilor, precum și difuzivitate și biodisponibilitate ridicate. **Violaceina obținută conform procedurii brevetat, precum și compozițiile rezultate ca urmare a asocierii acestora cu diverse specii (bio)macromoleculare, sunt destinate aplicațiilor din sfera biomedicală, fructificând activitatea sa antioxidantă, antimicrobiană, antitumorală, imunomodulatoare etc.** Formele intermediare, avansat dar incomplet purificate, rezultate conform procedurii, pot fi utilizate în cosmetică și dermato-cosmetică (drept antioxidanți, pentru ecranarea împotriva radiațiilor ultraviolete, ori ca agenți de nuanțare), iar formele reziduale dar încă bogate în violaceină și derivați ai acesteia sunt utilizabile ca pigmenți și fotostabilizatori de uz tehnic.

Violaceina este un metabolit secundar biosintetizat de o serie de bacterii Gram negativ, cu rol de inhibitor al dezvoltării speciilor bacteriene concurente, mai ales a celor de tip Gram pozitiv, când acestea din urmă tind să constituie colonii în mediul imediat apropiat. Ea asigură și protecția coloniilor bacteriene împotriva energiei radiante. Ca specie chimică, violaceina este un derivat di-indolic, cu caracteristici de nano-pigment insolubil în apă și în soluțiile apoase ale electroliților uzuali, atât mic-, cât și macro-

moleculari. Conform nomenclaturii IUPAC, ea este o (3E)-3-[5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-1,2-dihidro-3H-pirol-3-iliden]-1,3-dihidro-2H-indol-2-onă, cu masa moleculară de 343.336 Da. Bacteriile o biosintetizează pornind de la aminoacidul triptofan, sub controlul unui lanț alcătuit din cinci enzime specifice, codificate genetic, supus reglajului temporal și cantitativ prin mecanismele sensibilității la cvorum (Durán N., Justo G.Z., Durán M., Brocchi M., Cordi L., Tasic L., Castro G.R., Nakazato G., *Advances in Chromobacterium violaceum and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review*, *Biotechnology Advances*, 34, **2016**, 1030-1045). Drept urmare, randamentul biosintezei intracelulare și puritatea produsului ca specie moleculară sunt extrem de ridicate. Spre deosebire de situația în care bacteriile producătoare se dezvoltă spontan în mediul lor natural, în condițiile cultivării acestora pe medii cu compoziție controlată, calea de biosinteză deviază nesemnificativ în cadrul coloniilor și în timp, ceea ce face ca violaceina să fie însoțită doar de fracții infime de co-metaboliți indolici înrudiți, parazitari, cel mai adesea de forma sa redusă, deoxi-violaceina (care are aceleași caracteristici funcționale, dar este mai hidrofobă) și uneori de un tetra-indol, cromoviridanul (Hoshino T., *Violacein and related tryptophan metabolites produced by Chromobacterium violaceum: Biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, **2011**, 1463-1475).

Având caracteristici de nano-pigment, violaceina este un compus puternic hidrofob (și deci lipofil). Conform *PubChem Open Chemistry Database*, coeficientul de partiție octanol : apă calculat utilizând algoritmul *XLogP3-AA* este de 1,9 pentru violaceină și de 2,2 pentru deoxi-violaceină, la 25 °C. În contextul unei diferențe atât de mici a valorilor respectivului coeficient, separarea celor două specii de co-metaboliți este dificilă și, dacă aplicațiile vizate nu o impun cu stringență, se evită (Fang M.-Y., Zhang C., Yang S., Cui J.-Y., Jiang P.-X., Lou K., Wachi M., Xing X.-H., *High crude violacein production from glucose by Escherichia coli engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway*, *Microbial Cell Factories*, 14 (8), **2015**, DOI 10.1186/s12934-015-0192-x). În medii slab polare ori polare și cu constantă dielectrică mare, violaceina tinde să agrege supramolecular și să formeze dispersii la limita stabilității coloidale, care separă prin precipitare, în mod ireversibil, atunci când sunt supuse concentrării. Prin îndepărtarea solventului ori a mediului de dispersie, violaceina cristalizează. Precipitatele și cristalele uscate au culoare albastru-închis și punct de topire de peste 290 °C, fiind complet insolubile în medii apoase și dificil ori doar parțial solubile în faze organice, mai cu seamă în cele cu compoziții admise în aplicațiile biomedicale (pentru care se pot utiliza doar compuși biocompatibili

prevăzuți de Farmacopee, mai ales când aceștia au caracter hidrofob), la valori reduse ale temperaturii, care asigură evitarea denaturării speciilor biomacromoleculare. Din acest motiv, atunci când sunt vizate aplicații din sfera biomedicală și a cosmeceuticii care implică lucrul în medii apoase, se impune evitarea aducerii violaceinei în fază solidă, în cursul izolării și purificării acesteia.

Din punct de vedere taxonomic, specia *Janthinobacterium lividum* aparține încrengăturii *Proteobacteria*, clasa *beta-Proteobacteria*, familia *Oxalobacteraceae*, genul *Janthinobacterium* (Gillis M., Logan N.A., *Genus Janthiobacterium*, în *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume Two: *The Proteobacteria*, Part C: *The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*, Editori: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Springer Science Business Media Inc., New York, 2005, p. 636-642). *J. lividum* este strict aerobă (având nevoie de circa 20% oxigen molecular în microclimatul în care se cultivă), mezofilă (temperatura optimă pentru dezvoltarea în cultură este de 24 °C), osmotolerantă (suportă prezența sărurilor în mediul de cultură, dar numai în concentrații reduse) și nu sporulează (nu intră în stare de latență metabolică, respectiv în regim de rezistență la agresiunile mediului). Ca individ celular, *J. lividum* este un bacil flagelat, cu lungimea de $1,8 \div 6 \mu\text{m}$ și diametrul de $0,8 \div 1,5 \mu\text{m}$, lipsit de anvelopă capsulară individualizată, dar care produce un amestec de exopolizaharide, glicoproteine și glicolipide cu rol de liant al coloniei, care se constituie într-un pseudo biofilm. Se poate asocia în perechi sau în scurte lanțuri. Dezvoltă colonii la valori ale pH-ului între 7 și 8, iar sub pH 5 își sistează multiplicarea. Este chemoorganotrofă (necesită surse de carbon organic pentru a-și derula lanțurile metabolice energetice), preferând citratul și ionii de amoniu drept nutrienți primari. Se dezvoltă pe medii simple, cu peptonă și geloză, eventual solidificate cu agar și divers suplimentate. Fiind practic nepatogenă pentru adultul cu imunitate nealterată, cu *J. lividum* se poate lucra în condiții de biosecuritate de nivel 1. Pentru decontaminarea suprafețelor se poate utiliza alcoolul sanitar (prin pulverizare repetată și timp de contact de minimum 90 secunde), sau complexul de iod cu povidonă 10 % (prin tamponare unică și timp de contact de minimum 30 secunde). Instrumentarul și sticlăria se sterilizează prin autoclavare timp de 30 minute la 121 °C, sau, după spălarea cu tensioactivi neionogeni (0,3 % Triton X100) și clătire abundentă cu apă deionizată, prin expunere la radiația ultravioletă germicidă (240 – 280 nm), timp de minimum 120 minute, pe toate fațetele.

Atunci când cultivarea *J. lividum* se realizează în vederea producerii intensive a violaceinei, mediul de cultură trebuie suplimentat cu L-triptofan. În urma privării îndelungate de L-triptofan, bacteria sistează biosinteza de violaceină, noile sale colonii

devenind incolori. Suplimentarea cu ampicilină (în concentrație de circa 200 µg/mL) și cu glicerină (la un adaos de circa 1 %, sau ușor peste această valoare) accentuează producția de violaceină, în timp ce glucoza o limitează (Pantanella F., Berlutti F., Passariello C., Sarli S., Morea C., Schippa S., *Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum**, Journal of Applied Microbiology, 102, **2007**, 992-999). În prezența glucozei, indivizii de *J. lividum* ies din condiția metabolică de generare a biofilmului și capătă un comportament planctonic (se separă unii de alții și își limitează biosinteza de metaboliți secundari, pregătindu-se pentru a coloniza la distanță mediile la care au acces). Productivitatea biosintezei de violaceină pe care *J. lividum* o asigură și raportul nativ violaceină / deoxiviolaceină în biofilmul generat sunt suficient de ridicate pentru a permite lucrul la scară semiindustrială, beneficiind de faptul că bacteria se poate cultiva pe medii solide depuse în strat subțire, din care este aptă să valorifice cu randamente foarte ridicate compușii de suplimentare.

Din literatura de specialitate și din cea de brevete, este cunoscut faptul că violaceina este biosintetizată de bacteriile competente în cantitate direct proporțională cu adaosul de L-triptofan în mediul de cultură (Kothari V., Sharma S., Padia D., *Recent research advances on *Chromobacterium violaceum, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 10(8), **2017**, 744-752; Sebek O.K., *Microbiological method for the determination of L-tryptophan*, Journal of Bacteriology, 90 (4), **1965**, 1026-1031), că se regăsește preponderent sechestrată în membrana citoplasmatică a bacteriilor și doar parțial în (pseudo)biofilmul produs de colonii (uneori fiind asociată fizic cu polipeptide), că izolarea sa din respectivul biofilm se poate realiza prin preluare în solvenți organici (US Pat. No. 8883461B2 / **2014**, *Process for the production of violacein and its derivative deoxyviolacein containing bioactive pigment from *Chromobacterium* sp. (MTCC5522)*; US Pat. No. 8715754B2 / **2014**, *Chromobacterium bioactive compositions and metabolites*; Choi S.Y., Kim S., Lyuck S., Kim S.B., Mitchell R.J., *High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus**, Nature Scientific Reports, 5:15598 / **2015**, DOI: 10.1038/srep15598) și că poate fi purificată prin cromatografie în mediu de solvenți organici (Rodrigues A.L., Göcke Y., Bolten C., Brock N.L., Dickschat J.S., Wittmann C., *Microbial production of the drugs violacein and deoxyviolacein: analytical development and strain comparison*, Biotechnology Letters, 34, **2012**, 717-720; Shirata A., Tsukamoto T., Yasui H., Hata T., Haisaka S., Kojima A., Kato H., *Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing*, Japan Agricultural Research Quarterly, 34, **2000**, 131-140), iar la final poate fi supusă concentrării și precipitării (US**

Pat. No. US7901914 / 2011, *Microbiological method of the biosynthesis of natural blue-violet colorants violacein and deoxyviolacein and the utilization thereof*) pentru a o obține sub formă de cristale solide. **Dezavantajul** major al procedeelor deja cunoscute pentru obținerea violaceinei prin biosinteză rezidă în faptul că aduc nano-pigmentul sub formă de suspensie coloidală, de precipitat, ori de cristale solide. Pornind de la aceste forme violaceina nu poate reforma soluții la nivel molecular atunci când se dizolvă în medii apoase, iar dizolvarea sa în solvenți organici conduce la soluții care sunt fie nemiscibile cu mediile apoase, fie, din cauza solvenților, induc precipitarea ireversibilă și / sau denaturarea compușilor biomacromoleculari (în special a proteinelor) atunci când sunt dozate în soluții apoase aglomerate macromoleculare. În plus, solvenții organici capabili să dizolve violaceina solidă fie nu sunt biocompatibili, fie, dacă sunt miscibili cu apa, nu stabilizează nano-pigmentul în măsură suficientă pentru a-l menține în soluție după dozarea în medii apoase. Drept consecință, atunci când violaceina urmează a fi utilizată în aplicații biomedicale ori cosmetice, pornind de la forme solide ale acesteia nu se poate asigura o biodisponibilitate suficientă, iar supradozarea induce deficiențe majore, între care citotoxicitatea și costuri nejustificate, la randamente modeste de utilizare a produsului util, care nu este bio-activ sub formă de particule.

Problema pe care o rezolvă invenția este legată de obținerea, în condiții de lucru la nivel semiindustrial, a unor soluții concentrate de violaceină în fază organică, stabile perioade lungi de timp în stare individualizată la nivel molecular, fără tendință de insolubilizare prin asociere supramoleculară, cu evitarea aducerii nano-pigmentului în stare solidă (intenționat sau accidental) atât pe parcursul izolării și purificării, cât și în produsul final. Ca urmare a aplicării procedeului brevetat și în virtutea formulării ulterioare, soluțiile de violaceină în fază organică devin rapid și omogen dispersabile în soluții apoase ale (bio)macromoleculilor cu care se produc de regulă substraturi (solide și geluri) de interes biomedical, în ingineria tisulară, ori în cosmetică, asigurând atât instalarea efectelor biochimice și biologice specifice violaceinei ca specie moleculară, cât și o biodisponibilitate ridicată a nano-pigmentului în mediile biologice cu care substraturile citate vin în contact în cursul utilizării lor.

În principiu, procedeul pentru obținerea, izolarea și purificarea violaceinei destinate aplicațiilor biomedicale, din culturi de *Janthinobacterium lividum*, procedeu care face obiectul prezentei invenții, implică parcurgerea următoarelor etape, proiectate pentru a asigura reproductibilitatea compozițională a șarjelor, derulate toate în condiții de sterilitate și de curățenie conforme reglementărilor corespunzătoare aplicațiilor finale ale violaceinei:

- i. – revitalizarea bacteriilor, prepararea preinoculului și a inoculului;
- ii. – însămânțarea și cultivarea bacteriilor pe substrat solid;
- iii. – prelevarea biofilmului generat de colonii, la finalul biosintezei;
- iv. – separarea primară a violaceinei în solvenți organici volatili;
- v. – izolarea violaceinei în solvent organic nemiscibil cu apa;
- vi. – izolarea avansată a violaceinei după sorbția pe substrat anorganic inert;
- vii. – purificarea primară a violaceinei în soluții de solvenți organici volatili;
- viii. – purificarea avansată a violaceinei prin tehnici de eluare cromatografică;
- ix. – aducerea violaceinei purificate în fază organică nevolatilă, hidrofilă;
- x. – condiționarea, tipizarea și ambalarea violaceinei purificate.

În continuare se prezintă detaliile semnificative ale modului de conducere la scară semiindustrială a etapelor mai sus enumerate, respectiv pe un flux tehnologic prin a cărui parcurgere se asigură obținerea violaceinei în fază organică solubilă în soluții apoase, fază cu o concentrație finală de $800 \div 1200 \mu\text{g/mL}$ ($0,8 \div 1,2 \text{ g/L}$) violaceină. Toate operațiile care implică lucrul cu bacteria *Janthinobacterium lividum* se efectuează conform prescripțiilor nivelului de biosecuritate 1 (prevăzute în *Ghidul național de biosiguranță pentru laboratoarele medicale*, Ministerul Sănătății, România, 2005).

(i) Conform prezentei invenții, violaceina se obține prin biosinteză utilizând tulpina de referință ATCC 12473 a *Janthinobacterium lividum*, comercializată sub formă liofilizată. În vederea însămânțării pe mediul „de producție” liofilizat se rehidratează, apoi bacteriile se revitalizează urmând indicațiile ATCC. După două pasaje, din cultura inițială se prepară un preinocul lichid în care bacteriile sunt aduse în stare planctonică sub influența unui ușor exces D-(+)-glucoză, în concentrație de $1,0 \div 1,3 \%$ m/v. Preinoculul se cultivă apoi pe un mediu lichid lipsit de glucoză, cu un volum de 15 ÷ 30 ori mai mare, pentru a asigura diluarea glucozei și inițierea formării de colonii. Inoculul astfel rezultat se multiplică și se cultivă prin turnare locală multipunct (sub formă circulară, cu diametrul de 10 mm per spot) pe un mediu solid plan, sau pe mediu solidificat în godeurile unor plăci pentru culturi celulare.

(ii) Inoculul multiplicat se preia prin raclare cu anse calibrate și se suspendă sub agitare energetică în soluție Ringer sterilă, apoi se supune unei centrifugări moderate, pentru separarea porțiunilor de biofilm încă solide și pentru spargerea spumei. Supernatantul clar se diluează cu soluție Ringer, apoi se depune prin turnare uniformă pe suprafața mediului solid „de producție”, suplimentat adecvat.

(iii) După incubare și constituirea de colonii spațial continue pe suprafața mediului „de producție”, (pseudo)biofilmul aderent rezultat se supune spălării, repetat,

prin pulverizare și scurgere, succesiv, cu soluția unui agent chaotrop în tampon fosfat salin, cu soluția unui agent de fixare – reticulare și cu o soluție apoasă de polietilen-glicol. Scopul spălărilor este de a afâna biofilmul și apoi de a-l consolida în stare afânată (permițând astfel contra-difuzia rapidă a violaceinei în solvent), în paralel cu o ușoară fixare citologică a peretelui celular al indivizilor de *J. lividum*. Prin respectiva fixare se limitează eliberarea lipopolizaharidelor (cu acțiune pirogenică) din peretele celular al speciei bacteriene Gram negativ. Tratamentul final de spălare cu etilen-glicol are rolul de a temporiza difuzia ulterioară a solventilor în biofilmul afânat, cu efect asupra constanței randamentului și reproductibilității extragerii violaceinei. În continuare, pe suprafața biofilmului se pulverizează alcool etilic 96 %, iar după ce biofilmul începe să se contracte, vasul în care s-a realizat cultivarea se inundă cu alcool etilic 70 %, în vederea labilizării biofilmului și desprinderii acestuia de pe substratul solid. Biofilmul labilizat se prelevă prin raclare și se colectează pe suprafața unui filtru sită din oțel inoxidabil, recuperând soluția alcoolică scursă.

(iv) După zvântarea pe filtrul sită, porțiunile de biofilm se preiau și se omogenizează prin agitare energetică în alcool etilic 96 %. În continuare, prin operații alternante de maturare statică și vortexare, repetate, violaceina este extrasă în alcool. Suspensia rezultată se filtrează, iar supernatantul se supune centrifugării, pentru eliminarea fracției solide. Lichidul separat se răcește la -40 °C, iar apoi se trece, cu recirculare, peste un grupaj de filtre sită metalice (din oțel inoxidabil) dense, răcite în prealabil până la circa -60 °C, prin parcurgere cu azot lichid. În acest mod se asigură reținerea avansată a fracțiilor lipidice pe care alcoolul le-a dizolvat din biofilm. Soluția alcoolică se diluează apoi, sub agitare lentă, cu o soluție salină, se maturează la temperatura ambiantă, după care se fierbe sub reflux pentru a induce un efect dublu, de hidroliză parțială și coagulare / precipitare a compușilor oligomeri (polipeptide și polizaharide) extrași din biofilm. După răcire, lichidul se supune centrifugării, reținând supernatantul.

(v) Peste soluția hidroalcoolică obținută se adaugă un volum egal de solvent nemiscibil cu apa, iar amestecul se agită energetic, pentru a realiza transferul violaceinei în faza hidrofobă. Apoi, alcoolul etilic și compușii hidrosolubili se îndepărtează treptat, prin repetarea operațiilor de emulsionare cu apă și separare a fazelor, reținând de fiecare dată faza hidrofobă.

(vi) Soluția de violaceină în solvent organic se adsoarbe apoi pe un sorbent inert, iar pasta rezultată se usucă prin evaporare sub vid. În mod repetat, evaporarea sub vid se alternează cu măcinarea solidului, pentru a asigura îndepărtarea avansată a

solventului. Șirul operațiilor se încheie atunci când, după măcinare, se obține o pulbere aparent perfect uscată. Particulele de sorbent rețin însă în porii lor soluție înalt concentrată de violaceină în solventul hidrofob.

(vii) Pulberea de sorbent încărcat cu soluție de violaceină se introduce, ca strat superior, într-o coloană de separare în care, în etajele inferioare, s-au depus straturi de sorbent cu granulație crescătoare spre ieșirea din coloană, iar ca penultim strat parcurs de eluent, o fază solidă pentru cromatografia prin excludere dimensională. Straturile se separă între ele prin tronsoane din „vată de sticlă”. Toate straturile inferioare se umectează cu un solvent volatil, miscibil cu cel hidrofob (spre exemplu alcool 96 %), înainte de adăugarea stratului superior uscat. Coloana se eluează cu același solvent volatil, colectând eluentul până când concentrația acestuia în violaceină scade sub un prag impus. Preluarea violaceinei în eluent se face prin echilibre între cele două faze lichide, cea a solventului hidrofob și cea a solventului volatil, fapt care se reflectă într-o cinetică lentă a procesului și în nevoia de a se lucra cu volume mari de eluent. De aceea, la final, eluatul se concentrează prin evaporare controlată, recuperând solventul volatil. Opțional, în vederea epurării violaceinei din straturile de sorbent, se poate lucra cu o serie succesivă de solvenți volatili, miscibili între ei și cu solventul hidrofob.

(viii) Atunci când se impune o purificare suplimentară, soluției concentrate i se aplică o a doua separare cromatografică prin excludere dimensională („cernere” moleculară), utilizând coloane preparative cu umplutură stabilă în solvenți organici miscibili cu apa sau, dimpotrivă, hidrofobi, umplutură aptă să separe compuși cu mase moleculare mai mici decât 1000 Da. Eluarea se realizează cu același solvent volatil. La final eluatul se supune concentrării, cu recuperarea solventului evaporat.

(ix) Pentru a-i asigura violaceinei o dispersare rapidă în medii apoase aglomerate macromoleculare, precum și pentru a evita efectele nedorite atunci când soluția de violaceină în solvent organic se dozează în respectivele medii (mai ales precipitarea ori denaturarea proteinelor), după purificare, soluția concentrată în solvent volatil se aduce într-o fază organică alcătuită dintr-un solvent oligomer lichid, solubil în medii apoase indiferent de prezența în acestea din urmă a speciilor (bio)macromoleculare ori a electroliților. În solventul oligomer se pot adăuga adjuvanți destinați stabilizării violaceinei la nivel molecular (emulgatori). Volumul solventului oligomer lichid va fi minim în raport cu soluția de violaceină în solventul volatil. După perfectă omogenizare a celor două soluții (violaceina în solvent organic volatil și respectiv solventul oligomer), amestecul se supune evaporării controlate, pentru eliminarea solventului volatil.

(x) Funcție de aplicațiile vizate, faza organică în care se regăsește violaceina poate fi formulată pentru a induce unul dintre următoarele efecte: (i) formarea de emulsii cu tușeu variabil, stabile la dizolvarea în medii apoase, ori care se separă la variații ale temperaturii sau compoziției, (ii) sorbția rapidă în substraturi poroase uscate sau umede și formarea de manșoane ori de microfilme la suprafața elementelor morfologice ale substraturilor, (iii) inducerea unei precipitări controlate odată cu diluarea în soluții ale electroliților, (iv) promovarea unor echilibre de repartiție între faze condiționat miscibile, capabile să separe la atingerea unor praguri ale parametrilor de lucru. Fie formulată sau nu, faza organică lichidă se supune condiționării (prin dozare de coloizi protectori și agenți stabilizatori față de variațiile pH-ului sau potențialului red-ox), tipizării (prin ajustarea concentrației tuturor componentelor) și dozării / ambalării în flacoane cu volume adaptate viitoarelor aplicații, de preferat în condiții sterile. Stocarea produsului final se realizează în flacoane din sticlă brună, închise ermetic.

Procedul pentru izolarea și purificarea violaceinei destinate aplicațiilor biomedicale, conform prezentei invenții, prezintă următoarele avantaje:

- asigură menținerea violaceinei în stare individualizată la nivel molecular, în fază lichidă, pe întreg parcursul fluxului operațiilor de izolare, purificare și post-procesare, evitând precipitarea ori cristalizarea acesteia;
- asigură aducerea și stocarea violaceinei în fază organică miscibilă cu soluțiile apoase și lipsită de potențial precipitant ori denaturant în raport cu speciile (bio)macromoleculare din mediul apos;
- asigură dispersarea rapidă a violaceinei în sisteme apoase, fără precipitarea acesteia, cu precădere în medii aglomerate (bio)macromoleculare;
- asigură concentrații ale violaceinei în faza organică de peste 800 mg/L;
- permite pre-formularea compoziției fazei organice lichide funcție de natura aplicațiilor vizate, din sfera bio-medicală și a cosmeceuticii;
- asigură menținerea caracteristicilor produsului final pentru durate de stocare practic nelimitate, la temperatura ambiantă ($10 \div 40$ °C), în flacoane din sticlă brună, închise ermetic;
- asigură randamente masice de extracție de circa 86 % (calculat prin raportare la conținutul de violaceină din reziduu de biofilm procesat în etapa (iii), măsurat după hidroliza acidă completă a respectivului reziduu, precum și funcție de pierderile din etapele (iv) și (v)) și randamente de izolare după purificare de peste 82 % (raportat la pierderile masice înregistrate în etapele

(vi), (vii) și (viii)), deci randamente globale de circa 70 % (în condiții de pilot semiindustrial).

În cele ce urmează, se prezintă exemple de conducere a etapelor și operațiilor de obținere, izolare, purificare și condiționare a violaceinei adusă în fază organică lichidă, conform invenției. Descrierile de mai jos au titlu exemplificativ din următoarele puncte de vedere:

- tulpina de *Janthinobacterium lividum* utilizată pentru biosinteza violaceinei;
- compoziția mediilor pe care bacteria se cultivă în diversele etape ale procesului;
- natura solvenților organici volatili și nevolatili utilizați în proces;
- natura și caracteristicile fazelor solide utilizate în etapele de purificare;
- natura și concentrațiile compușilor (bio)chimici mic-moleculari utilizați în oricare dintre operațiile procesului;
- rapoartele de amestecare și diluare utilizate în oricare dintre operațiile de obținere, izolare, purificare și formulare / tipizare a violaceinei;
- parametrii fizico-chimici de lucru și compozițiile chimice implicate în oricare dintre etapele procesului;
- natura, numărul și succesiunea operațiilor unitare din cadrul etapelor generice ale procesului;
- echipamentele, instalațiile și dispozitivele utilizate pentru obținerea, izolarea, purificarea și formularea / tipizarea violaceinei adusă în fază organică, în oricare dintre etapele procesului;
- natura și concentrațiile speciilor chimice adjuvante și a materialelor implicate în formularea compozițiilor soluțiilor de violaceină în fază organică;
- modul de pregătire în vederea stocării și modul de stocare a soluțiilor de violaceină în fază organică, obținute conform invenției;
- denumirile atribuite etapelor, operațiilor și proceselor descrise în invenție.

Acolo unde nu se specifică în mod expres, operațiile se efectuează la temperatura ambientală, care nu va depăși însă plaja 15 ± 30 °C. Apa utilizată pentru prepararea soluțiilor și a mediilor apoase de tratare este dublu distilată sau deionizată până la conductivități de cel mult $1 \mu\text{S}$ (ISO 3696:1987), sterilă și liberă de pirogeni (conform Farmacopeei Europene, sortimentul Apă pentru preparate injectabile). Toate soluțiile și toți reactivii lichizi se supun sterilizării prin filtrare, cu excepția celor care se pot steriliza în autoclavă și a celor potențial ne-infectabili.

Exemplul 1 – Compozițiile mediilor pentru cultivarea bacteriei *Janthinobacterium lividum*, în diversele etape, conform invenției

Tabelul următor descrie compozițiile mediilor optimizate pentru lucrul cu bacteria *Janthinobacterium lividum*, în etapele de preparare a preinoculului și inoculului, precum și în cele de cultivare în scop de multiplicare a coloniilor (de menținere în cultură) și de „producție” a violaceinei.

Tabelul 1. Compozițiile mediilor de cultură pentru lucrul cu *JANTHINOBACTERIUM LIVIDUM*.

Mediul	Componenta	Concentrația	Rolul în compoziția mediului
Preparare preinocul	Peptonă peptică	1,20 g/L	Reprezintă mediul „de bază”. Se suplimentează cu:
	Extract din drojdie	1,00 g/L	
	Glicerină anhidră	0,60 mL/L	Sursă primară de carbon.
	Bicarbonat de amoniu	0,45 g/L	Sursă primară de azot.
	Amidon din porumb	0,30 g/L	Component pentru reglarea vâscozității mediului.
	Glucoză din amidon	10,00 g/L	Agent pentru destructurarea coloniilor și individualizarea bacteriilor în mediu lichid.
Preparare inocul	Peptonă peptică	1,20 g/L	Reprezintă mediul „de bază”. Se suplimentează cu:
	Extract din drojdie	1,00 g/L	
	Glicerină anhidră	2,00 mL/L	Sursă primară de carbon.
	Citrat de sodiu tribazic	1,00 g/L	Sursă de carbon secundară.
	Citrat de amoniu tribazic	0,50 g/L	Sursă de carbon secundară.
	Clorhidrat de tiamină	0,01 g/L	Mediator metabolic.
De multiplicare	Agar	15,00 g/L	Reprezintă mediul „de bază”. Se suplimentează cu:
	Peptonă peptică	5,00 g/L	
	Clorură de sodiu	5,00 g/L	
	Extract din drojdie	1,50 g/L	Aport de polipeptide.
	Peptonă din cazeină	3,00 g/L	Sursă primară de carbon.
	Glicerină anhidră	1,00 mL/L	Premetabolit pentru piruvat.
	D-(+)-glucoză	0,35 g/L	Sursă de carbon secundară.
	Succinat de sodiu anhidru	0,25 g/L	Sursă alternativă de carbon.
Piruvat de sodiu	0,20 g/L		
De „producție”	Agar	12,00 g/L	Reprezintă mediul „de bază”. Se suplimentează cu:
	Peptonă peptică	5,00 g/L	
	Clorură de sodiu	5,00 g/L	
	Extract din drojdie	3,00 g/L	
	Tampon HEPES	15 mL/L, sol. 1M	Tamponarea pH-ului la 7,4.
	Peptonă din cazeină	3,00 g/L	Aport de polipeptide.
	Glicerină anhidră	4,00 mL/L	Sursă primară de carbon.
	Citrat de sodiu tribazic	1,35 g/L	Sursă de carbon secundară.
	Citrat de amoniu tribazic	0,45 g/L	Sursă de carbon secundară.
	Piruvat de sodiu	0,40 g/L	Sursă alternativă de carbon.
	L-triptofan	0,40 g/L	Precursor cu ciclu indolic.
	Lecitină lichidă din soia	0,35 mL/L	Emulgator al N-C8-HSL.
	N-C8-HSL (vezi nota)	0,01 g/L	Potențiator de cvorum.
Clorhidrat de tiamină	0,01 g/L	Mediator metabolic.	

Notă: N-C8-HSL este acronimul N-octanoil-L-homoserin-lactonei (CAS 147852-84-4).

Cele două medii lichide (pentru prepararea preinoculului și inoculului) se aduc la pH 7,0 ÷ 7,2 înainte de utilizare.

Exemplul 2 – Prepararea preinoculului și inoculului cu *Janthinobacterium lividum*

Se pornește de la colonii de *Janthinobacterium lividum* (ATCC 12473) revitalizate și consolidate metabolic prin cultivare în minimum două pasaje, procesate conform prescripțiilor ATCC. Pentru aducerea bacteriilor în stare planctonică, se preiau, prin raclare cu ansa sterilă, 12 ÷ 18 colonii bine definite și se introduc în flacoane sterile. Se adaugă 1,2 ÷ 5 mL mediu de cultură pentru prepararea preinoculului (cu compoziția descrisă în Tabelul 1) și se omogenizează prin agitare / vortexare, apoi se incubează la 25 °C timp de 12 ore, cu agitare periodică. Suspensia grosieră se centrifughează la 100·g timp de 10 ÷ 15 minute, iar supernatantul se incubează alte 12 ore, în aceleași condiții. În continuare, se prelevă probe pentru numărarea celulelor, iar suspensia se stochează la temperatura ambiantă, pentru cel mult 12 ore.

După o nouă centrifugare la 100·g, supernatantul se transferă într-un volum de 15 ÷ 30 de ori mai mare de mediu pentru prepararea inoculului (cu compoziția descrisă în Tabelul 1), se omogenizează prin agitare lentă și apoi se incubează timp de 24 ore, la 24 °C, în flux de aer steril. După prelevarea de probe pentru numărarea celulelor, suspensia se diluează 1 : 1 cu soluție Ringer și se partiționează în volume adaptate etapei de cultivare a bacteriei pe medii solide, volume care se introduc în flacoane sterile, închise etanș, ce se pot stoca la temperatura ambiantă cel mult 12 ore.

Exemplul 3 – Multiplicarea preliminară a coloniilor de *Janthinobacterium lividum*

În vederea consolidării potențialului de proliferare al bacteriei, inoculul se însămânțează prin turnare pe mediu solid pentru multiplicare (cu compoziția descrisă în Tabelul 1), deșus în godeurile unor plăci pentru cultivarea celulelor, cu 6 x 4 cavități. Plăcile se mențin în incubator cu flux de aer steril, umidificat, la temperatura de 24 °C, timp de 36 ÷ 72 ore, respectiv până când mediul de cultivare din fiecare cavitate se acoperă uniform cu o colonie bacteriană ferm aderentă la substrat. În vederea desprinderii de substrat a coloniilor, acestea se pulverizează cu o soluție Ringer cu adaos de 1 ÷ 5 % polietilen glicol 400 de uz farmaceutic (CAS 25322-68-3), care se scurge după umectarea uniformă a coloniei. Pulverizarea se repetă de două până la patru ori cu soluție Ringer neaditivată, pentru timpi scurți, iar apoi coloniile se zvântă în incubator, timp de 15 ÷ 30 minute. În această stare, coloniile de inocul multiplicat nu se pot stoca, ci trebuie procesate rapid.

Exemplul 4 – Însămânțarea și cultivarea bacteriilor pe mediu solid de „producție”

Coloniile de inocul multiplicat se preiau prin raclare cu anșa sterilă din cele 24 de cavități ale fiecărei plăcii de cultivare și se suspendă grupat (câte 24) în flacoane sterile pentru centrifugare, cu volumul de 15 mL, în 5 ÷ 10 mL soluție Ringer sterilă, se vortexează și apoi suspensia se centrifughează la 120-g, timp de 15 ÷ 30 minute, până la separarea eficientă a debriurilor de biofilm. După prelevarea de probe pentru numărarea celulelor, supernatantul clar se diluează de 5 ÷ 8 ori cu soluție Ringer sterilă, apoi se depune prin turnare uniformă pe suprafața mediului de „producție” (cu compoziția descrisă în Tabelul 1), solidificat în tăvi din sticlă cu aria de 600 ÷ 900 cm². Fiecărei plăci în care inoculul s-a multiplicat îi va corespunde o tavă.

Cultivarea pe mediul de „producție” se derulează pe durata a 3 ÷ 5 zile, în incubator cu flux de aer steril și umidificat, la o temperatură de 24 °C, urmărind formarea și consolidarea unei colonii extinse, uniforme ca distribuție și grosime. La final, din fiecare tavă din sticlă se prelevă câte cinci probe de colonie aderentă la mediu, fiecare cu aria de 1 cm², distribuite aleator pe suprafața cultivată, ce vor fi utilizate pentru numărarea celulelor și pentru validarea constanței fenotipice și genotipice a bacteriei. Totodată se verifică și neinfecțarea coloniei cu alte specii de microorganisme.

Exemplul 5 – Prelevarea biofilmului generat de coloniile bacteriene

Biofilmul rezultat pe suprafața mediului de „producție”, la finalul perioadei de incubare, se supune afânării și consolidării prin pulverizarea și spălarea / scurgerea succesivă cu următoarele compoziții lichide, aplicate și îndepărtate rapid, de 3 ÷ 6 ori fiecare: (i) soluția unui compus cu acțiune chaotropă (1,2 ÷ 2,6 M perclorat de amoniu, 1,8 ÷ 3,0 M iodură de tetrametilamoniu, sau 2 ÷ 5 M clorhidrat de guanidină) în tampon fosfat salin cu pH-ul de 7,2 unități și tăria ionică de 3,8 ÷ 4,6 mMol/L; (ii) o soluție pentru fixarea - reticularea componentelor biofilmului în stare afânată (1,0 ÷ 2,5 % aldehydă glutarică, sau 0,6 ÷ 1,2 % glioxal în tampon fosfat salin cu pH 7,4, eventual suplimentar cu o soluție de 6 ÷ 12 % trimetafosfat de sodiu); (iii) o soluție de 1 ÷ 5 % polietilen glicol 600 în soluție Ringer sterilă. Imediat după ultima spălare, suprafața biofilmului se pulverizează abundant cu alcool etilic 96 %, iar după 3 ÷ 5 minute colonia bacteriană se inundă cu o soluție diluată de alcool etilic (30 ÷ 70 %), sub agitare lentă prin unduire, timp de 10 ÷ 30 minute, până la reducerea semnificativă a aderenței biofilmului la substrat. Apoi, soluția alcoolică se scurge (și se recuperează) iar biofilmul se preia prin raclare și se depune pe un filtru sită din oțel inoxidabil, în vederea scurgerii.

Exemplul 6 – Separarea primară a violaceinei din biofilmul prelevat

Porțiunile de biofilm raclate se introduc într-un vas înalt din sticlă, cu pereții groși, iar apoi se acoperă cu alcool etilic 96 % și se maturează la temperatura ambiantă timp de 30 ÷ 120 minute. În continuare, suspensiei de biofilm în alcool i se aplică operații de vortexare (la 12.000 ÷ 20.000 rotații pe minut, timp de 3 ÷ 15 minute) în tandem cu maturări statice (la temperatura ambiantă, timp de 30 ÷ 60 minute), repetate de 5 ÷ 12 ori, menținând constant volumul prin eventuale adaosuri de alcool. După ultima maturare din serie, suspensia se supune centrifugării la cel puțin 3000·g, timp de 15 ÷ 45 minute, reținând supernatantul. Acesta din urmă se răcește la -25 ÷ -40 °C, iar apoi se filtrează, cu recirculare de 10 ÷ 15 ori, prin filtre sită din oțel inoxidabil (tip 316L) cu ochiuri de 5 ÷ 20 microni, înseriate câte zece, cu spațiere de 3 ÷ 15 mm, subrăcite la circa -60 °C prin parcurgere cu azot lichid. Frația semisolidă / păstoasă rămasă pe site se elimină prin parcurgere cu alcool etilic, după ce grupajul de filtre a ajuns la temperatura ambiantă. Filtratul alcoolic se diluează apoi 3 : 1, sub agitare lentă, cu o soluție apoasă de 0,05 ÷ 0,1 N citrat trisodic și 0,3 ÷ 1 M NaCl. Amestecul se menține 30 ÷ 60 minute sub agitare, la temperatura ambiantă. Lichidul se supune apoi fierberii sub reflux, timp de 3 ÷ 6 ore, iar la final se evaporă până la o treime din volumul inițial. După răcire, suspensia se filtrează prin filtre cu porozitatea de 0,42 microni, din nylon.

Exemplul 7 – Izolarea violaceinei în solvent organic nemiscibil cu apa

În vederea transferării cu bune randamente a violaceinei într-un solvent hidrofob, soluția alcoolică se aduce în contact cu un volum egal de 1-octanol, hexan, ciclohexan, tetraclorură de carbon, cloroform, clorură de metilen, ori acetat de etil, sub agitare energetică (prin vortexare la 12.000 ÷ 20.000 rotații pe minut, timp de 3 ÷ 15 minute). După spargerea emulsiei formate, decantare și scurgerea fazei apoase, peste faza organică se adaugă un volum dublu de apă încălzită la 50 ÷ 90 °C (funcție de solventul organic utilizat) și se repetă emulsionarea, de 3 ÷ 9 ori, prin vortexare în aceleași condiții, reținând de fiecare dată faza hidrofobă. La final, soluția de violaceină în solvent organic nemiscibil cu apa se fierbe sub reflux (exceptând soluția în octanol, care se încălzește la 95 °C), timp de 20 ÷ 60 minute. Soluția răcită se filtrează apoi prin filtre sită din oțel inoxidabil (tip 316L), cu ochiuri de circa 5 microni (500 ÷ 600 nm), pentru reținerea completă a urmelor de apă. Soluția finală se poate stoca timp nelimitat, la temperatura ambiantă, în flacoane din sticlă închise ermetic. În momentul deschiderii flacoanelor se iau măsurile de precauție la lucrul cu solvenți volatili, potențial inflamabili.

Exemplul 8 – Izolarea avansată a violaceinei prin sorbție pe substrat solid inert

Soluția de violaceină în solvent organic nemiscibil cu apa se amestecă, în porții, cu un sorbent solid inert calcinat, de preferință (micro)particule poroase de dioxid de siliciu, până la obținerea unei paste înalt vâscoase. De preferat, sorbentul va avea granulația de $6 \div 10$ microni, permeabilitatea în strat umed de $0,1 \div 0,3$ Darcy, iar plaja dimensiunilor particulelor reținute de $0,5 \div 1,2$ microni (spre exemplu sortimentele Celite Filter Cel, sau Celite Standard Super-Cel). Pasta rezultată se supune apoi evaporării excesului de solvent (uscării), în etape, mai întâi în flux de aer steril, la temperatura ambiantă, apoi la o temperatură cu circa $5 \div 10$ °C sub cea de volatilizare a solventului (cu excepția 1-octanolului, care se usucă la $100 \div 105$ °C), iar în final la temperatura ambiantă, sub vid moderat ($50 \div 300$ Pa = $0,5 \div 3$ mili bar), până la îndepărtarea mirosului specific solventului. După încheierea fiecărei etape, masa de sorbent se supune măcinării pentru a o aduce la stare microgranulară.

Exemplul 9 – Purificarea violaceinei prin eluare cu solvenți organici volatili

Readucerea violaceinei în fază organică lichidă volumică se realizează eluând-o din sorbent cu solvenți organici volatili, miscibili cu apa (alcool etilic, acetonă, dioxan, tetrahidrofuran, dimetilsulfoxid), sau nu (cloroform, 1-octanol, 1-hexanol, acetat de etil). Eluarea se realizează de pe și prin umplutura stratificată, introdusă în coloane din sticlă înalte (de circa $1,0 \div 1,8$ m), prevăzute cu manta pentru termostatare. Dinspre partea superioară către cea inferioară a coloanelor, stratificarea umpluturii se realizează astfel: (i) stratul de sorbent încărcat cu violaceină, în stare uscată, (ii) un strat tampon, realizat din același sorbent, umectat cu un fluid cu permeare lentă (polietilenglicol 400 sau 600, glicerină, fructo- sau galacto-oligozaharide, lecitină), ales funcție de solventul cu rol de eluent, (iii) un strat de sorbent cu permeabilitate triplă (măsurată în Darcy) comparativ cu sorbentul încărcat cu violaceină (de exemplu Celite Hyflo Super-Cel), (iv) un strat de umplutură destinată cromatografiei în fază inversată, ales funcție de solventul eluent utilizat (de exemplu MCI Gel CHP20P, Sephadex LH-20, sau Sepabeads SP-20SS), (v) un strat de sorbent cu permeabilitatea de $1,5 \div 4$ Darcy (cum ar fi sortimentele Celite 503, 535, sau 545). Ponderea straturilor în înălțimea utilă a coloanei depinde de natura solventului eluent, putând fi, de exemplu, de $3 : 1 : 3 : 5 : 3$, în cazul alcoolului etilic. Înălțimea straturilor (ii) + (v) se reglează utilizând umplutura umectată cu solventul eluent și tasată pentru compactare și planeizarea suprafețelor de separare. Între straturi se introduc separatoare din „vată de sticlă” compactată între site metalice inoxidabile.

Rolul separatoarelor este de a permite vizualizarea intensității colorației solventului eluent, dată de concentrația sa în violaceină. După formarea straturilor în coloană, aceasta se termostatează prin manta la o temperatură de $40 \div 80$ °C, funcție de natura solventului eluent, de cea a compusului din stratul tampon și de caracteristicile umpluturii din stratul (iv), evitându-se formarea de bule sau perne de gaz. În continuare, coloana se închide ermetic la partea superioară și apoi se alimentează cu solventul eluent, la un debit de $1 \div 15$ mL/minut, funcție de aria secțiunii și de permeabilitatea stratului cu cea mai mică valoare Darcy (de regulă cel superior și următorul), sub o presiune de $30 \div 80$ kPa ($1,3 \div 1,8$ bar). Eluatul se colectează fracționat funcție de prezența și concentrația violaceinei, concentrație stabilită utilizând ecuații de calibrare asociate fiecărui solvent eluent. Pentru epuizarea straturilor de umplură ale coloanei, se poate utiliza o serie succesivă de eluenți miscibili între ei și compatibili cu umplutura stratului (iv). Umplutura epuizată nu se poate refolosi. La final, fracțiile de eluat cu conținut semnificativ de violaceină se reunesc și se supun concentrării prin evaporare controlată, până la o concentrație de $0,1 \div 0,6$ % a violaceinei, recuperând solventul. Fracțiile ce includ compușii din stratul de umplură tampon se îndepărtează.

Exemplul 10 – Purificarea avansată a violaceinei, prin tehnici cromatografice

Pentru aducerea violaceinei la puritatea impusă de aplicațiile biomedicale, soluția rezultată după preluarea sa de pe sorbentul inert se supune purificării cromatografice, în vederea îndepărtării compușilor parazitari non-indolici. În acest scop, se recurge la cromatografia preparativă prin excludere dimensională în mediu ne-apos, pe coloane metalice având diametrul de 50 mm și lungimea de 300 mm, cu umpluturi adaptate solventului eluent (spre exemplu Shodex KF-5001, pentru eluare cu solvenți miscibili cu apa, respectiv Shodex K-5001, pentru eluarea cu solvenți hidrofobi). Parametrii de operare ai colanelor sunt cei uzuali în cromatografia preparativă HPSEC în mediu ne-apos, respectiv debitul de eluare $2 \div 4$ mL/min, presiunea $1,2 \div 1,6$ MPa, temperatura de lucru 40 °C. Eluarea se realizează cu solventul volatil în care se află deja violaceina. Profilul concentrației violaceinei la ieșirea din coloană se urmărește spectrofotometric și se rețin fracțiile eluate care au absorbanta maximă la 556 nm (cu mici variații, funcție de solvent). Coloana se operează în regim de injectare multiplă a soluției inițiale, supuse separării. După fiecare separare individuală ea se eluează cu compoziția recomandată de producător („se spală”), iar apoi se purifică („se clătește”) utilizând solventul volatil cu rol de eluent al violaceinei, degazat. Doza de soluție de violaceină injectată repetat se stabilește funcție de parametrii momentani ai umpluturii și de natura solventului eluent.

Exemplul 11 – Aducerea violaceinei în fază organică nevolatilă, hidrofilă

Ca produs final al procedurii, violaceina se aduce în fază organică nevolatilă la temperaturile de utilizare ($20 \div 90$ °C), solubilă în apă și miscibilă cu soluții apoase ale electroliților și speciilor (bio)macromoleculare. Exemplele tipice pentru respectiva fază („lichidul gazdă”) sunt poli(etilen-glicolul) (cu mase moleculare medii de $400 \div 600$ Da, respectiv cu grade de polimerizare în plaja $8 \div 14$) și glicerina, ambele specii fiind biocompatibile, iar pentru aplicații cosmetice se poate utiliza poli(glicerolul) de puritate farmaceutică (lipsit de compuși ciclici), precum și esteri și/sau copolimeri ai acestuia. Aducerea într-o astfel de fază se realizează amestecând și omogenizând soluția de violaceină purificată, aflată în solvent organic volatil, cu „lichidul gazdă”, în rapoarte de amestecare stabilite funcție de concentrația violaceinei în soluția de start și respectiv de cea în produsul final. Pentru a atinge concentrațiile impuse în produsul final (de ordinul sutelor de miligrame per litru), soluția inițială se supune mai întâi concentrării prin evaporarea controlată a solventului volatil, sub vid moderat. După omogenizarea în „lichidul gazdă”, amestecul se supune evaporării controlate, în evaporator rotativ, sub vid moderat, respectând regula „20 / 40 / 60”, pentru eliminarea solventului volatil. Regula menționată se aplică astfel: termostatănd baia de evaporare la 60 °C și lichidul recirculat prin condensator la 20 °C, depresiunea în instalație se reglează astfel încât solventul volatil să fiarbă la 40 °C. Aplicând această regulă, este posibilă eliminarea avansată a solvenților volatili indiferent dacă amestecurile supuse evaporării sunt zeotrope sau azeotrope, fără evaporarea concomitentă a unor cantități semnificative de „lichid gazdă”. Regula nu este însă valabilă și în cazul alcoolilor superiori (1-octanol și 1-hexanol) și dioxanului. Pentru acești solvenți, amestecul se supune evaporării sub flux de aer steril, la 105 °C și presiune atmosferică, iar eliminarea completă nu este posibilă. Presiunile reglate în evaporatorul rotativ vor avea următoarele valori: 556 mbar pentru acetonă, 175 mbar pentru alcoolul etilic, 474 mbar pentru cloroform, 107 mbar pentru dioxan, 357 mbar pentru tetrahidrofuran și 240 mbar pentru acetat de etil. După încheierea evaporării solvenților organici, presiunea în evaporatorul rotativ se aduce la 72 mbar, timp de $60 \div 90$ minute, pentru eliminarea urmelor de apă. La final, faza organică încărcată cu violaceină se preia rapid într-un recipient care se închide ermetic.

Exemplul 12 – Condiționarea, tipizarea și ambalarea produsului final

Operațiile de condiționare și tipizare sunt opționale, dar atunci când se aplică vizează aducerea produsului final la exigențele utilizării sale în aplicații biomedicale. În

acest sens, compoziția fazei organice se suplimentează, pe parcursul evaporării sub vid a solventului volatil, cu specii chimice selectate dintre cele biocompatibile și acceptate de farmacopeea europeană. Formularea amestecului se face în mod particularizat, prin adăugarea unuia sau mai multor compuși amfoteri (cu HLB în plaja $6 \div 15$), aparținând următoarelor clase: emulgatori, coloizi protectori, stabilizatori. Condiția minimală impusă compușilor de suplimentare este de a nu induce precipitarea ori cristalizarea violaceinei și/sau izolarea acesteia prin încapsulare ireversibilă, fie în „lichidul gazdă”, fie în mediul apos în care produsul va fi utilizat. În plus, compușii de suplimentare nu trebuie să conducă la diminuarea stabilității de fază a amestecului, în stare concentrată, sau după diluarea sa în mediul apos de lucru. Spre exemplu, drept emulgatori se pot utiliza fosfolipidele și derivați ai acestora (fosfatidil-colina, lizo-fosfatidil-colina) ($0,03 \div 0,12$ %), glicozide modificate chimic ($0,05 \div 0,1$ %), ori chiar esteri ai glicerinei cu acizi grași ($0,01 \div 0,06$ %). Drept coloizi protectori se pot utiliza (co)polimeri sintetici funcționalizați (acid acril-amido-metilpropan sulfonic) ($0,01 - 0,1$ %), sau poli(izobutena) hidrogenată ($0,03 \div 0,15$ %). În calitate de stabilizatori se pot utiliza conjugate PEG-vitamina E (D-alfa-tocoferil-poli(etilen glicol) succinat) ($0,01 \div 0,06$ %), esteri ai sucrozei (circa $0,1$ %), sau ciclodextrină și derivați ai acesteia ($0,05 \div 0,15$ %). Pentru a fi dozați în „lichidul gazdă”, adjuvanții citați se dizolvă în solvenți volatili potriviți, de preferință dintre cei utilizați în operațiile de purificare a violaceinei, sau în minime cantități de apă. În vederea stocării, produsul final (suplimentat sau nu) se dozează în flacoane din sticlă brună, cu volume adaptate viitoarelor utilizări / aplicații, ce se închid ermetic. Dozarea se realizează în condiții sterile și de curățenie de nivel ISO 6. Durata și condițiile de stocare fără pierderea calităților produsului final depind de eventuala sa formulare. Produsul neformat se poate stoca pe termen nelimitat, la temperatura ambientală.

REVENDICĂRI

1. Procedeu pentru izolarea și purificarea violaceinei destinate aplicațiilor biomedicale, din culturi de *Janthinobacterium lividum* pe mediu solid, care constă în parcurgerea succesivă a următoarelor zece etape, derulate în condiții tehnologice:

- revitalizarea bacteriilor, prepararea preinoculului și inoculului;
- însămânțarea și cultivarea bacteriilor pe substrat solid, adecvat suplimentat;
- prelevarea biofilmului generat de coloniile bacteriene, la finalul biosintezei;
- separarea primară a violaceinei în solvenți organici volatili;
- izolarea violaceinei în solvenți organici nemiscibili cu apa;
- izolarea avansată a violaceinei prin sorbție pe substraturi anorganice inerte;
- purificarea primară a violaceinei prin eluare cu solvenți organici volatili;
- purificarea avansată a violaceinei prin tehnici de eluare cromatografică;
- aducerea violaceinei în fază organică hidrofilă;
- formularea opțională a fazei organice cu conținut de violaceină, funcție de aplicația vizată,

caracterizat prin aceea că :

- furnizează soluții înalt concentrate de violaceină în fază organică lichidă, în care „lichidul gazdă” este nevolatil în condițiile de utilizare, hidrofil și solubil ori dispersabil în medii apoase aglomerate (bio)macromoleculare ale (poli)electroliților de tărie medie, fiind lipsit de potențial precipitant sau denaturant;
- asigură menținerea violaceinei în stare individualizată la nivel molecular și în fază lichidă pe întreg fluxul operațiilor de izolare, purificare și post-procesare, evitând precipitarea ori cristalizarea acesteia, soldate cu insolubilitatea formei solide în medii apoase cu caracteristicile fluidelor biologice și lichidelor tisulare;
- asigură, în virtutea caracteristicilor „lichidului gazdă”, dispersarea rapidă a violaceinei în sisteme apoase, fără precipitarea acesteia, precum și evitarea precipitării ori denaturării speciilor (bio)macromoleculare aflate în respectivele sisteme apoase, cu precădere în prezența (poli)electroliților de tărie medie și în condiții de aglomerare macromoleculară;
- permite valorificarea caracteristicilor moleculare ale violaceinei, cum sunt activitatea sa antioxidantă, antimicrobiană, antitumorală, imunomodulatoare și fotoprotectoare, în aplicații biomedicale și cosmeceutice / dermato-cosmetice.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de preparare a peinoculului, bacteriile revitalize și consolidate metabolic în pre-cultură se aduc în stare planctonică, urmare tratării cu un exces de D-(+)-glucoză a coloniilor prelevate și transferate în mediu de cultură lichid, în vederea separării indivizilor din colonii și asigurării colonizării dense și uniforme a mediilor solide de cultivare ulterioară.

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** etapa de cultivare a bacteriilor debutează cu consolidarea potențialului de proliferare a inoculului, iar pentru desprinderea coloniilor rezultate, în stare intactă de pe substratul solid, aderența acestora se reduce progresiv prin pulverizare cu o soluție salină de poli(etilen-glicol) și apoi cu soluție Ringer.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de cultivare a bacteriei pe mediul solid „de producție”, compoziția acestuia din urmă se suplimentează cu un potențiator de cvorum din seria homoserin-lactonelor acilate (N-octanoil-L-homoserin-lactonă, ori N-hexanoil- sau N-butiroil-DL-homoserin-lactonă etc.) emulsionate cu lecitină în apă, în vederea creșterii cantității de violaceină biosintetizată; suplimentarea se poate realiza în masa mediului de cultură, sau prin pulverizarea emulsiei diluate pe suprafața mediului solidificat, înaintea turnării inoculului.

5. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de prelevare a biofilmului de pe suprafața mediului solid, la finalul biosintezei, acesta se afânează și se consolidează în stare afânată prin tratarea succesivă și repetată cu următoarele compoziții lichide: (i) soluția unui compus chaotrop (1,2 ÷ 2,6 M perclorat de amoniu, 1,8 ÷ 3,0 M iodură de tetrametilamoniu, 2 ÷ 5 M clorhidrat de guanidină etc.) în tampon fosfat salin, (ii) o soluție cu rol de fixare - reticulare a componentelor matricei biofilmului (1,0 ÷ 2,5 % aldehydă glutarică, sau 0,6 ÷ 1,2 % glioxal în tampon fosfat salin cu pH 7,4 etc., eventual suplimentar cu o soluție de 6 ÷ 12 % trimetafosfat de sodiu); (iii) o soluție de 1 ÷ 5 % poli(etilen-glicol) 600 în soluție Ringer sterilă.

6. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de separare primară a violaceinei din biofilmul bacterian, după solubilizarea componentelor acestuia în alcool etilic 96 %, se aplică o operație de purificare cu scopul de a reține și elimina, din soluția alcoolică răcită la -25 ÷ -40 °C, speciile lipidice, prin filtrarea soluției, cu recirculare, prin filtre sită din oțel inoxidabil cu ochiuri de 5 ÷ 20 microni, înseriate și spațiate, anterior sub-răcite prin parcurgere cu azot lichid, reținând la final filtratul și îndepărtând fracțiile semisolide / păstoase depuse pe filtre, fracții ce rezultă ca urmare a insolubilizării la temperaturi joase.

7. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de izolare a violaceinei în solvent organic nemiscibil sau greu miscibil cu apa, soluția alcoolică de violaceină se aduce în contact și se omogenizează cu 1-octanol, hexan, ciclohexan, tetraclorură de carbon, cloroform, clorură de metilen ori acetat de etil, iar apoi amestecul se emulsionează repetat cu volume duble de apă încălzită la $50 \div 90$ °C, reținând faza organică; aceasta din urmă se eliberează avansat de urmele de apă prin încălzire și/sau fierbere sub reflux, răcire rapidă și filtrare prin filtre sită din oțel inoxidabil cu ochiuri de circa 5 micrometri.

8. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de izolare avansată a violaceinei, soluția acesteia în solvent organic nemiscibil cu apa se ampastează cu un sorbent microporos inert, iar pasta rezultată se supune evaporării excesului de solvent, în etape, mai întâi la temperatura ambiantă, în flux de aer steril, apoi prin încălzire, iar la final sub vid moderat; sorbentul uscat, care reține în porii săi soluție înalt concentrată de violaceină în solvent organic nemiscibil cu apa, se aduce apoi la stare microgranulară, prin măcinare.

9. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de purificare a violaceinei prin eluare din sorbent cu solvenți organici volatili, pulberea de sorbent încărcată cu soluție de violaceină se introduce în coloane de separare termostatabile, ca ultim strat într-o succesiune de straturi de umplutură, iar apoi violaceina se eluează cu solvenți organici volatili miscibili cu apa (alcool etilic, acetonă, dioxan, tetrahidrofuran, dimetilsulfoxid etc.), sau nu (cloroform, 1-octanol, 1-hexanol etc.); succesiunea straturilor de umplutură asigură purificarea violaceinei eluate, prin aceea că include: (i) un strat tampon, imediat sub cel de sorbent încărcat cu violaceină, umectat cu un fluid cu permeare lentă (poli(etilen-glicol), glicerină, oligizaharide etc.), solubil în eluent, (ii) un strat cu rol de uniformizare a fluxului de eluent, format din sorbent anorganic inert cu permeabilitate sporită, (iii) un strat cu umplutură destinată cromatografiei în fază inversată, cu rol de întârziere a fracțiilor hidrofobe cu masă moleculară mai mare decât cea a violaceinei, (iv) un strat de sorbent anorganic inert înalt permeabil, plasat la baza coloanei, cu rol de a reține diversele micro- și nano-particule, prin filtrare; operația de eluare se realizează la temperaturi și sub presiuni corelate cu caracteristicile solventului organic volatil utilizat.

10. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de purificare avansată a violaceinei, soluția acesteia în solvent organic volatil, concentrată până la $0,6 \div 1,0$ %, se supune separării prin cromatografie preparativă cu excludere dimensională, utilizând coloane cu umpluturi adaptate solventului organic cu rol de

eluent hidrofil sau hidrofob, ce au limita de excludere la valori ale masei moleculare de $1,0 \div 1,5$ kDa; regimul de lucru prevede injecții multiple, intercalate cu tratamente de curățare și purificare a umpluturii, efectuate cu soluții organice degazate, apte să îndepărteze compușii de însoțire a violaceinei (tetrahidrofuran sau cloroform, funcție de hidrofilia / hidrofobia eluentului); eluarea și colectarea separată a soluției de violaceină pură se realizează sub control spectroscopic / spectrofotometric, cu întreruperea eluării și eliberarea coloanei de compușii parazitari îndată ce se atinge pragul concentrațiilor exploatabile.

11. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de aducere a violaceinei în fază organică hidrofilă, soluția purificată de violaceină în solvent organic volatil se concentrează până la valori precis măsurate, apoi se amestecă și se omogenizează în proporții prescrise cu un compus hidrofil nevolatil, miscibil cu apa și soluțiile de electroliți de tărie medie, cu rol de „lichid gazdă”, de puritate farmaceutică, de tipul poli(etilen-glicolului) cu mase moleculare medii de $400 \div 600$ Da, glicerinei sau poli(glicerolilor) eventual esterificați, iar forma lichidă rezultată se supune evaporării controlate a solventului volatil, sub vid moderat, până la eliminarea avansată a solventului volatil.

12. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de formulare a fazei organice cu conținut de violaceină, compoziția acesteia se suplimentează, funcție de aplicațiile vizate ale produsului final, cu compuși chimici de puritate farmaceutică, admiși de farmacopee și de organismele de reglementare (U.S. Food and Drug Administration (FDA) și/sau European Medicine Agency (EMA)), cu HLB în plaja $6 \div 15$, aparținând unuia sau mai multora dintre tipurile următoare: (i) emulgatori biocompatibili (fosfolipide și derivați, glicozide funcționalizate, esteri ai gliceinei cu acizi grași nesaturați etc.), (ii) coloizi protectori ((co)polimeri sintetici sau naturali modificați chimic, polizaharide sau polipeptide și conjugate ale acestora cu specii de interes biochimic) și (iii) stabilizatori compoziționali (conjugate PEG-vitamina E, esteri ai sucrozei, ciclodextrine și derivați ai acestora etc.); dozarea adjuvanților citați se realizează în concentrațiile minim necesare inducerii efectului scontat, eventual dizolvați în solvenți miscibili cu faza organică și lipsiți de efect precipitant pentru violaceină sau denaturant pentru compușii (bio)chimici aflați în mediile apoase în care produsul final se va adăuga.