



MD 1337 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1337⁽¹³⁾ G2
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 9/00, 9/16

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: 99-0002 (22) Data depozit: 1998.12.21	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 1999.10.31, BOPI nr. 10/99
(71) Solicitant: Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD; Universitatea de Stat din Moldova, MD	
(72) Inventatori: Rudic Valeriu, MD; Nartea Ecaterina, MD; Grama Svetlana, MD; Iațco Iulia, MD	
(73) Titular: Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD; Universitatea de Stat din Moldova, MD	

(54) Tulpină de bacterii *Pseudomonas sp.1*, utilizată ca sursă de obținere a
substanțelor biologice active

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie și poate fi
utilizată în industria microbiologică pentru obți-
nerea enzimelor lipolitice.

Esența invenției constă în izolarea tulpinii de
bacterii *Pseudomonas sp.1*, care poate fi utilizată
ca sursă de substanțe biologice active.

Tulpina se păstrează în Colecția Națională de
Microorganisme a Institutului de Microbiologie al

2
Academiei de Științe a Republicii Moldova sub
numărul CNM-PsB-01.

Rezultatul invenției constă în activitatea lipo-
litică extracelulară înaltă.

Revendicări: 1

5

MD 1337 G2

MD 1337 G2

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea enzimelor lipolitice.

5 Este cunoscut faptul că bacteriile din genul *Pseudomonas* posedă o activitate lipolitică diversă. Enzimele lipolitice au o importanță mare, deoarece ele scindează grăsimile diverse și din această cauză au un spectru larg de aplicare (în prezent sunt utilizate în aproximativ 10-12 ramuri ale economiei naționale).

Este cunoscută tulpina *Ps. mendocina* ce face parte din componența microflorei concomitente a algei verzi halofile, monocelulare *Dunaliella salina* [1, 2].

10 Dezavantajul acestei tulpini este că ea posedă o cantitate insuficientă de fermenți lipolitici și alte substanțe bioactive.

Se mai cunoaște tulpina *Pseudomonas fluorescens* 533 care poate fi considerată ca un producător de enzime lipolitice [2, 3]. Activitatea lipazelor în lichidul cultural constituie 800 mM/mg. Tulpina poate fi cultivată în mediul organic Ching B (agarizat sau lichid).

15 Dezavantajul acestei tulpini constă în faptul că ea posedă o activitate lipolitică insuficientă și nu poate fi cultivată pe medii minerale sau pe mediile nutritive lichide care au fost deja utilizate.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei tulpini noi din genul *Pseudomonas* care ar asigura o productivitate sporită a enzimelor lipolitice și ar necesita minimum de cheltuieli pentru cultivare.

20 Esența invenției constă în faptul că se propune o tulpină nouă *Pseudomonas sp. 1*, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme a Republicii Moldova (Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova) sub numărul CNM-PsB-01 care reprezintă o sursă de substanțe bioactive.

Rezultatul invenției constă în activitatea lipolitică extracelulară înaltă.

25 Rezultatul obținut se datorește particularităților biochimice ale tulpinii, în special proceselor anabolice și catabolice, care decurg în acest organism.

Tulpina propusă a fost izolată în cultură pură din microflora concomitentă a algei verzi, halofile, unicelulare *Dunaliella salina* Teod. CALU-834 și poate fi cultivată pe mediu mineral și organic.

30 Pentru creșterea și dezvoltarea tulpinii poate fi utilizat mediul nutritiv mineral deja cunoscut Ben-Amoț care conține, g/l [4]: NaCl - 120; NaHCO₃ - 2,0; NaNO₃ - 0,5; KH₂PO₄ - 0,05; MgSO₄•7H₂O - 0,75; KCl - 0,15; FeEDTA - 0,05 ml (soluț. 0,05M); microelemente, sau lichidul cultural al algei *Dunaliella salina*, la care se adaugă zahăr - 5,00, autolizat de drojdie - 10,00.

Activitatea lipolitică medie a tulpinii propuse constituie 1661 mM/mg.

35 Caracterizarea cultural-morfologică a tulpinii: reprezentant al bastonașelor gram-negative, strict aerobe, mobile. Celule solitare, baciliforme, cu dimensiunile de 0,5-1 x 1,5-4 μm. Nu formează capsule. În medii nutritive depuse formează colonii circulare, vâscoase, de culoare albă, neted-lucioase cu emulsionare totală în apă, turbiditate uniformă. Aspectul marginii - întreagă, profilul ușor convex. Aspectul coloniei - S. Se sintetizează pigmentul verde-galben, fluorescent în ultraviolet.

40 Caracterizarea fiziologo-biochimică:

Tulpina bacteriei *Pseudomonas sp. 1* crește bine pe mediul cu următoarea componență (în g/l): NaCl - 120; NaHCO₃ - 2,0; NaNO₃ - 0,5; KH₂PO₄ - 0,05; MgSO₄•7H₂O - 0,75; KCl - 0,15; FeEDTA - 0,05 ml (soluț. 0,05M); zahăr - 5,0; autolizat de drojdie - 10,0; microelemente.

45 Tulpina se caracterizează printr-o activitate lipolitică extracelulară înaltă. Activitatea maximală a fermenților lipolitici se constată în a 4-a zi de cultivare a bacteriilor.

Hemoorganotrofă. Crește la temperatura +5°C și nu se observă creșterea la +42°C. Temperatura optimă de dezvoltare 24...26°C. Tulpina nu crește în prezența BaCl₂ în concentrație de 10 g/l. Metabolism de tip respirator. Catalazopozitivă. Oxidazopozitivă. Drept sursă de carbon pentru dezvoltare poate servi: zaharoza, maltoza, glucoza, lactoza, manitolul scindează slab. Nu scindează gelatina. Tulpina nu este rezistentă la următoarele antibiotice: eritromicină, streptomycină, lincomicină și rezistă la oxacilina, ampicilina, ristampicină. Formează lipaza. Reacția la indol - pozitivă.

Gradul de puritate a tulpinii.

55 Tulpina *Pseudomonas sp. 1* a fost izolată în cultură pură din microflora concomitentă a algei verzi, halofile *Dunaliella salina* Teod CALU834. Pentru cultivare necesită condiții sterile, în caz contrar poate fi infectată de alte microorganisme (bacterii, ciuperci, drojdii).

MD 1337 G2

4

Tulpina poate crește fără inhibarea proceselor de divizare în intervalul de pH 5,5...8,4. La pH-ul mediului de 3,8 tulpina nu crește.

5 *Exemplul 1*

Mediu nutritiv cu următoarea componență (în g/l): NaCl - 120; NaHCO₃ - 2,0; NaNO₃ - 0,5; KH₂PO₄ - 0,05; MgSO₄•7H₂O - 0,75; KCl - 0,15; FeEDTA - 0,05 ml (soluț. 0,05M); zahăr - 5; autolizat de drojdie - 10; microelemente Trilon B - 0,0025; MnSO₄•7H₂O - 0,0015; MoO₃ - 0,0002; CuSO₄•5H₂O - 0,00004; ZnSO₄•7H₂O - 0,00025, apă distilată - restul. Se sterilizează în autoclavă la 0,5 atm., în decurs de 1 oră. Apoi în acest mediu se inoculează 0,5 g/l de biomasă absolut uscată a tulpinii *Pseudomonas sp.* 1. Cultivarea are loc în termostat la temperatura de 22...26°C în decurs de 4 zile.

10 *Exemplul 2*

Intr-o colbă conică de 100 ml se introduc 50 ml de lichid cultural al algei verzi *Dunaliella salina* Teod CALU834 după 5 zile de cultivare. Se adaugă 5 g/l zahăr și 10 g/l de autolizat de drojdie. Mediul pregătit se sterilizează la 0,5 atm. în decurs de 1 oră. Apoi în acest mediu se inoculează 0,5 g/l biomasă absolut uscată. Cultivarea are loc la temperatura 22...26°C. Activitatea lipolitică după 4 zile de cultivare constituie 1800 mM/mg.

20

(57) Revendicare:

Tulpină de bacterii *Pseudomonas sp.*1, CNM-PsB-01, utilizată ca sursă de obținere a substanțelor biologice active.

25

(56) Referințe bibliografice:

1. Леонова Л.И., Борисова Е.В. Бактерии, сопутствующие некоторым галофильным одноклеточным водорослям, Микробиологический журнал, 1983, том 45, № 4, с. 39-43
2. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев : Наукова думка, 1990, с. 185-188
3. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы. Москва, Наука, 1977, с. 95
4. Rudic Valeriu. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne, Chișinău, Știința, 1993, p. 13

Șef secție: CRECETOV Veaceslav

Examinator: BAZARENCO Tatiana

Redactor: CANȚER Svetlana