



MD 2527 B2 2004.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2527 (13) B2

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 12 N 1/20, A 61 K 35/74,  
A 61 P 1/04; (C 12 N 1/20,  
C 12 R 1:01

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2002 0020 (22) Data depozit: 2001.12.26 (41) Data publicării cererii:  2003.10.31, BOPI nr. 10/2003	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:  2004.08.31, BOPI nr. 8/2004
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE FIZIOLOGIE ȘI SANOCREATOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	
(72) Inventatorii: LEORDA Ana, MD; TIMOȘCO Maria, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE FIZIOLOGIE ȘI SANOCREATOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Asociație de tulpini de bacterii *Bifidobacterium longum var. animalis* și *Lactobacillus acidophilus* - producătoare de vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> și B<sub>3</sub>

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la microbiologie și poate fi aplicată la obținerea preparatelor curativoprofylactice, utilizate pentru sporirea nivelului de sinteză a vitaminelor din grupa B în tubul digestiv.

Asociația de tulpini de bacterii *Bifidobacterium longum var. animalis* CNM BI-527 și *Lactobacillus acidophilus* CNM La-417 posedă capacitatea de a sintetiza vitaminele grupei B, și anume vitaminele B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> și B<sub>3</sub>.

5

10

2

Rezultatul invenției constă în sporirea nivelului de sinteză a vitaminelor B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> și B<sub>3</sub> de către microorganismele obligative ale tubului digestiv.

Revendicări: 1

## MD 2527 B2 2004.08.31

### Descriere:

Invenția se referă la microbiologie și poate fi aplicată la obținerea preparatelor curativoprofilactice utilizate pentru sporirea nivelului de sinteză a vitaminelor din grupa B în tubul digestiv.

Se știe că unei reprezentanți ai florei microbiene intestinale dispun de capacitatea de a sintetiza vitamine ale grupei B, dar nu sunt diferențiate speciile și tulpinile de bacterii, care sintetizează vitaminele B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> și B<sub>3</sub> (Петровская З.Г., Марко О.П. Микрофлора человека в норме и патологии. Москва, 1976; Куваева И.Б. Обмен веществ организма и кишечная микрофлора. Москва, 1976).

Se cunoaște preparatul microbial bicomponent, care a fost obținut în baza bifido- și lactobacteriilor [1].

Dezavantajul preparatului numit constă în aceea că tulpinile folosite la pregătirea acestui preparat au capacitate antagonistă pronunțată, și nu se conțin date despre capacitatea lor de a sintetiza vitamine.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea capacitații sintetizatoare de vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> și B<sub>3</sub> la tulpinile de bacterii obligative ale tubului digestiv.

Problema pusă se realizează prin evidențierea unei asociații de microorganisme obligative ale tubului digestiv cu un nivel cantitativ înalt de vitamine ale grupei B sintetizate.

Asociația propusă include o tulpină nouă de bifidobacterii *Bifidobacterium longum var. animalis* CNM B1-527 și o tulpină nouă de lactobacterii – *Lactobacillus acidophilus* CNM La-417, care posedă o capacitate pronunțată de a sintetiza vitaminele grupei B, și anume vitaminele B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> și B<sub>3</sub> comparativ cu monotulpinile enumerate, și anume de 7,35; 0,85 și 7,25 mg/%, respectiv.

Datele cu privire la nivelul cantitativ de sinteză a vitaminelor B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> și B<sub>3</sub> de către monotulpini și asociația lor sunt indicate în tabel.

Tabel  
Nivelul cantitativ al unor vitamine din grupa B sintetizate de monotulpini de bifido- și lactobacterii și asociația lor

Specia de microorganisme	Numărul de înregistrare a tulpinii	Cantitatea de vitamă, mg/%		
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
<i>Bifidobacterium longum var. animalis</i>	B1-527	1,35±0,09	0,24±0,02	5,00±0,14
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	La-417	1,04±0,03	0,10±0,01	4,24±0,05
Asociația lor	B1-527 și La-417	7,35±0,07	0,85±0,01	7,25±0,07

Datele din tabel argumentează utilizarea tulpinilor de *Bifidobacterium longum var. animalis* B1-527 și *Lactobacillus acidophilus* La-417 în asociație pentru sporirea nivelului de sinteză a vitaminelor B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> și B<sub>3</sub>.

#### Exemple de realizare a invenției

Tulpinile de bifido- și lactobacterii utilizate au fost izolate din tubul digestiv animal, adaptate la mediile de cultură respectiv Blaurok și de Man (MRS) și cultivate la temperatură optimă de 37±1°C timp de 24 ore, ulterior au fost identificate după determinatorul microorganismelor (Berger's Manual, 1980).

Componența taxonomică a fost următoarea: *Bifidobacterium longum var. animalis* și *Lactobacillus acidophilus*. Asociația este compusă din două tulpi cu componentul dominant de *Bifidobacterium longum var. animalis*.

Tulpinile de microorganisme incluse în asociația propusă se păstrează în Colecția Națională de Microorganisme a Republicii Moldova sub numărul de înregistrare B1-527 și La-417.

Caracteristica tulpinilor incluse în componența asociației propuse.

*Bifidobacterium longum var. animalis* B1-527 prezintă bacili gram pozitivi, asporogeni și imobili. În procesul fermentării nu formează CO<sub>2</sub>, catalază, acid oleic și acid propionic; ce consideră fermentarea pozitivă a: arabinozei, fructozei, galactozei, glucozei, lactozei, melibiozei, ramnozei, ribozei, zaharozei, xilozei, maltozei, rafinozei; fermentarea slabă a: tregalozei, salicinei, esculinei, dextrinei, amidonului; fermentarea negativă a: amidalinei, celobiozei, melicitozei, manozei, inulinei, adonitei, dulcitei, α-metilmanozidei, manitolui, sorbitului, inozitului și glicogenului. Ea este strict anaerobă, avirulentă și aconogenă; se dezvoltă optimal la temperatură de 37±1°C timp de 24 ore; structura ei antigenă nu este cunoscută din cauza participării numai la formarea imunității locale a tubului digestiv; tot din așa considerente nu s-au studiat și proprietățile serologice, pentru că n-au stat la baza tipizării taxonomice; are proprietăți adezive (indicele de adeziune este de 5,25±0,57); are particularități antagoniste față de *Staphylococcus aureus* 209, *Proteus vulgaris* 64, *Candida albicans* 01, *Pseudomonas aeruginosa* 2134, *Escherichia coli* II și *Salmonella dublin* (zona de inhibare în mm este respectiv de: 26...28, 19...21, 21...22, 20...22, 25...27 și 18...20); are capacitate de a sintetiza vitamine din grupa B.

## MD 2527 B2 2004.08.31

4

5 *Lactobacillus acidophilus* La-417 prezintă bacili gram pozitivi, asporogeni, imobili și homofermentativi; produsul principal ce se formează în procesul fermentării este acidul lactic. Ea fermenteaază pozitiv: amigdalina, celobioza, fructoza, galactoza, glucoza, lactoza, maltoza, manoza, melibioza, rafinoza, zaharoza, tregaloza, esculina și salicina; fermenteaază slab: melibioza și rafinoza; nu fermenteaază: arabinoza, melicitoza, ramnoza, riboza, xiloza, dextrin dulcita, adonita, L- și D-sorboza, tagatoza, manitol, sorbitul și amidonul; este optimal activă la temperatura de  $37\pm1^{\circ}\text{C}$ , iar biomasa se obține maxim peste 16 ore de incubare la acest regim de temperatură; este avirulentă, aoncogenă și are proprietăți antagoniste față de bacteriile test din genurile: *Staphylococcus*, *proteus*, *Candida*, *Pseudomonas*, *Escherichia* și *Salmonella*; antigenul ei intercelular este prezentat de acidul glicerointehioic; are capacitatea de adezivitate este de  $4,77\pm0,59$  și sintetizatoare de vitamine din grupa B ( $B_1$ ,  $B_2$  și  $B_3$ ).

10 *Exemplul 1*

15 Însămânțarea tulpinii *Bifidobacterium longum* var. *animalis* B1-527 se efectuează pe mediul de cultură Blaurock fluid în volum de 1,5...2,0% de inoculum, iar a tulpinii *Lactobacillus acidophilus* La-417 pe mediul de cultură de Man (MRS) fluid, de asemenea în volum de 1,5...2,0% de inoculum. După incubare timp de 24 ore la temperatura de  $37\pm1^{\circ}\text{C}$  biomasa obținută se supune centrifugării la 3000 de rotații pe minut. În precipitat, și supernatant în mediul de cultură folosit se determină cantitatea de vitamini  $B_1$ ,  $B_2$  și  $B_3$  și se calculează nivelul lor cantitativ. S-a constatat că monotulpina de bifilobacterii B1-527 a sintetizat vitaminele enumerate în cantitate de 1,35; 0,24 și 5,00 mg/% respectiv, iar monotulpina de lactobacterii La-417 în cantitate de 1,04; 0,10 și 4,25 mg/%, respectiv.

20 *Exemplul 2*

25 Procedeul de obținere a asociației propuse constă în însămânțarea tulpinilor *Bifidobacterium longum* var. *animalis* B1-527 și *Lactobacillus acidophilus* La-417 pe mediile de cultură Blaurock fluid și de Man (MRS). Însămânțarea tulpinilor menționate pentru obținerea asociației solicitate se efectuează respectiv în raport de  $10^{10}:10^7$  celule microbiene vii. Peste 24 ore de incubare la temperatura de  $37\pm1^{\circ}\text{C}$ , pentru obținerea raportului de bifido- și lactobacterii la nivel optim ( $10^{10}$  și  $10^7$ ) biomasa obținută se supune centrifugării la 3000 rot./min. În precipitat, supernatant și în mediul de cultură folosit se determină cantitatea de vitamine  $B_1$ ,  $B_2$  și  $B_3$ . Rezultatele obținute au fost de 7,35; 0,85 și 7,25 mg/% respectiv.

30 Pe baza datelor obținute s-a ajuns la concluzia că procesul de sinteză a vitaminelor  $B_1$ ,  $B_2$  și  $B_3$  de către tulpinile *Bifidobacterium longum* var. *animalis* B1-527 și *Lactobacillus acidophilus* La-417 este mult mai intensiv față de acesta la monotulpinile utilizate.

35 **(57) Revendicare:**

Asociație de tulpi de bacterii *Bifidobacterium longum* var. *animalis* CNM B1-527 și *Lactobacillus acidophilus* CNM La-417 – producătoare de vitamine  $B_1$ ,  $B_2$  și  $B_3$ .

**(56) Referințe bibliografice:**

1. MD 1853 G2 2002.02.28

**Şef Secție:**

GUŞAN Ala

**Examinator:**

BAZARENCO Tatiana

**Redactor:**

LOZOVANU Maria