



MD 1840 F1 2002.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1840⁽¹³⁾ F1
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 9/00, 9/16

(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: 99-0266 (22) Data depozit: 1999.11.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2002.01.31, BOPI nr. 01/2002
(71) Solicitanți: 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 (73) Titulari: INSTITUTUL de MICROBIOLOGIE al ACADEMIEI de ȘTIINȚE a REPUBLICII MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA de STAT din MOLDOVA, MD	

(54) Tulpină de bacterii *Pseudomonas sp. 2* - sursă de enzime lipolitice cu
activitate înaltă

(57) Rezumat:

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

Esența invenției constă în aceea că este
selectată tulpina de bacterii *Pseudomonas sp. 2*,
care se păstrează în Colecția Națională de
Microorganisme a Institutului de Microbiologie al

2
Academiei de Științe a Republicii Moldova cu
numărul CNM - PsB - 02.

5 Rezultatul invenției constă în sporirea nivelului
de sinteză a enzimelor lipolitice.

Revendicări: 1

MD 1840 F1 2002.01.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la tulpinile din genul *Pseudomonas*, ce pot fi utilizate 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 diverse grăsimi și din această cauză au un spectru larg de aplicare (în prezent sunt utilizate în aproximativ 12 ramuri ale economiei naționale).

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

- 10 Dezavantajul acestei tulpini este că ea posedă o activitate insuficientă a enzimelor lipolitice.

Se mai cunoaște tulpina *Pseudomonas sp. 1* [3]. Activitatea lipazelor în lichidul cultural constituie 1661 mMol/mg. Tulpina poate fi cultivată în mediul cultural Ben-Amoț, și pe lichidul cultural al *Dunaliella salina*, după centrifugarea ei, adăugând componenți organici.

Dezavantajul acestei tulpini constă în faptul că ea posedă o activitate lipolitică insuficientă.

- 15 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei tulpini noi *Pseudomonas sp.* care ar asigura o activitate lipolitică mai sporită a enzimelor extracelulare.

Esența invenției constă în faptul că se propune o tulpină nouă *Pseudomonas sp. 2*, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme a Republicii Moldova (Institutul de Microbiologie al AȘM) sub numărul CNM-PsB-02 - sursă de substanțe bioactive.

- 20 Rezultatul invenției constă în obținerea unui complex de enzime lipolitice cu o activitate de 3229 mMol/mg.

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 mediul de cultivare a algei verzi *Dunaliella salina* Teod. CALU - 834 și poate fi cultivată pe mediu mineral și organic.

- 25 Pentru creșterea și dezvoltarea tulpinii poate fi utilizat mediul mineral care conține (g/L): NaCl - 120; NaHCO₃ - 2,0; MgSO₄ · 7H₂O - 0,75; CaCl - 0,15; NaNO₃ - 0,5; KH₂PO₄ - 0,05; Fe-EDTA - 0,05; microelemente: Trilon B - 2,5; MnSO₄ · 7H₂O - 1,5; MoO₃ - 0,2; CuSO₄ · 5H₂O - 0,04; ZnSO₄ · 7H₂O - 0,25 [4]. Pentru creșterea și dezvoltarea tulpinii studiate poate fi utilizat și lichidul cultural al algei *Dunaliella salina*, la care se adaugă componenții organici (în g/L): zaharoză - 5, autolizat de drojdii - 10.

- 30 Tulpina se caracterizează printr-o sinteză sporită de enzime lipolitice extracelulare. Faptul că enzimele sunt eliminate în mediul de cultivare înlesnește determinarea activității lor și extragerea acestor enzime. Activitatea lipolitică se determină spectrofotometric conform metodei descrise în Brevetul MD nr. 845.

Activitatea lipolitică a tulpinii propuse variază între 3045...3350 mMol/mg.

- 35 Caracteristica morfo-culturală a tulpinii reprezintă bastonașe gram-negative, aerobe, mobile, cu dimensiunile de 0,5...1 x 1,5...4 μm. Mișcarea cu ajutorul flagelilor. În medii nutritive formează colonii circulare, vâscoase, de culoare albă, cu marginea coloniei ondulată, profilul ușor convex. În mediul lichid crește abundent, cu turbiditate uniformă. Aspectul coloniei de tip S. Se sintetizează pigmentul verde-galben, fluorescent în ultraviolet.

- 40 Caracteristica fiziologo-biochimică: tulpina bacteriei *Pseudomonas sp. 2* crește bine pe mediul cu următoarea componență (g/L): NaCl - 120; NaHCO₃ - 2,0; MgSO₄ · 7H₂O - 0,75; CaCl - 0,15, NaNO₃ - 0,5; CaH₂PO₄ - 0,05; Fe-EDTA - 0,05; microelemente: Trilon B - 2,5; MnSO₄ · 7H₂O - 0,0015; MoO₃ - 0,0002; CuSO₄ · 5H₂O - 0,00004; ZnSO₄ · 7H₂O - 0,00025.

- 45 Tulpina se caracterizează printr-o activitate lipolitică extracelulară înaltă. Activitatea maximă a fermentilor lipolitici se constată în a 5-a zi de cultivare a bacteriilor.

Hemoorganotrof. Crește la temperatura de 42°C. Nu se observă creșterea la 5°C. Temperatura optimă de dezvoltare 24...26°C. Tulpina nu crește în prezența BaCl₂ în concentrația de 10 g/L. Metabolism de tip respirator. Catalazopozitivă. Oxidazopozitivă. Drept sursă de carbon pentru dezvoltare poate servi: zaharoza, lactoza; mai puțin glucoza, manitol, maltoza. Nu scindează gelatina. Posedă reacție proteolitică - scindează cazeina. Are activitate lipolitică pronunțată. Tulpina posedă sensibilitate la eritromicină, gentomicină, lincomicină și nu este sensibilă la oxacilina, ampicilina, ristampicina, cefalosporine.

- 50 Gradul de puritate a tulpinii

Tulpina *Pseudomonas sp. 2* a fost izolată în cultură pură din mediul de cultivare a algei verzi *Dunaliella salina* Teod. CALU - 834. Pentru cultivare necesită condiții sterile, în caz contrar poate fi infectată de alte microorganisme (bacterii, ciuperci, drojdii).

- 55 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.

MD 1840 F1 2002.01.31

4

Exemple de utilizare a invenției

Exemplul 1

- 5 Într-o colbă conică de 100 mL cu mediu nutritiv lichid cu următoarea componență (g/L): NaCl - 120; NaHCO₃ - 2,0; MgSO₄ · 7H₂O - 0,75; CaCl - 0,15; NaNO₃ - 0,5; KH₂PO₄ - 0,05; Fe-EDTA - 0,05; microelemente: Trilon B - 0,0025; MnSO₄ · 7H₂O - 0,0015; MoO₃ - 0,0002; CuSO₄ · 5H₂O - 0,00004; ZnSO₄ · 7H₂O - 0,00025, preparat pe apă distilată și sterilizat în autoclavă la 0,5 atm. în decurs de 1 oră, se inoculează 0,5 g/L biomasă absolut uscată. Cultivarea are loc în termostat la temperatura 24...26°C în decurs de 5 zile.

10 Biomasă bacteriană se înlătură prin centrifugare, iar în lichidul cultural se determină activitatea lipolitică conform metodei descrise în Brevetul MD nr. 845.

Activitatea lipolitică a lichidului cultural în ziua a 5-a de cultivare constituie 3045 mMol/mg.

Exemplul 2

- 15 La 50 mL de lichid cultural al algei verzi *Dunaliella salina* după 5 zile de cultivare se adaugă (în g/L): zaharoză - 5 și autolizat de drojdii - 10.

Mediul pregătit se autoclavează la 0,5 atm. în decurs de 1 oră. Se inoculează 0,5 g/L biomasă absolut uscată. Cultivarea are loc în termostat la temperatura 24...26°C în decurs de 5 zile.

- 20 Biomasă bacteriană se înlătură prin centrifugare, iar în lichidul cultural se determină activitatea lipolitică conform metodei descrise în Brevetul MD nr. 845.

Activitatea lipolitică a lichidului cultural în ziua a 5-a de cultivare constituie 3350 mMol/mg.

25

(57) Revendicare:

Tulpină de bacterii *Pseudomonas sp.* 2, CNM - PsB - 02, utilizată în calitate de sursă de enzime lipolitice cu activitate înaltă.

30

(56) Referințe bibliografice:

1. Леонова Л.И., Борисова Е.В. Бактерии, сопутствующие некоторым галофильным одноклеточным водорослям. Микробиологический журнал, Москва, 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. MD 1337 G2

Șef Secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 99-0266		
(22) Data depozit: 1999.11.23		
(51) Int. Cl. (7) : C 12 N 9/00, 9/16 Alți indici de clasificare: (54) Titlul : Tulpina Pseudomonas sp.2 - sursă de substanțe bioactive (71) Solicitantul : Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD; Universitatea de Stat din Moldova, MD Termeni caracteristici : tulpinele, substanțe biologice active		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indicii de clasificare)		
C.I.B. 7: C 12 N 9/00, 9/16 MD, EA		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
X	MD 1337, G2	1
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
A - document care definește statutul general al tehnicii		T - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data efectuării documentării		2001.07.16
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

