



MD 145 Z 2010.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **145**⁽¹³⁾ **Z**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
A61K 36/882 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2009 0138 (22) Data depozit: 2009.07.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.02.28, BOPI nr. 2/2010
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE FIZIOLOGIE ȘI SANOCREATOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventator: LEORDA Ana, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE FIZIOLOGIE ȘI SANOCREATOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de obținere a mediului nutritiv pentru cultivarea lactobacteriilor**

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la microbiologie și biotehnologie, în particular la un procedeu de obținere a mediului nutritiv pentru cultivarea lactobacteriilor.

Procedeul include pregătirea mediului ce conține, la 1 L: peptonă - 10 g, citrat de amoniu - 2 g, acetat de sodiu - 5 g, glucoză - 20,0 g, sulfat de mangan cristalohidrat - 0,05 g, sulfat de magneziu cristalohidrat - 0,2 g, cisteină - 0,2 g, agar-agar - 20 g, Tvin-80 - 1 mL, autolizat de drojdii - 50 mL, extract de ficat de vită - 100 mL, lapte hidrolizat - 500 mL, apă distilată - restul, cu pH 6,2...6,6 și

2

sterilizarea lui. În mediul obținut se adaugă infuzie de rizomi de obligeacă, obținută prin infuzarea a 4,8...7,0 g materie primă tocată în 200 mL de apă clocotită timp de 30 min cu filtrarea și sterilizarea ulterioară a infuziei obținute, care se adaugă în cantitate de 20 mL la un litru de mediu nutritiv.

10 Revendicări: 1

15

MD 145 Z 2010.02.28

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie și biotehnologie, în particular la un procedeu de obținere a mediului nutritiv pentru cultivarea lactobacteriilor.

5 Este cunoscut procedeu de obținere a mediului de cultură pentru cultivarea lactobacteriilor care prevede adăugarea hidrolizatului de lactoproteină în calitate de supliment la un mediu de cultură inițial, care conține ser lactic cu un procent de substanțe uscate de 6...15%, amestecarea componentelor mediului, dezacidularea cu soluție de amoniac, sterilizarea și răcirea mediului [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că în calitate de supliment se adaugă hidrolizat de lactoproteină, component relativ costisitor și nu întotdeauna accesibil.

10 Cea mai apropiată soluție este procedeu de pregătire a mediului de cultură care prevede adăugarea la 300 mL de apă distilată a 10,0 g peptonă, 2,0 g citrat de amoniu, 5,0 g acetat de sodiu, 20,0 g glucoză, 0,05 g sulfat de mangan cristalohidrat, 0,2 g sulfat de magneziu cristalohidrat, 0,2 g cisteină, 20,0 g agar-agar, 1 mL Tvin-80, 50 mL autolizat de drojdii și 100 mL extract de ficat de vită. Volumul obținut se aduce până la 500 mL cu apă distilată și se adaugă lapte hidrolizat până la un litru. Se stabilește pH-ul mediului în limitele 6,2...6,6 și se sterilizează la temperatura de 112...115°C timp de 15...20 min [2].

Dezavantajul procedurii cunoscut constă în aceea că nu asigură o multiplicare efectivă a lactobacteriilor în procesul de cultivare.

20 Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unui procedeu de obținere a mediului nutritiv pentru cultivarea lactobacteriilor accesibile, care asigură obținerea unei biomase sporite a lactobacteriilor în procesul de cultivare.

Problema se soluționează prin aceea că procedeu include pregătirea mediului ce conține, la 1 L: peptonă - 10 g, citrat de amoniu - 2 g, acetat de sodiu - 5 g, glucoză - 20,0 g, sulfat de mangan cristalohidrat - 0,05 g, sulfat de magneziu cristalohidrat - 0,2 g, cisteină - 0,2 g, agar-agar - 20 g, Tvin-80 - 1 mL, autolizat de drojdii - 50 mL, extract de ficat de vită - 100 mL, lapte hidrolizat - 500 mL, apă distilată - restul, cu pH 6,2...6,6 și sterilizarea lui. În mediul obținut se adaugă infuzie de rizomi de obligeana, obținută prin infuzarea a 4,8...7,0 g materie primă tocată în 200 mL de apă clocotită timp de 30 min cu filtrarea și sterilizarea ulterioară a infuziei obținute, care se adaugă în cantitate de 20 mL la un litru de mediu nutritiv.

30 Rezultatul invenției constă în aceea că adăugarea extractului din rizomi de obligeana are o acțiune benefică asupra lactobacteriilor, efectul stimulator asupra multiplicării acestora fiind confirmat prin datele experimentale obținute.

Procedeu se realizează în modul următor.

35 Se pregătește mediul electiv pentru cultivarea lactobacteriilor, adăugând la 300 mL de apă distilată 10,0 g peptonă, 2,0 g citrat de amoniu, 5,0 g acetat de sodiu, 20,0 g glucoză, 0,05 g sulfat de mangan cristalohidrat, 0,2 g sulfat de magneziu cristalohidrat, 0,2 g cisteină, 20,0 g agar-agar, 1 mL Tvin-80, 50 mL autolizat de drojdii și 100 mL extract de ficat de vită. Volumul obținut se aduce până la 500 mL cu apă distilată și se adaugă lapte hidrolizat până la un litru. Se stabilește pH-ul mediului în limitele 6,2...6,6 și se sterilizează mediul la temperatura de 112...115°C timp de 15...20 min. Se cântăresc rizomii de obligeana, în prima variantă 4,8 g, în a doua - 5,8 g, iar în a treia - 7,0 g, se toacă și se umectează timp de 5 min cu apă potabilă. Se toarnă peste tocătura umectată 200 mL apă potabilă încălzită până la fierbere și se lasă amestecul pentru o jumătate de oră. Se filtrează extractul obținut prin filtru de vată și tifon și se sterilizează în autoclavă la 0,5 atm timp de 30 min. Se adaugă în condiții aseptice câte 20 mL extract de obligeana la fiecare litru de mediu. Se amestecă minuțios componentele și se inoculează câte 0,2 mL suspensie microbiană, diluată succesiv de la 10...1 până la 10...9, se însămânțează pe mediul de cultură agarizat și se incubă plăcile Petri timp de 24 ore la temperatura optimă pentru fiecare specie de microorganism. După inoculare se determină cantitatea celulelor vii de lactobacterii în loturile experimentale și martor.

50 Varianta I prevede pregătirea extractului în conformitate cu procedeu propus din 4,8 g rizomi de obligeana, varianta II - din 5,8 g, iar varianta III - din 7,0 g.

55 Lotul martor l-au constituit culturile de microorganisme însămânțate pe mediul electiv pentru cultivarea lactobacteriilor [2]. Pe variantele experimentale de mediu și pe cele din lotul martor au fost însămânțate culturi de *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*.

MD 145 Z 2010.02.28

Rezultatele testării sunt incluse în tabel. Cantitatea de celule microbiene vii reprezintă logaritmul zecimal al coloniilor de microorganisme crescute pe medii de cultură agarizate.

Variantele	Cantitatea de celule microbiene vii la 1 mL suspensie (lg)				
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
Martor	5,38	8,94	4,75	8,10	8,56
I	7,36	9,07	7,20	9,35	9,00
II	9,5	9,96	9,81	10,18	9,85
III	8,25	9,25	7,82	9,43	9,14

5

Analiza datelor obținute denotă o multiplicare evident sporită a tuturor speciilor de lactobacterii testate pe mediul de cultură preparat conform procedurii propus comparativ cu lotul martor, mai evidentă fiind în cazul variantei a doua. Această compoziție constituie varianta optimă a mediului preparat conform procedurii propus.

10

Procedeu de obținere a mediului nutritiv propus este accesibil, ușor realizabil, permite de a cultiva eficient microorganismele din genul lactobacteriilor. Adăugarea la mediul nutritiv a extractului din rizomi de obligează stimulează procesul de multiplicare a lactobacteriilor, ceea ce permite de a acumula biomasa necesară pentru pregătirea preparatelor microbiene.

15

(57) Revendicări:

20

Procedeu de obținere a mediului nutritiv pentru cultivarea lactobacteriilor care include pregătirea mediului ce conține, la 1 L: peptonă - 10 g, citrat de amoniu - 2 g, acetat de sodiu - 5 g, glucoză - 20,0 g, sulfat de mangan cristalohidrat - 0,05 g, sulfat de magneziu cristalohidrat - 0,2 g, cisteină - 0,2 g, agar-agar - 20 g, Tvin-80 - 1 mL, autolizat de drojdii - 50 mL, extract de ficat de vită - 100 mL, lapte hidrolizat - 500 mL, apă distilată - restul, cu pH 6,2...6,6 și sterilizarea lui, **caracterizat prin aceea că** în mediul obținut se adaugă suplimentar infuzie de rizomi de obligează, obținută prin infuzarea a 4,8...7,0 g materie primă tocată în 200 mL de apă clocotită timp de 30 min cu filtrarea și sterilizarea ulterioară a infuziei obținute, care se adaugă în cantitate de 20 mL la un litru de mediu nutritiv.

25

30

(56) Referințe bibliografice:

1. RU 2324732 C2 2008.05.20
2. Timošco M. Stresul și flora microbiană intestinală. Chișinău, Tipografia AȘM, 2005, p. 170

Șef Secție:

COLESNIC Inesa

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

pentru cerere de brevet de invenție de scurtă durată conform art.52(2) a Legii nr. 50/2008

(21) Nr. depozit: s 2009 0138	(85) Data fazei naționale PCT:															
(22) Data depozit: 2009.07.22	(86) Cerere internațională PCT:															
Prioritatea invocată: (31) nr.: 32) data: 33) țara: (51) IPC: Int. Cl.: C12N 1/20 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul: Procedeu de pregătire a mediului de cultură pentru cultivarea lactobacteriilor (71) Solicitantul: INSTITUTUL DE FIZIOLOGIE ȘI SANOCREATOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD																
I. Condiția de unitate a invenției ☐ satisface ☐ nu satisface. Notă:																
II. Minimul de documente consultate: MD, EA																
III. Domeniul de documentare: a) Indicii IPC (ultima redacție): C12N 1/20; C12R 1/225 b) Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: mediu nutritiv pentru lactobacteriilor, rizomi de obligeana																
IV. Documente considerate a fi relevante																
Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente															
A	RU 2324732 C2 2008.05.20															
A	Timoșco M. Stresul și flora microbiană intestinală. Chișinău, Tipografia AȘM, 2005, p. 170															
A	MD 1541 G2 2000.09.30															
A	MD 2969 G2 2006.02.28															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Categoria</th> <th>Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente</th> <th>Relevant față de revendicarea nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>RU 2324732 C2 2008.05.20</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Timoșco M. Stresul și flora microbiană intestinală. Chișinău, Tipografia AȘM, 2005, p. 170</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>MD 1541 G2 2000.09.30</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>MD 2969 G2 2006.02.28</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>		Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Relevant față de revendicarea nr.	A	RU 2324732 C2 2008.05.20	1	A	Timoșco M. Stresul și flora microbiană intestinală. Chișinău, Tipografia AȘM, 2005, p. 170	1	A	MD 1541 G2 2000.09.30	1	A	MD 2969 G2 2006.02.28	1
Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Relevant față de revendicarea nr.														
A	RU 2324732 C2 2008.05.20	1														
A	Timoșco M. Stresul și flora microbiană intestinală. Chișinău, Tipografia AȘM, 2005, p. 170	1														
A	MD 1541 G2 2000.09.30	1														
A	MD 2969 G2 2006.02.28	1														
Categorii de documente citate																
A - document care definește stadiul anterior în general	O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere etc.															
X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă	P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate															
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	T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care fundamentează invenția															
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după această dată	D - Document menționat în descrierea cererii de brevet															
Data finalizării documentării 2009.10.09																
Examinatorul Bantaș Valentina																