



MD 2527 B2 2004.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2527<sup>(13)</sup> 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

<b>Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării</b>	
(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) Inventatori: 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 curativoprofilactice, 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>.

2  
5 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

10

MD 2527 B2 2004.08.31

## MD 2527 B2 2004.08.31

3

### 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.

5 Se știe că unii 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].

10 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 capacității sintetizatoare de vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> și B<sub>3</sub> la tulpinile de bacterii obligative ale tubului digestiv.

15 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.

20 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

25

Specia de microorganisme	Numărul de înregistrare a tulpinii	Cantitatea de vitamină, mg/%		
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
<i>Bifidobacterium longum</i> var. <i>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>.

30 *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 temperatura optimă de 37±1°C timp de 24 ore, ulterior au fost identificate după determinantul microorganismelor (Bergey's Manual, 1980). Componenta taxonomică a fost următoarea: *Bifidobacterium longum* var. *animalis* și *Lactobacillus acidophilus*. Asociația este compusă din două tulpini 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.

40 *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, manitolului, sorbitului, inozitului și glicogenului. Ea este strict anaerobă, avirulentă și aoncogenă; se dezvoltă optimal la temperatura 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 capacități de a sintetiza vitamine din grupa B.

## MD 2527 B2 2004.08.31

4

*Lactobacillus acidophilus* La-417 prezintă bacili gram pozitivi, asporogeni, imobili și homofermentativi; produsul principal ce se formează în procesul fermentării este acidul lactic. Ea fermentează pozitiv: amigdalina, celobioza, fructoza, galactoza, glucoza, lactoza, maltoza, manoza, melibioza, rafinoza, zaharoza, tregaloza, esculina și salicina; fermentează slab: melibioza și rafinoza; nu fermentează: arabinoza, melicitoza, ramnoza, riboza, xiloza, dextrin dulcita, adonita, L- și D-sorboza, tagatoza, manitol, sorbitol și amidonul; este optimal activă la temperatura de  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , 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 glicerinteihoic; are capacități adezive (indicele de adezivitate este de  $4,77\pm 0,59$ ) și sintetizatoare de vitamine din grupa B ( $B_1$ ,  $B_2$  și  $B_3$ ).

### Exemplul 1

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  $37\pm 1^\circ\text{C}$  biomasa obținută se supune centrifugării la 3000 de rotații pe minut. În precipitat, și supernatant în mediul de cultură folosit se determină cantitatea de vitamină  $B_1$ ,  $B_2$  și  $B_3$  și se calculează nivelul lor cantitativ. S-a constatat că monotulpina de bifidobacterii 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.

### Exemplul 2

Procedeele 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  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , 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.

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.

### (57) Revendicare:

Asociație de tulpini 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

Sef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

## RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2002 0020	
(22) Data depozit: 2001.12.26	
(51) <sup>7</sup> : C 12 N 1/20, A 61K 35/74, A 61 P 1/04 // (C 12 N 1/20, A 61K 35/74, A 61 P 1/04, C 12 R 1:01)	
(54) <b>Titlul : Asociație de microorganisme obligave ale tubului digestiv cu capacitate de sinteză a vitaminelor grupei B</b>	
(71) Solicitantul : <b>INSTITUTUL DE FIZIOLOGIE ȘI SANOCREATOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD</b>	
Termeni caracteristici :	
a) limba română: asociația microorganismelor <i>Bifidobacterium longum var. animalis</i> nr. 527 și <i>Lactobacillus acidophilus</i> nr. 417, tulpinile <i>Bifidobacterium longum var. animalis</i> și <i>Lactobacillus acidophilus</i>	
b) limba engleză: association strains the <i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>Bifidobacterium longum var. animalis</i>	
I. Minimul de documente consultate ( sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.- 7)	
Int. Cl. <sup>7</sup> C 12 N 1/20, A 61K 35/74, A 61 P 1/04 // (C 12 N 1/20, A 61K 35/74, A 61 P 1/04, C 12 R 1:01)	
II. Literatura tehnico-științifică consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Тимошко М. А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных. Кишинев, Штиинца, 1990</li> <li>2. Тимошко М. А. и др. Бактериоценоз пищеварительного тракта поросят. Кишинев, Штиинца, 1983</li> <li>3. Петровская В.Г., Марко О.П. Микрофлора человека в норме и патологии. Москва, 1976</li> <li>4. Куваева И.Б. Обмен веществ организма и кишечная микрофлора, Москва, 1976.</li> </ol>	
III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD și termen de documentare)	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. MD 1993 - 2004-05-27</li> <li>2. SU – colecția BRTȘ</li> <li>3. EA – 1996 2004-05-27</li> <li>4. Espacenet</li> <li>5. RU 1994 - 2004-05-27</li> <li>6. РЖ ВИНТИ</li> </ol>	

IV. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 1853 G2 2002.02.28	1
A	EA 199700075	1
A	SU 1336560 A1	1
A	RU 2210592 C1 2003.08.20	1
A	RU 2001135347 A 2003.07.20	1
A	RU 2196174 C2 2003.01.10	1
A	RU 2000101391 A 2002.11.10	1
A	RU 2000101389 A 2002.11.10	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în rubrica IV		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
<b>* categoriile speciale ale documentelor consultate:</b>		<b>P</b> - document publicat înainte de data depozit, dar după data priorității invocate
<b>A</b> - document care definește stadiul anterior general		<b>T</b> - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
<b>E</b> - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data		<b>X</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat de unul singur
<b>L</b> - document care poate pune în discuție data priorității invocate sau poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres ( se va indica motivul)		<b>Y</b> - 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
<b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă divulgare		<b>&amp;</b> - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2004.03.15
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

RAPORT DE DOCUMENTARE

<b>Informația referitoare la brevete paralele</b>		<b>(21) Nr. depozit:</b>	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	<b>Brevete paralele</b>	Data publicării
1	2	3	4