



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2001 00737**

(22) Data de depozit: **26.06.2001**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.10.2011** BOPI nr. **10/2011**

(41) Data publicării cererii:
28.02.2002 BOPI nr. **2/2002**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD. MĂRĂȘTI NR. 59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **JURCOANE ȘTEFANA, STR.BODEȘTI
NR.5, BL.K8, SC.A, ET.5, AP.24, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CÂMPEANU GHEORGHE, ALEEA VALEA
CĂLUGĂREASCĂ NR.3, BL.A10, SC.B,
ET.3, AP.27, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **CORNEA CALINA PETRUȚA,
STR.BORCEA NR.8, BL.14, SC.2, AP.43,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **COSTEI MARIA VIRGINIA,
STR.CEAHLĂUL NR.3, BL.19, AP.3,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VAMANU EMANUEL,
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.2B,
BL.C17A, SC.B, AP.68, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 116204 B; EP 0684308 B1

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PREPARAT BIOLOGIC DIN *LACTOBACILLUS PLANTARUM***

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la obținerea unui inoculant microbiologic pentru însilozarea furajelor prin cultivarea submersă a unor tulpini selecționate de *Lactobacillus plantarum* pe medii cu glucoză și un conținut redus de săruri minerale, prin: cultivare pe un mediu lichid a unui extract de malt, timp de 24...48 h; realizarea unui inocul prin însămânțare cu preinocul și cultivare statică la pH

5,5, 36...42°C, timp de 20...28 h, în condiții anaerobe; fermentație propriu-zisă și cultivare cu agitare intermitentă; prelucrarea mediului de producție, obținându-se un preparat sub formă de pulbere de culoare alb-gri, cu titrul $4,8 \times 10^8 \dots 5 \times 10^{11}$ CFU/g.

Revendicări: 3



1 Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea unui inocul microbiologic pentru
însilozarea furajelor prin cultivarea submersă a unei tulpini de *Lactobacillus plantarum*.

3 Este cunoscut faptul că dintre numeroasele tipuri de bacterii fermentative utilizate în
conservarea furajelor, bacteriile acidolactice sunt cele mai utilizate, acestea conducând la
5 îmbunătățirea calității și a valorii nutritive a furajelor, precum și la menținerea unui echilibru
microbian favorabil stării de sănătate, la nivelul tractusului digestiv al animalelor.

7 Câteva studii preliminare au arătat că mediul de cultură poate fi îmbogățit prin
adăugarea extractului de carne sau de drojdie ducând astfel, atât la îmbunătățirea
9 performanțelor de creștere, cât și la producerea lactatului de către lactobacili (Ohleyer și
colab., 1985; Timmer și Kromkamp, 1994)

11 Fermentația din silozuri este predominant lactică, provenită prin activitatea bacteriilor
lactice găsite în mod natural în plante la însilozare. Aceste bacterii, prin procesele
13 fermentative ale glucidelor produc în diferite proporții acid lactic, acid acetic, manitol și dioxid
de carbon. Dintre aceștia, ideal este să predominie acidul lactic, deoarece are un efect
15 puternic de conservare al plantelor și are o palatabilitate ridicată, față de acidul acetic, care
nu este acceptat de rumegătoare.

17 Cea mai eficientă cale de a sintetiza acid lactic nu este cea prin procese chimice, ci
prin biosinteză, utilizând tehnici de fermentație cu tulpini selecționate (Ye și col., 1996).

19 Problema pe care o rezolvă invenția de față este de a realiza un produs biologic
utilizat ca inocul la însilozarea plantelor furajere, cu un puternic efect de conservare și
21 ulterior cu efect probiotic în hrana animalelor.

Procedeu conform invenției constă în aceea că prezintă următoarele etape:

23 - realizarea unui preinocul dintr-o tulpină selecționată de *Lactobacillus plantarum*
283.1 prin cultivare pe un mediu lichid cu 4...8% extract de malt și pH 5,2...5,8, la 36...42°C,
25 timp de 24...48 h;

27 - realizarea unui inocul prin însămânțare cu preinocul, în proporție de 1...3% a unui
mediu care cuprinde apă, peptonă, glucoza, fosfat de amoniu, peptonă, carbonat de calciu,
în raport de 100:0,5:2:0,1:1, și cultivare statică la pH 5,5, la 36...42°C, timp de 20...28 h, în
29 condiții anaerobe;

31 - fermentația propriu-zisă prin însămânțare cu inocul, în raport de 1...3% a unui mediu
de producție care conține apă, peptonă, glucoză, fosfat de amoniu, carbonat de calciu în
raport de 100:0,1:2:0,1:1 și cultivare cu agitare intermitentă 80 rpm timp de 8 h în primele
33 24 h la pH 5,5, la 42°C, timp de 48...72 h, în condiții anaerobe, pH-ul final al mediului
devenind 4;

35 - prelucrarea mediului de producție obținându-se un preparat sub formă de pulbere
de culoare alb gri cu titrul $4,8 \times 10^8 \dots 5 \times 10^{11}$ CFU/g.

37 Prin aplicarea invenției, se obține avantajul unui titru de viabilitate sporit în mediul de
cultură final.

39 S-au selecționat tulpini de *Lactobacillus plantarum*, a căror dezvoltare a fost diferită
în funcție de materiile prime care s-au utilizat la prepararea mediului de cultură și de
41 temperatură la care se face fermentarea. Se pot utiliza lactobacili foarte rezistenți la aciditate
și foarte activi în producerea acidului lactic.

43 Tulpinile de *Lactobacillus plantarum* care au avut o dezvoltare rapidă și care au
determinat o productivitate mare au fost: *Lactobacillus plantarum* 283.3, *Lactobacillus*
45 *plantarum* 283.1, existente în colecția USAMV.

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui preparat biologic, prin cultivarea
47 submersă a microorganismului *Lactobacillus plantarum* înregistrat în colecția de micro-
organisme a USAMV-Facultatea de Biotehnologii, sub nr.283, pe medii conținând glucoza
49 tehnică și o cantitate redusă de săruri minerale.

RO 123354 B1

Factorii majori care afectează atât creșterea microorganismului cât și productivitatea acestuia sunt: condițiile limitative ale nutrienților din mediul de cultură și efectul inhibitoriu cauzat de acidul lactic produs în bulionul nutritiv.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției:

Exemplu. Se prepară un inocul vegetativ, prin cultivarea microorganismului pe un mediu conținând 2 g glucoză, 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,1 g peptonă, 0,1 g CaCO_3 , 100 ml apă, la pH 5,5, sterilizat 20 min la 110°C. Caracteristicile de dezvoltare ale inoculului după 24 h sunt: pH 4,8, D.O₅₇₀ (densitate optică la 570 nm): 0,108 (diluție 1:50), nr. de microorganisme: $4,2 \times 10^7$, substanță uscată: 2,2%.

Cultura inocul se utilizează pentru însămânțarea mediului de producție, în proporție de 1-3%.

Mediul de fermentație conține: glucoză 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,1%, peptonă 0,1%, CaCO_3 0,1%, pH 5,5.

După sterilizare și adăugarea inoculului, mediul de fermentație se menține timp de 48 h, la următorii parametri: temperatură 42°C, agitare intermitentă 80 rpm timp de 8 h în primele 24 h de fermentație, în condiții de anaerobioză, pH-ul final al mediului fiind 4. Valorile obținute pentru exemplu sunt redate în tabelul următor.

Tabel

Rezultate obținute în experiențele de cultivare în bioreactor a tulpinilor de Lactobacillus plantarum (după 48 h de fermentație)

Nr. crt.	Tulpina utilizată	Condiții de cultivare	D.O.	Concentrație glucoza	Titlul de viabilitate CFU/g biomasă uscată
Șarja 1	<i>L. plantarum</i> 283.3	pH5,5 T40°C 80 rpm	0,405	0,025	$5,9 \times 10^7$
Șarja 2	<i>L. plantarum</i> 283.1	pH5,5 T40°C 80 rpm	0,380	0,010	$4,8 \times 10^8$

La sfârșitul bioprocesului după 48...72 h de cultivare a producătorului, se efectuează prelucrarea mediului de cultură în următoarele faze:

Varianta a:

- concentrare sub vacuum la 40...50°C, până la 1/10 din volumul inițial; operația se efectuează într-un rotavapor pelicular tip Buchi;

- adsorbție a soluției concentrate conținând atât lichidul de cultură, cât și biomasa pe carbonat de calciu și tărâțe de grâu în proporție de 100:60:40;

- uscarea amestecului la 40°C în curent de aer, obținându-se un preparat sub formă de pulbere de culoare alb-gri cu titlul de viabilitate: $4,8 \times 10^8$ CFU/g.

Varianta b:

- separare a biomasei prin centrifugare și înlăturare a supernatantului;

- adsorbție a biomasei pe carbonat de calciu în proporție de 1 g biomasă/1 g CaCO_3 ;

- uscare în exicator sub vid, obținându-se un preparat sub formă de pulbere de culoare alb-gri, cu titlul de viabilitate: 5×10^{11} CFU/g

Produsul obținut prin procedeul conform invenției permite obținerea unor preparate biologice utilizate ca inoculant pentru siloz de plante furajere (lucernă, orz, ciocălăi etc.), în proporție de 1 g/tona de siloz.

1

Revendicări

3

1. Procedeu de obținere a unui inoculant microbiologic pentru însilozarea furajelor prin cultivarea submersă a unor tulpini selecționate de *Lactobacillus plantarum* pe medii cu glucoză și un conținut redus de săruri minerale, **caracterizat prin aceea că** prezintă următoarele etape:

7

- realizarea unui preinocul dintr-o tulpină selecționată de *Lactobacillus plantarum* prin cultivare pe un mediu lichid cu 4...8% extract de malt și pH 5,2...5,8, la 36...42°C, timp de 24...48 h;

9

- realizarea unui inocul prin însămânțare cu preinocul, în proporție de 1...3% a unui mediu care cuprinde apă, peptonă, glucoză, fosfat de amoniu, peptonă, carbonat de calciu, în raport de 100:0,5:2:0,1:1 și cultivare statică la pH 5,5, la 36...42°C, timp de 20...28 h, în condiții anaerobe;

13

- fermentația propriu-zisă prin însămânțare cu inocul, în raport de 1...3% a unui mediu de producție care conține apă, peptonă, glucoză, fosfat de amoniu, carbonat de calciu în raport de 100:0,1:2:0,1:1 și cultivare cu agitare intermitentă 80 rpm, timp de 8 h în primele 24 h, la pH 5,5, 42°C, timp de 48...72 h, în condiții anaerobe, pH-ul final al mediului devenind 4;

17

- prelucrarea mediului de producție, obținându-se un preparat sub formă de pulbere de culoare alb-gri, cu titrul $4,8 \times 10^8 \dots 5 \times 10^{11}$ CFU/g.

19

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** prelucrarea mediului de producție se face prin:

21

- concentrare sub vacuum la 40...50°C, până la 1/10 din volumul inițial;

23

- absorbție a soluției concentrate conținând atât lichidul de cultură, cât și biomasa pe carbonat de calciu și tărațe de grâu în proporție de 100:60:40;

25

- uscarea amestecului la 40°C în curent de aer.

27

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** prelucrarea mediului de producție se face prin:

27

- separare a biomasei prin centrifugare și înlăturare a supernatantului;

29

- adsorbție a biomasei pe carbonat de calciu în proporție de 1 g biomasă/1 g CaCO_3 ;

- uscare în exicator sub vid.

