



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00565**

(22) Data de depozit: **29.06.2010**

(41) Data publicării cererii:
30.12.2011 BOPI nr. **12/2011**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF,
CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **IONESCU ANA DESPINA,
STR. ALUNIȘULUI NR.4, BL.11A, AP.99,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CASARICA ANGELA, STR.POPA STOICA
FARCAȘ NR.19, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **RUGHINIS DOMNICA, ALEEA LEORDA
NR.3, BL.MP1A, SC.D, AP.34, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **VAMANU ADRIAN,
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR. 2B,
BL. C17A, SC. B, ET. 5, AP. 68, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VAMANU EMANUEL,
ALEEA VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR.3,
BL.A10, SC.D, ET.2, AP.53, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **COJOCARU RAMONA IONELA, STR.
DRĂGĂNEȘTI NR.1BIS, BL.P2, SC.B,
AP.15, SLATINA, OT, RO;**
• **CARBUREAN MARIANA,
STR. BURDUJENI NR.5A, BL. GC6, SC.A,
AP.11, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BOCA ELENA, STR. BRINDUSELOR,
NR. 6, BL. V70, SC.4, AP. 64, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **TEHNOLOGIE DE OBTINERE A UNUI PREPARAT PE BAZĂ
DE LATOBACILI, CU O COMPOZIȚIE MICROBIOLOGICĂ ȘI
CHIMICĂ STRICT DETERMINATĂ**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui preparat pe bază de lactobacili cu o compoziție microbiologică și chimică strict determinată, cu aplicare în industria farmaceutică și cea a suplimentelor nutritive. Procedeu conform invenției constă în cultivarea submersă, statică, a tulpinii de *Lactobacillus*, în sistem discontinuu, pe un mediu nutritiv ce conține glucoză 1...2%, peptonă 0,5...1% și extract de drojdii 1...3%, cu obținerea unui preparat biomasă sub formă uscată. Parametrii indicați pentru procesul de dezvoltare a biomasei sunt temperatura de 37...40°C, pH-ul rezultat

după sterilizarea mediului, durata 46...48 h, cultura statică în flacoane Erlenmayer. Preparatul microbial se obține în urma a trei etape de centrifugare, prima cu durată de 40...60 min, la viteza de 3000 rpm și temperatura de 4...6°C, iar următoarele două cu durată de 40...60 min, la viteza de 5000 rpm și temperatura de 4...6°C, sedimentul de interes fiind spălat cu apă distilată, între etapele de centrifugare.

Revendicări: 1



5

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2010 00565
Data depozit 29-06-2010

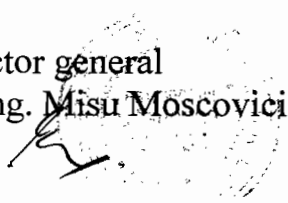
DESCRIERE

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui preparat pe baza de lactobacili , cu o compozitie microbiologica si chimica strict determinata.

Domeniul posibil de aplicare a acestui procedeu este reprezentat de industria farmaceutica si cea a suplimentelor nutritive.

Cele mai recente studii efectuate pe plan mondial au indicat ca senzatia de balonare , diareea , constipatia , durerile abdominale , gazele intestinale , mirosul neplacut al respiratiei , pruritul si diverse eczeme pot aparea in multe cazuri ca urmare a unui dezechilibru al microbiotei tractului digestiv. De obicei , problemele apar dupa tratamentele indelungate cu antibiotice ori cu alte medicamente folosite impotriva infectiilor. De asemenea , alimentatia necorespunzatoare poate contribui la distrugerea bacteriilor intestinale necesare pentru buna functionare a organismului . S-a constatat in plus ca si laxativele , citostaticele , interventiile chirurgicale , hrana din conserve consumata timp indelungat , regimurile alimentare drastice , grasimile , fumatul , excesul de alcool sau de dulciuri , ca si stresul prelungit pot reprezenta cateva dintre cauzele declansarii dezechilibrelor intestinale. Este deja cunoscut faptul ca flora microbiana se formeaza inca din primele clipe de viata . Ea are un rol decisiv in reglarea functiilor organismului , deoarece ajuta la digestie si actioneaza ca un scut in fata factorilor nocivi , realizand selectia substantelor hranitoare , a vitaminelor si mineralelor si , pe aceasta cale , contribuind la stimularea imunitatii organismului. In aceasta situatie , se recomanda masuri periodice de analiza a starii tractului digestiv si de ameliorare a echilibrului microflorei intestinale. Studiile efectuate de catre specialisti au indicat ca cele doua tipuri de bacterii necesare refacerii florei intestinale apartin genurilor *Lactobacillus* si *Bifidobacterium* , asa -numitele probiotice. Ele se pot gasi si in diverse alimente , precum lactatele fermentate , berea , bauturile naturale fermentate (vinul , cidrul , socata) , painea preparata cu drojdie , varza , castravetii si ciocolata . Cu toate acestea , in cazul unor dezechilibre mai accentuate , este de recomandat sa se utilizeze tratamentul cu un preparat probiotic , care sa cuprinda o biomasa de bacterii lactice cu o compozitie microbiologica si chimica strict determinata si care se poate suplimenta cu diverse alte componente , in functie de scopul final urmarit prin schema de tratament respectiva. Astfel , unele studii recente prezinta posibilitatea extinderii ariei de aplicare a tratamentului cu preparate probiotice , considerand ca acestea inhiba chiar si tumorile de ficat , de colon , ale vezicii urinare si ale glandelor mamare , scad riscul alergiilor si reduc nivelul colesterolului.

Director general
Dr. ing. Misu Moscovici



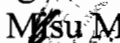
Procedeul de obtinere a unui preparat pe baza de lactobacili , cu o compozitie microbiologica si chimica strict determinata conform inventiei , consta in aceea ca o tulpina selectionata de *Lactobacillus paracasei* se cultiva submers , in cultura statica, discontinua pe un mediu nutritiv continand glucoza 1...2% , peptona 0,5...1 % si extract de drojdii 1...3 % , se obtine apoi preparatul de biomasa sub forma uscata si se efectueaza determinarile analitice , in scopul stabilirii precise a concentratiilor microelementelor necesare manifestarii efectului terapeutic. Parametrii indicati pentru desfasurarea procesului de dezvoltare a biomasei bacteriene sunt temperatura de 37...40°C , pH-ul care rezulta dupa sterilizarea mediului , durata 46-48 ore , cultura statica in flacoane Erlenmayer. Parametrii indicati pentru obtinerea preparatului microbial sub forma de pulbere sunt : parcurgerea a trei etape de centrifugare , dintre care prima cu durata de 40...60 minute la o viteza de 3000 rpm si temperatura de 4...6°C, iar urmatoarele doua cu durata de 40...60 de minute la viteza de 5000 rpm si temperatura de 4...6°C. Intre etapele de centrifugare , sedimentul de interes se spala cu apa distilata , in scopul recuperarii unei biomase bacteriene libere de orice urma de mediu de cultivare. Determinarile analitice se efectueaza prin spectroscopie de masa ICP-MS cu Perkin Elmer Elan DRC spectrofotometru sau prin FAAS.

Avantajul inventiei consta in aceea ca se obtine un preparat concentrat de biomasa de lactobacili cu o compozitie microbiologica strict determinata , utilizandu-se ca materii prime , aproape in totalitate , produse naturale si al carui mod de conditionare permite identificarea prezentei anumitor microelemente in concentratii cu implicatii terapeutice bine determinate. Preparatul prezinta o buna stabilitate in timp a activitatii specifice si poate fi inglobat in diverse combinatii pentru obtinerea unui produs cu activitate terapeutică superioara.

Se prezinta , in continuare , un exemplu de realizare a inventiei .

a) Obtinerea biomasei sub forma de preparat lichid

Se realizeaza in sistem discontinuu , prin cultivarea statica , submersa a unei tulpini de *Lactobacillus paracasei* din colectia USAMV-Bucuresti , intrun mediu continand glucoza 1...2% , peptona 0,5...1 % si extract de drojdii 1...3 % (denumit Mediul A) , timp de 46...48 ore , la temperatura de 37...40 °C , in flacoane Erlenmayer mentinute in incubator cu racire.

Director general
Dr. ing.  Moscovici

Conservarea tulpinii s-a realizat exclusiv in mediu lichid , pe flacoane de 500 ml continand cate 100 ml Mediu A . Sterilizarea mediului de cultivare se efectueaza la 110° C timp de 20 minute si este urmata obligatoriu de o etapa de verificare a sterilitatii mediului , timp de 24 ore la temperatura de 37...38 °C. Inocularea fiecarui flacon s-a efectuat cu cate 7...10 ml cultura -conserv, urmand apoi incubarea statica a culturii timp de 46...48 ore la temperatura de 37...40 °C si pastrarea ulterioara la frigider (+4 °C), pentru perioade de maxim 1 luna.

Multiplicarea celulara se obtine prin cultivarea statica , submersa a microorganismului . Pornind de la un flacon continand cultura conservata , se inoculeaza cate 3...5 baloane de 500 ml cu 100 ml Mediu A/ balon, proportia de inoculare fiind de 8...10 %.

Toate flacoanele insamantate se pun la incubat, pentru 46...48 ore la 37...40 °C si apoi se utilizeaza pentru obtinerea biomasei. Etapa de multiplicare a biomasei reprezinta faza in care se obtine inoculul.

Pentru obtinerea ulterioara a biomasei , se utilizeaza flacoane Erlenmayer cu volum de 750 ml , continand cate 200...250 ml Mediu A. Baloanele se instaleaza la incubator , la temperatura de 37...40 °C, prelevand probe periodic, timp de 46...48 ore, pentru monitorizarea dezvoltarii biomasei . Printre parametrii utilizati pentru monitorizarea dezvoltarii biomasei se pot enumera : aspectul micro- si microscopic al culturii , densitatea optica , consumul de glucoza din mediul cultivat si producerea de acid lactic. Dupa incheierea perioadei de incubare, materialul biologic din toate flacoanele este reunit , in conditii aseptice , in vederea conditionarii preparatului sub forma de pulbere uscata si a efectuarii determinarilor analitice.

b) Obtinerea biomasei sub forma de pulbere

Mediul cultivat este supus unor etape de centrifugare, spalare si uscare, in scopul recuperarii celulelor bacteriene libere de orice urma de mediu de cultivare . Etapa de centrifugare implica parcurgerea a trei etape , dintre care prima cu durata de 40...60 minute la o viteza de 3000 rpm si temperatura de 4...6 °C, iar urmatoarele doua cu durata de 40...60 de minute la viteza de 5000 rpm si temperatura de 4...6 °C. Intre etapele de centrifugare , sedimentul de interes se spala cu apa distilata. Preparatul centrifugat este apoi supus operatiunilor de uscare la temperatura de 105°C si de mojarare.

c). Determinarea analitica a microelementelor cu implicatii terapeutice prezente in biomasa probiotica a urmarit concentratiile de cupru , zinc , cobalt , cadmiu si fier si s-a efectuat prin spectroscopie de masa ICP-MS cu Perkin Elmer Elan DRC spectrofotometru sau prin FAAS .

Director general
Dr. ing. Mitsu Moscovici

REVENDICARE

Procedeu de obtinere a unui preparat pe baza de lactobacili , cu o compozitie microbiologica si chimica strict determinata , **caracterizat prin aceea ca** o tulpina de *Lactobacillus* se cultiva submers , static , in sistem discontinuu pe un mediu nutritiv continand glucoza 1...2% , peptona 0,5...1 % si extract de drojdii 1...3 % si se obtine apoi preparatul de biomasa sub forma uscata, al carui mod de conditionare permite identificarea prezentei anumitor microelemente in concentratii cu implicatii terapeutice bine determinate . Parametrii indicati pentru desfasurarea procesului de dezvoltare a biomasei bacteriene sunt temperatura de 37...40 °C , pH-ul care rezulta dupa sterilizarea mediului , durata 46-48 ore , cultura statica in flacoane Erlenmayer . Parametrii indicati pentru obtinerea preparatului microbial sub forma de pulbere sunt: parcurgerea a trei etape de centrifugare , dintre care prima cu durata de 40...60 minute la o viteza de 3000 rpm si temperatura de 4...6 °C , iar urmatoarele doua cu durata de 40...60 de minute la viteza de 5000 rpm si temperatura de 4...6 °C. Intre etapele de centrifugare , sedimentul de interes se spala cu apa distilata.

Director general
Dr. ing. Misu Moscovici

