



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.04.2013** BOPI nr. **4/2013**

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

(73) Titular:

- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF BUCUREȘTI, CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOME ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **IONESCU ANA DESPINA, STR.ALUNIȘULUI NR.4, BL.11 A, SC.3, AP.99, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **CĂȘĂRICĂ ANGELA, STR.POPA ȘTOICA DIN FĂRCAȘ NR.19, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **RUGHINIS DOMNICA, ALEEA LEORDA NR.3, BL.MP 1 A, SC.D, AP.34, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

- **VAMANU ADRIAN, ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.2 B, BL.C 17 A, SC.2, ET.5, AP.68, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **VAMANU EMANUEL, ALEEA VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR.3, BL.A 10, SC.B, ET.2, AP.53, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **COJOCARU RAMONA-IONELA, STR.DRĂGĂNEȘTI NR.1 BIS, BL.P 2, SC.B, AP.15, SLATINA, OT, RO;**
- **CARBUREAN MARIANA, STR. BURDUJENI NR.5 A, BL.GC 6, SC.A, AP.11, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **BOCA ELENA, STR. BRÂNDUȘELOR NR.6, BL.V 70, SC.4, AP.64, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- CN 1985620 (A); DE 4032730 (A1);**
- RU 2371479 (C1)**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PREPARAT PE BAZĂ DE LACTOBACILI**



RO 126942 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de obținere a unui preparat pe bază de lactobacili,
administrat ca probiotic pentru refacerea microflorei intestinale.

3 Cele mai recente studii efectuate pe plan mondial au indicat că senzația de balonare,
diareea, constipația, durerile abdominale, gazele intestinale, mirosul neplăcut al respirației,
5 pruritul și diverse eczeme pot apărea în multe cazuri ca urmare a unui dezechilibru al micro-
biotei tractului digestiv. De obicei, problemele apar după tratamentele îndelungate cu
7 antibiotice ori cu alte medicamente folosite împotriva infecțiilor. De asemenea, alimentația
necorespunzătoare poate contribui la distrugerea bacteriilor intestinale, necesare pentru
9 buna funcționare a organismului. S-a constatat în plus că și laxativele, citostaticele, interven-
țiile chirurgicale, hrana din conserve consumată timp îndelungat, regimurile alimentare
11 drastice, grăsimile, fumatul, excesul de alcool sau de dulciuri, ca și stresul prelungit, pot
reprezenta câteva dintre cauzele declanșării dezechilibrelor intestinale. Este deja cunoscut
13 faptul că flora microbiană se formează încă din primele clipe de viață. Aceasta are un rol
decisiv în reglarea funcțiilor organismului, deoarece ajută la digestie și acționează ca un scut
15 în fața factorilor nocivi, realizând selecția substanțelor hrănitoare, a vitaminelor și a minera-
lelor și, pe această cale, contribuind la stimularea imunității organismului. În această situație,
17 se recomandă măsuri periodice de analiză a stării tractului digestiv și de ameliorare a
echilibrului microflorei intestinale. Studiile efectuate de către specialiști au indicat că cele
19 două tipuri de bacterii necesare refacerii florei intestinale aparțin genurilor *Lactobacillus* și
Bifidobacterium, așa-numitele probiotice. Acestea se pot găsi și în diverse alimente precum
21 lactatele fermentate, berea, băuturile naturale fermentate (vinul, cidrul, socata), pâinea pre-
parată cu drojdie, varza, castraveții și ciocolata. Cu toate acestea, în cazul unor dezechilibre
23 mai accentuate, este recomandat să se utilizeze tratamentul cu un preparat probiotic, care
să cuprindă o biomasă de bacterii lactice, cu o compoziție microbiologică și chimică strict
25 determinată și care se poate suplimenta cu diverse alte componente, în funcție de scopul
final urmărit prin schema de tratament respectivă. Astfel, unele studii recente prezintă
27 posibilitatea extinderii ariei de aplicare a tratamentului cu preparate probiotice, considerând
că acestea inhibă chiar și tumorile de ficat, de colon, ale vezicii urinare și ale glandelor
29 mamare, scad riscul alergiilor și reduc nivelul colesterolului.

Este cunoscut, din cererea de brevet **CN 1985620 A0**, un procedeu de preparare a
31 unui acidifiant biologic dintr-un lichid fermentat de *Lactobacillus acidophilic*, acidifiantul
biologic este preparat printr-un procedeu chimic și biologic, prin utilizarea caracteristicii
33 biologice a bacteriilor lactice. Procesul de preparare include următoarele etape: cultivarea
semințelor de *Lactobacillus acidophilic*, cultivarea fermentației lichide, condiționarea pastei,
35 adăugarea purtătorilor, amestecare, uscare, zdrobire și obținerea acidifiantului biologic.
Acidifiantul biologic are atât funcția de acidifiant, cât și probiotic, și prezintă funcții de
37 însănătoșire a digestiei și absorbției la animale, completarea acidului gastric, promovarea
activității tractul gastrointestinal și creșterea ratei de conversie a hranei la animale.

39 De asemenea, documentul **DE 4032730 A1** prezintă un produs metabolic enzimatic
de bacterii lacto și bifido intestinale, pentru recuperarea concentrațiilor ridicate de L-(+)-acid
41 lactic și fermentarea unei mase vegetale.

Brevetul **RU 2371479 C1** descrie medicamente de uz uman și veterinar, și metodele
43 de obținere a acestora, și pot fi utilizate în domeniul biotehnologiei, medicinei și agriculturii.
Medicamentul probiotic complex include purtătorul în formă de enterosorbent poros și
45 celulele bacteriene eubiotice cu nutrienți și mediu de protecție, immobilizate pe enterosorbent.

Problema pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu de obținere a unui
47 preparat pe bază de lactobacili pentru refacerea florei intestinale.

RO 126942 B1

Procedeul de obținere a unui preparat pe bază de lactobacili, conform invenției, 1
înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că o tulpină de *Lactobacillus paracasei* se 3
cultivă submers, static, în sistem discontinuu, în flacoane Erlenmayer, pe un mediu nutritiv 3
care conține glucoză 1...2%, peptonă 0,5...1% și extract de drojdii 1...3%, în cultură statică, 5
la temperaturi de 37...40°C, la pH-ul care rezultă după sterilizarea mediului, timp de 5
46...48 h, obținându-se un preparat uscat de biomasă, care este supus centrifugării în trei 7
etape: prima etapă cu durata de 40...60 min, la o viteză de 3000 rpm și temperatura de 7
4...6°C, iar următoarele două etape cu durată de 40...60 min, la viteză de 5000 rpm și 9
temperatura de 4...6°C, iar între etapele de centrifugare, sedimentul de interes se spală cu 9
apă distilată, obținându-se preparatul de biomasă sub formă de pulbere.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje: 11

- obținerea unui preparat concentrat de biomasă de lactobacili cu o compoziție 13
microbiologică strict determinată, utilizându-se ca materii prime, aproape în totalitate, 13
produse naturale al cărui mod de condiționare permite identificarea prezenței anumitor 15
microelemente în concentrații cu implicații terapeutice bine determinate;

- preparatul prezintă o bună stabilitate în timp a activității specifice și poate fi înglobat 17
în diverse combinații, pentru obținerea unui produs cu activitate terapeutică superioară. 17

Procedeul de obținere a unui preparat pe bază de lactobacili, cu o compoziție 19
microbiologică și chimică strict determinată, conform invenției, constă în aceea că o tulpină 19
selecționată de *Lactobacillus paracasei* se cultivă submers, în cultură statică, discontinuă, 21
pe un mediu nutritiv conținând glucoză 1...2%, peptonă 0,5...1% și extract de drojdii 1...3%, 21
se obține apoi preparatul de biomasă sub formă uscată și se efectuează determinările 23
analitice, în scopul stabilirii precise a concentrațiilor microelementelor necesare manifestării 23
efectului terapeutic. Parametrii indicați pentru desfășurarea procesului de dezvoltare a 25
biomasei bacteriene sunt: temperatura de 37...40°C, pH-ul care rezultă după sterilizarea 25
mediului, durata de 46...48 h, cultura statică în flacoane Erlenmayer. Parametrii indicați 27
pentru obținerea preparatului microbial sub formă de pulbere sunt: parcurgerea a trei etape 27
de centrifugare, dintre care prima cu durată de 40...60 min, la o viteză de 3000 rpm și 29
temperatura de 4...6°C, iar următoarele două cu durata de 40...60 min, la viteza de 5000 rpm 29
și temperatura de 4...6°C. Între etapele de centrifugare, sedimentul de interes se spală cu 31
apă distilată, în scopul recuperării unei biomase bacteriene, liberă de orice urmă de mediu 31
de cultivare. Determinările analitice se efectuează prin spectroscopie de masă ICP-MS, cu 33
Perkin Elmer Elan DRC spectrofotometru sau prin FAAS. 33

În continuare, se prezintă un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu 35

a. Obținerea biomasei sub formă de preparat lichid

Se realizează în sistem discontinuu, prin cultivarea statică, submersă, a unei tulpini 37
de *Lactobacillus paracasei* din colecția USAMV-București, într-un mediu conținând glucoză 37
1...2%, peptonă 0,5...1% și extract de drojdii 1...3% (denumit Mediul A), timp de 46...48 h, 39
la temperatura de 37...40°C, în flacoane Erlenmayer menținute în incubator cu răcire. 39

Conservarea tulpinii s-a realizat exclusiv în mediu lichid, pe flacoane de 500 ml 41
conținând câte 100 ml Mediu A. Sterilizarea mediului de cultivare se efectuează la 110°C, 43
timp de 20 min și este urmată obligatoriu de o etapă de verificare a sterilității mediului, timp 43
de 24 h, la temperatura de 37...38°C. Inocularea fiecărui flacon s-a efectuat cu câte 7... 10 ml 45
cultură - conserv, urmând apoi incubarea statică a culturii, timp de 46...48 h, la temperatura 45
de 37...40°C și păstrarea ulterioară la frigider (+4°C), pentru perioade de maximum 1 lună.

RO 126942 B1

1 Multiplicarea celulară se obține prin cultivarea statică, submersă, a microorga-
nismului. Pornind de la un flacon conținând cultura conservată, se inoculează câte 3...5 ba-
3 loane de 500 ml, cu 100 ml Mediu A/balon, proporția de inoculare fiind de 8...10%.

5 Toate flacoanele însămânțate se pun la incubat pentru 46...48 h, la 37...40°C și apoi
se utilizează pentru obținerea biomasei. Etapa de multiplicare a biomasei reprezintă faza în
care se obține inoculul.

7 Pentru obținerea ulterioară a biomasei, se utilizează flacoane Erlenmayer cu volum
de 750 ml, conținând câte 200...250 ml Mediu A. Baloanele se instalează în incubator, la
9 temperatura de 37...40°C, prelevând probe periodice, timp de 46...48 h, pentru monitorizarea
dezvoltării biomasei. Printre parametrii utilizați pentru monitorizarea dezvoltării biomasei, se
11 pot enumera: aspectul micro- și microscopic al culturii, densitatea optică, consumul de
glucoză din mediul cultivat și producerea de acid lactic. După încheierea perioadei de
13 incubare, materialul biologic din toate flacoanele este reunit, în condiții aseptice, în vederea
condiționării preparatului sub formă de pulbere uscată și a efectuării determinărilor analitice.

15 *b. Obținerea biomasei sub formă de pulbere*

17 Mediul cultivat este supus unor etape de centrifugare, spălare și uscare, în scopul
recuperării celulelor bacteriene libere de orice urmă de mediu de cultivare. Etapa de
centrifugare implică parcurgerea a trei etape, dintre care prima cu durata de 40...60 min, la
19 o viteză de 3000 rpm și temperatura de 4...6°C, iar următoarele două cu durata de
40...60 min, la viteza de 5000 rpm și temperatura de 4...6°C. Între etapele de centrifugare,
21 sedimentul de interes se spală cu apă distilată. Preparatul centrifugat este apoi supus
operațiunilor de uscare la temperatura de 105°C și de mojarare.

23 *c. Determinarea analitică a microelementelor* cu implicații terapeutice prezente în
biomasa probiotică a urmărit concentrațiile de cupru, zinc, cobalt, cadmiu și fier și s-a
25 efectuat prin spectroscopie de masă ICP-MS, cu Perkin Elmer Elan DRC spectrofotometru
sau prin FAAS.

RO 126942 B1

Revendicare

1

Procedeu de obținere a unui preparat pe bază de lactobacili, **caracterizat prin aceea** 3
că o tulpină de *Lactobacillus paracasei* se cultivă submers, static, în sistem discontinuu, în 5
flacoane Erlenmayer, pe un mediu nutritiv care conține glucoză 1...2%, peptonă 0,5...1% și
extract de drojdii 1...3%, în cultură statică, la temperaturi de 37...40°C, la pH-ul care rezultă 7
după sterilizarea mediului, timp de 46...48 h, obținându-se un preparat uscat de biomasă,
care este supus centrifugării în trei etape: prima etapă cu durata de 40...60 min, la o viteză 9
de 3000 rpm și temperatura de 4...6°C, iar următoarele două etape cu durată de 40...60 min,
la viteză de 5000 rpm și temperatura de 4...6°C, iar între etapele de centrifugare, sedimentul 11
de interes se spală cu apă distilată, obținându-se preparatul de biomasă sub formă de
pulbere.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 344/2013