



MD 3298 F1 2007.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3298** ⁽¹³⁾ **F1**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 1/32 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2006 0138 (22) Data depozit: 2006.05.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2007.04.30, BOPI nr. 4/2007
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; COJOCARI Angela, MD; CODREANU Svetlana, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDI Liudmila, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de cultivare a *Propionibacterium freudenreichii s.s. shermanii*
CNM-PB-01**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la
procedeele de cultivare a *Propionibacterium*
freudenreichii s.s. shermanii CNM-PB-01 – pro-
ducătoare de porfirine, vitamina B₁₂ și lipaze
exogene și poate fi utilizată în industria farma-
ceutică.

Procedeul solicitat de cultivare a *Propionibac-*
terium freudenreichii s.s. shermanii CNM-PB-01
include inocularea microorganismelor pe un mediu
nutritiv, care conține (g/L): extract de porumb 80,0;

2
5 glucoză 14,0; (NH₄)₂SO₄ 3,5; CoCl₂·6H₂O 0,01;
5,6-dimetilbenzimidazol 0,03, extract de ciano-
bacterie *Nostoc linckia* CNM-CB-03 în soluție
alcoolică de 55%, care se adaugă în mediul nutritiv
la a treia zi de cultivare în cantitate de 0,2...1,0 g/L
10 recalculat la masa uscată. Totodată cultivarea
propionibacteriilor se efectuează timp de 7 zile la
temperatura de 28°C.

Revendicări: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la procedeele de cultivare a *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01 – producător de porfirine, vitamina B₁₂ și lipaze exogene și poate fi utilizată în industria farmaceutică.

5 Este cunoscut procedeul de cultivare a *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01 prin inoculare pe mediu optimizat ce conține: extract de porumb 80,0 g/L, glucoză 14 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3,5 g/L, CoCl₂ · 6H₂O 10,0 mg/L, 5,6 – dimetilbenzimidazol 30,0 mg/L, care se toarnă câte 50 mL în baloane Erlenmayer a câte 100 mL. Cultivarea se efectuează timp de 7 zile la temperatura de 28°C în termostat [1].

10 Dezavantajul procedurii dat constă în faptul că, asigurând o productivitate sporită a culturii, nu se caracterizează printr-o stabilitate a rezultatelor din cauza că componența extractului de porumb diferă de la partidă la partidă. Procedeul dat asigură sinteza a 16 mg/L cianocobalamină și 35,5 mg/L porfirine.

Soluția cea mai apropiată de invenție constă în utilizarea unui procedeu de cultivare a *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01 pe mediu cu extract de porumb și extract
15 apos din *Nostoc linckia* CNM-CB-03 cu următoarea componență: extract de porumb 80,0 g/L, glucoză 14 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3,5 g/L, CoCl₂ · 6H₂O 10,0 mg/L, 5,6 – dimetilbenzimidazol 30,0 mg/L, extract apos de *Nostoc linckia* CNM-CB-03 2,0...2,5 g/L, care se toarnă câte 50 mL în baloane Erlenmayer a câte 100 mL. Cultivarea se efectuează timp de 7 zile la temperatura de 28°C în termostat [2]. Extractul apos de *Nostoc linckia* CNM-CB-03 conține, %: proteine 5,6; glucide 42; ficobiline 6,2.

20 Procedeul dat, cu toate că asigură o productivitate sporită a culturii și un nivel înalt al porfirinelor – 72,6...72,9 mg/L (față de 35,5 mg/L la martor), nu influențează conținutul de vitamina B₁₂ și lipaze exogene.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unui procedeu de cultivare a *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01, care asigură un nivel înalt al conținutului
25 de vitamina B₁₂ în biomasă și al lipazelor și porfirinelor în mediul de cultură.

Procedeul de cultivare a *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01 include inocularea microorganismelor pe un mediu nutritiv, care conține, în g/L: extract de porumb 80,0; glucoză 14,0; (NH₄)₂SO₄ 3,5; CoCl₂ · 6H₂O 0,01; 5,6 – dimetilbenzimidazol 0,03, extract de cianobacterii *Nostoc linckia* CNM-CB-03 și cultivarea timp de 7 zile la temperatura de 28°C. Totodată în calitate de extract se
30 utilizează extractul de cianobacterii *Nostoc linckia* CNM-CB-03 în soluția alcoolică de 55%, care se adaugă în mediul nutritiv la a treia zi de cultivare în cantitate de 0,2...1,0 g/L prin recalcularea la masa uscată.

Extractul alcoolic de *Nostoc linckia* CNM-CB-03 se obține în modul următor. Biomasa de *Nostoc linckia* CNM-CB-03 (1 g biomasă absolut uscată) se separă de mediul nutritiv prin centrifugare timp de
35 10 min la 10 000 g, apoi se spală cu soluție izotonică de acetat de amoniu. Biomasa se supune dezintegrării ultrasonore, după care se resuspensionează în 50 mL alcool etilic de 55%. Amestecul se pune pe agitator la temperatura camerei pentru 10 ore, după care se centrifughează timp de 5 min la 10 000 g. Supernatantul se sterilizează și se utilizează în continuare pentru suplimentarea mediului nutritiv pentru cultivarea bacteriilor propionice.

40 Rezultatul invenției constă în faptul că se asigură un nivel înalt de cobalaminogeneză (130,6...148,8% față de cea mai apropiată soluție), porfirinogeneză (117,4...122,6% față de cea mai apropiată soluție) și sinteza a lipazelor exogene (146,2...185,3% față de cea mai apropiată soluție).

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

45 *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01 este inoculat în baloane Erlenmayer a câte 100 mL cu 50 mL mediu cu următoarea componență: extract de porumb 80,0 g/L, glucoză 14 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3,5 g/L, CoCl₂ · 6H₂O 10,0 mg/L, 5,6-dimetilbenzimidazol 30,0 mg/L. În a treia zi de cultivare la mediu se adaugă 0,2 g/L (recalculat la masă uscată) extract de cianobacterie *Nostoc linckia* CNM-CB-03 în soluție alcoolică de 55%. Cultivarea bacteriilor propionice se efectuează timp de 7 zile
50 din momentul inoculării la temperatura de 28°C în termostat. În ziua a 7-a de cultivare biomasa de *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01 se separă de lichidul de cultivare. În biomasă se determină cantitatea de B₁₂. Ea este de 22,2 mg/L, ceea ce constituie 130,6% față de cantitatea de vitamina B₁₂ în proba martor (cea mai apropiată soluție). În lichidul cultural se determină cantitatea de porfirine (86,4 mg/L sau 117,4% față de martor) și activitatea enzimelor lipolitice (3686 nmol/s-g sau
55 146,2% față de martor) (vezi tabelul).

Exemplul 2

Propionibacterium freudenreichii s.s. *shermanii* CNM-PB-01 este inoculată în baloane Erlenmayer a câte 100 mL cu 50 mL mediu cu următoarea componență: extract de porumb 80,0 g/L, glucoză 14 g/L (NH₄)₂SO₄ 3,5 g/L, CoCl₂ · 6H₂O 10,0 mg/L, 5,6-dimetilbenzimidazol 30,0 mg/L. În a treia zi de

MD 3298 F1 2007.04.30

4

cultivare la mediu se adaugă 0,6 g/L (recalculat la masă uscată) extract de cianobacterie *Nostoc linckia* CNM-CB-03 în soluție alcoolică de 55%, care se obține conform descrierii Ex.1. Cultivarea se efectuează timp de 7 zile din momentul inoculării la temperatura de 28°C în termostat. În ziua a 7-a biomasa de *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01 se separă de lichidul de cultivare. În

5 biomasa se determină cantitatea de B₁₂. Ea este de 25,3 mg/L, ceea ce constituie 148,8% față de cantitatea de vitamina B₁₂ în proba martor (cea mai apropiată soluție). În lichidul cultural se determină cantitatea de porfirine (90,3 mg/L sau 122,6% față de martor) și activitatea enzimelor lipolitice (4620 nmol/s·g sau 183,3% față de martor) (vezi tabelul).

Exemplul 3

10 *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01 este inoculată în baloane Erlenmayer a câte 100 mL cu 50 mL mediu cu următoarea componență: extract de porumb 80,0 g/L, glucoză 14 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3,5 g/L, CoCl₂ · 6H₂O 10,0 mg/L, 5,6-dimetilbenzimidazol 30,0 mg/L. În a treia zi de

15 cultivare la mediu se adaugă 1,0 g/L (recalculat la masă uscată) extract de cianobacterie *Nostoc linckia* CNM-CB-03 în soluție alcoolică de 55%, care se obține conform descrierii Ex.1. Cultivarea se efectuează timp de 7 zile din momentul inoculării la temperatura de 28°C în termostat. În ziua a 7-a biomasa de

20 *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01 se separă de lichidul de cultivare. În biomasa se determină cantitatea de B₁₂. Ea este de 24,0 mg/L, ceea ce constituie 141,2% față de cantitatea de vitamina B₁₂ în proba martor (cea mai apropiată soluție). În lichidul cultural se determină cantitatea de porfirine (88,0 mg/L sau 119,6 față de martor) și activitatea enzimelor lipolitice (3986 nmol/s·g sau 158,1% față de martor) (vezi tabelul).

Concentr. extr., g/L	Activitatea lipolitică		Vitamina B ₁₂		Porfirine	
	nmol/s·g	%M	mg/L	%M	mg/L	%M
Martor	2520±100	100,0	17,0±0,4	100,0	73,6±0,5	100,0
0,2	3686±94	146,2	22,2±0,1	130,6	86,4±0,3	117,4
0,6	4620±30	183,3	25,3±0,8	148,8	90,3±0,8	122,6
1,0	3986±112	158,1	24,0±0,2	141,2	88,0±0,1	119,6

25

(57) Revendicare:

Procedeu de cultivare a *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* CNM-PB-01, care include inocularea microorganismelor pe un mediu nutritiv, care conține, în g/L: extract de porumb 80,0; glucoză 14,0; (NH₄)₂SO₄ 3,5; CoCl₂·6H₂O 0,01; 5,6-dimetilbenzimidazol 0,03, extract de cianobacterie

30 *Nostoc linckia* CNM-CB-03 și cultivarea timp de 7 zile la temperatura de 28°C, **caracterizat prin aceea** că în calitate de extract se utilizează extract de cianobacterie *Nostoc linckia* CNM-CB-03 în soluție alcoolică de 55%, care se adaugă în mediul nutritiv la a treia zi de cultivare în cantitate de 0,2...1,0 g/L recalculat la masa uscată.

35

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 615 G2 1996.11.30
2. MD 387 G2 1996.01.31

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2006 0138		
(22) Data depozit: 2006.05.13		
(51) : Int.Cl: C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/32 (2006.01) Titlul : Procedeu de cultivare a Propionibacterium freudenreichii s.s. shermanii CNM-BP-01 (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : cultivarea propionibacteriilor, procedee de cultivarea, Nostoc linckia		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7)		
(MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”)		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 515 G2 1996.11.30	1
A	MD 387 G2 1996.01.31	1
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2007.02.19
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

RAPORT DE DOCUMENTARE

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