



MD 3658 F1 2008.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3658** ⁽¹³⁾ **F1**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/20* (2006.01)
C07F 15/06 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12P 17/10 (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 2008 0025 (22) Data depozit: 2008.01.29	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2008.07.31, BOPI nr. 7/2008
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: COTOVAIA Aliona, MD; BULIMAGA Valentina, MD; STARODUBȚEVA Elena, MD; GULEA Aurelian, MD; RUDIC Valeriu, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Mediu de cultură pentru *Propionibacterium freudenreichii s.s. shermanii*
(57) Rezumat:

1		2
Invenția se referă la biotehnologie, în special la un mediu de cultivare pentru <i>Propionibacterium freudenreichii s.s. shermanii</i> utilizat în industriile microbiologică și alimentară.	5	extract de porumb 70,0...80,0 glucoză 12,0...15,0 (NH ₄) ₂ SO ₄ 3,0...3,5 5,6-dimetilbenzimidazol 0,02...0,03 fac-[Co(NH ₂ CH ₂ CH ₂ O) ₃]-3H ₂ O
Mediul de cultură, conform invenției, conține extract de porumb, glucoză, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5,6-dimetilbenzimidazol și compusul coordinativ fac-[Co(NH ₂ CH ₂ CH ₂ O) ₃]-3H ₂ O sau fac-[Co(NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH) ₃](NO ₃) ₃ , în următorul raport al componentelor, în g/L:	10	sau fac-[Co(NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH) ₃](NO ₃) ₃ 0,010...0,020. Revendicări: 1

MD 3658 F1 2008.07.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un mediu de cultivare pentru *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* – sursă de porfirine și ciancobalamină, utilizate în industriile microbiologică și alimentară.

5 Este cunoscut mediul de cultură pentru *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* [1]. El are următoarea compoziție, în g/l: extract de porumb 70,0...80,0; glucoză 12,0...14,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0...3,5; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01...0,012; 5,6-dimetilbenzimidazol 0,02...0,03; extract de *Nostoc Linckia* 2,0...2,5.

Dezavantajul mediului cunoscut constă în utilizarea extractului de *Nostoc Linckia*, ceea ce duce la cheltuieli suplimentare legate de obținerea acestui extract (mediu nutritiv pentru cultivare, energie electrică etc.), precum și utilizarea sării anorganice $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ care este toxică la concentrații mai mari de 10 mg/l.

Mai este cunoscut un mediu de cultură pentru *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* [2], în care înlocuirea sării simple de cobalt $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ cu una complexă având compoziția $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6](\text{NO}_3)_2$, care este mai asimilabilă, este însoțită de scăderea toxicității și sporirea sintezei de cianocobalamină și porfirine cu respectiv 13,5% și 147,1%. Acest mediu are compoziția, în g/l: extract de porumb 70,0...80,0; glucoză 12,0...15,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0...3,5; 5,6-dimetilbenzimidazol 0,02...0,03; $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6](\text{NO}_3)_2$ 0,014...0,020. El asigură o productivitate de doar 9,6 g/l.

Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că el nu asigură o productivitate înaltă a cianocobalaminei.

20 Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unui mediu nou de cultură pentru *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* cu un conținut sporit de azot, care asigură o productivitate înaltă și o sinteză sporită a cianocobalaminei.

Esența invenției constă în aceea că se propune un mediu de cultură pentru *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii*, care include (g/l): extract de porumb, glucoză, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,6-dimetilbenzimidazol și o sursă de cobalt, caracterizat prin aceea că în calitate de sursă de cobalt la mediul de cultivare se adaugă compusul coordinativ fac- $[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1) sau fac- $[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3](\text{NO}_3)_3$ (2), în următorul raport cantitativ al componentelor, g/l:

extract de porumb	70,0...80,0
glucoză	12,0...15,0
30 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0...3,5;
5,6-dimetilbenzimidazol	0,02...0,03
fac- $[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1)	
sau	
fac- $[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3](\text{NO}_3)_3$ (2)	0,010...0,020.

35 Rezultatul constă în aceea că mediul de cultură propus asigură, în comparație cu cea mai apropiată soluție, obținerea unui nivel mai înalt al productivității culturii – 12,68 g/l (1) și 12,96 g/l (2), sau un spor cu 38,3% și 41,25%, respectiv, față de cea mai apropiată soluție (9,6 g/l) și sporirea sintezei de cianocobalamină cu 20,58 mg/l (1) și 21,31 mg/l (2) (cea mai apropiată soluție – 18,1 mg/l).

40 Rezultatul obținut se datorează faptului că compușii utilizați ai Co(III) conțin în calitate de ligand etanolamina, care servește în calitate de sursă de azot organic pentru formarea grupelor ciano din componența inelelor pirolice ale cianocobalaminei, prin intermediul cărora ele sunt legate cu atomul de cobalt prin legături coordinative. Etanolamina poate servi și ca sursă pentru sinteza părții nucleotidice a cianocobalaminei.

Exemple de realizare a invenției

45 Exemplul 1

Tulpina *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* se cultivă pe un mediu, având următoarea compoziție: extract de porumb 70,00 g/l, glucoză 14,00 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,00 g/l, $[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1) 0,011 g/l. Cultivarea are loc în baloane Erlenmayer a câte 100 ml cu 50 ml mediu, în termostat la temperatura de 28°C. În ziua a cincea se adaugă 0,02 g/l de 5,6-dimetilbenzimidazol. După 7 zile de cultivare cantitatea de cianocobalamină constituie 20,58 mg/l.

50 Exemplul 2

Tulpina *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* se cultivă în baloane Erlenmayer a câte 100 ml cu 50 ml mediu, având următoarea compoziție: extract de porumb 80,00 g/l, glucoză 14,00 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,50 g/l, în termostat la temperatura de 28°C. În ziua a treia de cultivare se adaugă 0,012 g/l de compus coordinativ $[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3](\text{NO}_3)_3$ (2). În ziua a cincea de cultivare se adaugă 0,03 g/l de 5,6-dimetilbenzimidazol. După 7 zile de cultivare cantitatea de cianocobalamină constituie 21,31 mg/l.

55 Datele referitoare la productivitatea *Propionibacterium freudenreichii* s.s. *shermanii* la cultivarea pe medii de cultură cu adaos de compuși coordinativi ai Co(III) sunt date în tabel.

60

MD 3658 F1 2008.07.31

4

Nr.	Compusul coordinativ	Concentrație, g/l	Biomasă, g/l	Cianocobalamină, mg/l
1	$[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,011	12,68	20,58
2	$[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3](\text{NO}_3)_3$	0,012	12,96	21,31
	Martor	0,014	9,6	18,1
	(Cea mai apropiată soluție – $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6](\text{NO}_3)_2$)			

- 5 Așadar, mediul propus asigură un nivel înalt al productivității culturii: 12,68 g/l (1) și 12,96 g/l (2) de biomasă absolut uscată (sau un spor cu 38,3% și 41,25%, respectiv, față de cea mai apropiată soluție) și cultura crescută pe mediul dat sintetizează o cantitate mai mare de cianocobalamină – 20,58 mg/l (1) și 21,31 mg/l (2) în comparație cu cea mai apropiată soluție ($[\text{Co}(\text{NH}_3)_6](\text{NO}_3)_2$) – 9,6 mg/l; mediul propus asigură o productivitate înaltă a culturii crescute pe el.

10

(57) Revendicări:

- 15 Mediu de cultură pentru *Propionibacterium freudenreichii s.s. shermanii*, care conține extract de porumb, glucoză, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,6-dimetilbenzimidazol și o sursă de cobalt în formă de compus coordinativ, **caracterizat prin aceea că** în calitate de sursă de cobalt conține compusul coordinativ fac- $[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sau fac- $[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3](\text{NO}_3)_3$, în următorul raport al componentelor, în g/L:
- | | | |
|----|--|---------------|
| 20 | extract de porumb | 70,0...80,0 |
| | glucoză | 12,0...15,0 |
| | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 3,0...3,5 |
| | 5,6-dimetilbenzimidazol | 0,02...0,03 |
| | fac- $[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | |
| | sau | |
| 25 | fac- $[\text{Co}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3](\text{NO}_3)_3$ | 0,010...0,020 |

30

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 387 G2 1996.01.30
2. MD 388 G2 1996.01.30

Director Departament:

JOVMIR Tudor

Examinator:

COLESNIC Inesa

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2008 0025		
(22) Data depozit: 2008.01.29		
(51) : Int.Cl: <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C07F 15/06</i> (2006.01) <i>C12R 1/01</i> (2006.01) <i>C12P 17/10</i> (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul : Mediu de cultură pentru <i>Propionobacterium freudenreichii s.s. shermanii</i> (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : cianocobalamină, vitamina B ₁₂ , cobalt, compus coordinativ, цианокобаламин, кобальт, координационное соединение, витамин B ₁₂		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.		
(MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”) MD 1993-2008 EA 1996-2008 SU 1924-1994		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 285 G2 1995.09.30	1
A	MD 3298 G2 2007.04.30	1
A	MD 615 G2 1996.11.30	1
A	MD 389 G2 1996.01.30	1
A	SU 11186572 A 1984.10.15	1
A	SU 1521769 A1 1989.11.15	1
A	MD 387 G2 1996.01.30	1
A	MD 388 G2 1996.01.30	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		2008.05.26
Examinatorul		Colesnic Inesa

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