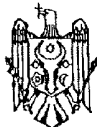




MD 2313 C2 2003.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2313** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷: C 12 P 1/04

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2001 0162 (22) Data depozit: 2001.05.25 (41) Data publicării cererii: 2003.02.28, BOPI nr. 2/2003	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.11.30, BOPI nr. 11/2003
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; LUPAȘCU Tudor, MD; NARTEA Ecaterina, MD; CODREANU Svetlana, MD (73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) **Procedeu de obținere a vitaminei B₁₂**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la procedeele de obținere a vitaminei B₁₂, care poate fi utilizată în zootehnie și medicină.

Procedeu de obținere a vitaminei B₁₂ include cultivarea bacteriilor propionice în condiții facultativ aerobe în decurs de 7 zile pe un mediu nutritiv cu pH 6,8 ... 7,0 conținând extract de porumb, glucoză, (NH₄)₂SO₄, CoCl₂·6H₂O, un mineral natural cu conținut sporit de carbonați și 5,6-

2
5 dimetilbenzimidazol, ultimul fiind introdus în mediu în a 5-a zi de cultivare. După 7 zile de cultivare biomasa obținută se separă de mediu și din ea se extrage vitamina B₁₂.

10 Rezultatul invenției constă în asigurarea stabilității pH-ului mediului și în evitarea infectării culturii bacteriene.

Revendicări: 1

MD 2313 C2 2003.11.30

MD 2313 C2 2003.11.30

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la procedeele de obținere a vitaminei B₁₂ care poate fi utilizată în zootehnie și medicină.

- 5 Este cunoscut procedeul industrial de sinteză a vitaminei B₁₂, bazat pe folosirea în calitate de producător al asociațiilor de microorganisme, în special a metanobacteriilor, care sunt cultivate în condiții strict anaerobe pe deșeuri de la fabricile de alcool [1].

Dezavantajul procedeeului dat constă în productivitatea joasă a metanobacteriilor și faptul că produsul final poate fi folosit numai în zootehnie.

- 10 Mai este cunoscut un procedeu de obținere a vitaminei B₁₂ cu ajutorul bacteriilor propionice. Acest procedeu include pregătirea materialului de însămânțat prin înmulțirea consecutivă a microorganismelor timp de 16 zile, cultivarea lor ulterioară în două faze (I – anaerobă, II – aerobă) la t°=30°C, pH=6,8...7,0 pe mediul nutritiv ce conține extract de porumb, glucoză, (NH₄)₂SO₄, CoCl₂ · 6H₂O, 5,6 dimetilbenzimidazol (care se adaugă după 67 ore de cultivare), iar pH-ul acid, cauzat de sinteza acidului propionic, este neutralizat prin adăugarea zilnică a soluției de 40% de bicarbonat de sodiu [2].

Dezavantajul procedeeului dat constă în instabilitatea pH-ului mediului, iar adăugarea zilnică a neutralizantului (NaHCO₃) mărește probabilitatea infectării culturii.

- 20 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de obținere a vitaminei B₁₂, care ar asigura stabilitatea pH-ului mediului și ar evita infectarea culturii, cauzată de adăugarea zilnică a neutralizantului.

Procedeul de obținere a vitaminei B₁₂ include cultivarea bacteriilor propionice în condiții facultativ aerobe la t°=28...30°C pe un mediu nutritiv cu pH 6,8...7,0 conținând (NH₄)₂SO₄, CoCl₂ · 6H₂O, 5,6 dimetilbenzimidazol și un agent de neutralizare a mediului, separarea biomasei obținute și extragerea vitaminei B₁₂ din biomasa separată.

- 25 Totodată, cultivarea bacteriilor propionice se efectuează în decurs de 7 zile, 5,6 dimetilbenzimidazolul se adaugă la a 5-a zi de cultivare, iar în calitate de agent de neutralizare a mediului se utilizează un mineral natural cu conținut sporit de carbonați, având următorul raport al ingredientelor, g/L de apă de robinet:

extract de porumb	60,0
glucoză	35,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,01
5,6 dimetilbenzimidazol	0,02
minerale naturale	5,0...10,0

- 30 Rezultatul invenției constă în:

- asigurarea stabilității pH-ului mediului;
- evitarea infectării culturii.

- 35 Rezultatul obținut este cauzat de faptul că la adăugarea mineralelor naturale insolubile se mărește suprafața de contact a neutralizantului cu mediul de cultură, ceea ce conduce la asigurarea stabilității pH-ului. În plus, adăugarea neutralizantului se efectuează o singură dată, ceea ce evită infectarea culturii.

Exemplu de realizare a invenției

- 40 Se pregătește mediul cu următoarea componență (g/L apă de robinet): extract de porumb – 60,0, glucoză – 35,5, (NH₄)₂SO₄ – 3,5, CoCl₂ · 6H₂O – 0,01, marmură – 5 g/L, având pH=6,8. Se distribuie câte 50 mL de mediu în baloane Erlenmayer a câte 100 mL și se inoculează 3 ml de material de însămânțat (tulpina *Propionibacterium freudenreichii s.a. shermanii*), pregătit prin înmulțirea consecutivă a microorganismelor în mediul lichid cu aceeași componență. Cultivarea se petrece în termostaț în condiții facultativ aerobe la t=30°C. La ziua a cincea de cultivare se adaugă 5,6 dimetilbenzimidazol – 0,02 g/L.

- 45 După 7 zile de cultivare, biomasa obținută se separă de mediu prin centrifugare, se resuspendează în apă distilată, vitamina B₁₂ se extrage și se determină conform metodei spectrofotometrice cunoscute. Cantitatea de vitamină constituie 8,4 mg/L.

S-au făcut și alte experiențe asemănătoare care au demonstrat că ceilalți agenți de neutralizare propuși în invenție (calcar, cretă, dolomită) au același efect asupra rezultatului final.

- 50 Analogic acestui exemplu au fost efectuate și alte experiențe, care au contribuit la determinarea cantităților limită ale neutralizantului.

MD 2313 C2 2003.11.30

4

(57) Revendicare:

5 Procedeu de obținere a vitaminei B₁₂, care include cultivarea bacteriilor propionice în condiții facultativ aerobe pe un mediu nutritiv cu pH 6,8...7,0 conținând extract de porumb, glucoză, (NH₄)₂SO₄, CoCl₂·6H₂O, 5,6-dimetilbenzimidazol și un agent de neutralizare a mediului, separarea biomasei obținute și extragerea vitaminei B₁₂ din biomasa separată, **caracterizat prin aceea că**
10 cultivarea bacteriilor propionice se efectuează în decurs de 7 zile, 5,6-dimetilbenzimidazolul se introduce în mediu în a 5-a zi de cultivare, iar în calitate de agent de neutralizare a mediului se utilizează un mineral natural cu conținut sporit de carbonați, mediul având următorul raport al ingredientelor, g/L de apă de robinet:

15	extract de porumb	60,00
	glucoză	35,50
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,50
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01
	5,6-dimetilbenzimidazol	0,02
20	mineral natural	5,00...10,00.

25

(56) Referințe bibliografice:

1. Быховский В.Я. Микробиологический синтез витамина B₁₂. Москва, 1984, с. 42
2. Быховский В.Я., Зайцева Н.И. Микробиологический синтез тетрапиррольных соединений. Биологическая химия, 1989, т. 32, с. 139-140

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2001 0162	
(22) Data depozit: 2001.05.25	
(51) ⁷ : C 12 P 1/04 Alți indici de clasificare: C 12 N 1/20, C 12 P 19/42 (54) Titlul : Procedeu de sinteză a vitaminei B12 (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : a) limba română: sinteză vit. B12, procedee de sinteză b) limba engleză: synthesis vit. B12, methods synthesis vit. B12	
I. Minimul de documente consultate (sistemă clasificării și indici de clasificare Int. Cl.- 7)	
Int. Cl. ⁷ C 12 P 1/04	
II. Literatura tehnico-științifică și de brevete consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
1. Быховский В.Я. Микробиологический синтез витамина В 12. Москваб 1984, с. 42 2. Быховский В.Я., Зайцева Н.И. Микробиологический синтез тетрапирольных соединений. Биологическая химия. 1987, т. 32, с. 139-140 3. РЖ ВИНТИ, «Биология», «Медицина»	
III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD și termen de documentare)	
1. MD 2. ФИПС, RU 3. Espacenet the European Patent Office 4. EA - №1, 1996 - №3, 2003 5. Certificate de autori SU (fondul bibliotecii BRIT)	

A 2001 0162

IV. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 460 G2 1995.07.12	1
A	MD 749 G2 1997.06.30	1
A	US 6492141 2002.12.10	16
A	US 19830223	
☐ Documentele următoare sunt indicate în rubrica IV		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozit, dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
E - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat de unul singur
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate sau 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 când 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 divulgare		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2003.06.05
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

032/FC/05.0 / A/2/I/