



MD 3298 G2 2007.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 3298 (13) G2
(51) Int. Cl.: C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/32 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2006 0138 (22) Data depozit: 2006.05.13</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2007.04.30, BOPI nr. 4/2007</p>
<p>(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</p>	

(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 – producătoare de porfirine, vitamina B₁₂ și lipaze exogene și poate fi utilizată în industria farmaceutică.

Procedeul solicitat de cultivare a *Propionibacterium 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 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. Totodată cultivarea propionibacteriilor se efectuează timp de 7 zile la temperatura de 28°C.
10 Revendicări: 1

15

MD 3298 G2 2007.04.30

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 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 de vitamina B₁₂ în biomasă și al lipazelor și porfirinelor în mediul de cultură.

25 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 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.

30 Extractul alcoolic de *Nostoc linckia* CNM-CB-03 se obține în modul următor. Biomasă de *Nostoc linckia* CNM-CB-03 (1 g biomasă absolut uscată) se separă de mediul nutritiv prin centrifugare timp de 10 min la 10 000 g, apoi se spală cu soluție izotonică de acetat de amoniu. Biomasă se supune dezintegrării ultrasonore, după care se resuspensionază 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 din momentul inoculării la temperatura de 28°C în termostat. În ziua a 7-a de cultivare biomasă 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 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 G2 2007.04.30

4

5 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 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 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 *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

(57) Revendicare:

25 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 *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.

(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