

ROMANIA
OFICIUL DE STAT
PENTRU
INVENȚII ȘI MĂRCI

BREVET DE INVENȚIE ⁽¹⁹⁾ RO ⁽¹¹⁾ 105468
(12) **DESCRIEREA INVENȚIEI**

(21) Cerere de brevet nr.: **139381**

(22) Data înregistrării : **24.04.89**

(61) Complementară la invenția
brevet nr. :

(45) Data publicării : **23.01.95**

(51) Int. Cl.⁴: **C 12 R 1/01**

(86) Cerere internațională(PCT)
nr.: data:

(87) Publicarea cererii internaționale
nr.: data:

(89)

(30) Prioritate :

(32) Data :

(33) Țara :

(31) Certificat nr.

(71) Solicitant; (73) Titular: Intreprinderea de Antibiotice, Iași

(72) Inventator: biolog Ștefănescu Gheorghe, biolog Nedea Mircea,
biolog Caraghin Maria, Iași

(54) **Tulpină *Propionibacterium shermanii* V.D. 1989**

(57) **Rezumat**

Tulpina, conform invenției, este înregistrată în Colecția de bacterii și fulgi de interes industrial a Institutului de științe biologice, București la nr.2011; pe mediile de cultură se prezintă sub formă de celule coco-bacilare, de dimensiuni 1/0,5/μ, dispuse în lamă ca celule în diplo, lanțuri scurte, litere chinezești, pe suprafața mediului solid de cultură formează colonii de 1 ... 3 mm cu baza

rotundă, profil cilindric - emisferic și culoare crem - roz, pe medii lichide de cultură aerotolerantă, tulbură ușor lichidul de cultură începând cu treimea a doua din înălțimea coloanei de lichid, prezintă sediment accentuat de culoare crem-roz, are capacitate de biosinteză a vitaminei B₁₂ de 25 μg/ml și la puritate de 95 ... 99%.

Invenția se referă la o tulpină *Propionibacterium shermanii* V.D. 1989, folosită în industria farmaceutică și alimentară având un potențial crescut de biosinteză a vitaminei B₁₂.

Este cunoscut un procedeu de izolare a microorganismului *Propionibacterium lacticum* ce constă în izolarea tulpinilor de bacterii de pe substraturi reactivitate de brânză și șvayter, în condiții aerobe, cultivarea tulpinilor izolate pe un mediu agarizat solid prin treceri repetate și termostatare timp de 7 ... 14 zile pentru o trecere, după care, în final, tulpinile izolate și purificate se cultivă pe mediu lichid, în vederea determinării.

Scopul prezentei invenții este de a obține o tulpină bacteriană cu un nivel crescut de biosinteză și cu un înalt grad de puritate.

Problema pe care o rezolvă invenția sunt caracterele morfologice, taxonomice și de cultură specifice tulpinii respective.

Tulpina, conform invenției, înregistrată în colecția de Bacterii și fungi de interes industrial a Institutului de științe biologice, București, la nr.2011, pe mediile de

cultură se prezintă sub formă de celule coco-bacilare de dimensiuni 1/0,5 μ, dispuse în lamă ca celule în diplo, lanțuri scurte, litere chinezești; pe suprafața mediului solid de cultură formează colonii de 1 ... 3 mm, cu baza rotundă, profil cilindric - emisferic și culoare crem - roz, pe medii lichide de cultură aerotolerantă, tulbură ușor lichidul de cultură începând cu treimea a doua din înălțimea coloanei de lichid, prezintă sediment accentuat de culoare crem - roz, are capacitate de biosinteză a vitaminei B₁₂ de 25 μg/ml și o puritate de 95 ... 99%.

Pentru obținerea tulpinii *Propionibacterium shermanii* V.D. - 1989 se folosește tulpina de tip sălbatic *Propionibacterium shermanii* V.D. - 1987, înregistrată în aceeași colecție, la nr.2012. Tulpina *Propionibacterium shermanii* V.D. - 1989 face parte din Fam. *Propionibacteriaceae*, genul *Propionibacterium*, specia *freudenreichii*, ssp. *shermanii*.

În tabelele 1, 2, 3, și 4 se dau caracterele microscopice, morfologice, culturale și fiziologice, în comparație cu tulpina parentală.

Tabelul 1

Caracteristici microscopice	Tulpina parentală <i>Propionibacterium shermanii</i> V.D. - 1987	Tulpina selecționată <i>Propionibacterium shermanii</i> V.D. - 1989
Forma celulei Dimensiunea celulei Disponere în lamă Colorația celulei Formarea de spori	coco-bacili 1/0,5 μ diplo, lanțuri scurte Gram pozitivă, slabă Nu formează spori	coco-bacili 1/0,5 μ diplo, lanțuri scurte, litere chinezești Gram pozitivă, intensă Nu formează spori

Tabelul 2

Caracteristici morfologice	Tulpina parentală <i>Propionibacterium shermanii</i> V.D. - 1987	Tulpina selecționată <i>Propionibacterium shermanii</i> V.D. - 1989
Dimensiunea coloniei	cca 1 mm	1 ... 3 mm

Tabelul 2 (continuare)

Caracteristici morfologice	Tulpina parentală <i>Propionibacterium shermanii</i> V.D. - 1987	Tulpina selecționată <i>Propionibacterium shermanii</i> V.D. - 1989
Forma coloniei Profilul coloniei Marginea coloniei Aspectul coloniei Culoarea coloniei Aderența la substrat	rotundă emisferic întreagă lucios alb-crem slabă	rotundă cilindric-emisferic întreagă lucios crem-roz slabă

Tabelul 3

Caracteristici culturale pe mediu lichid	Tulpina parentală <i>Propionibacterium shermanii</i> V.D. - 1987	Tulpina selecționată <i>Propionibacterium shermanii</i> V.D. - 1989
Grad de tulburare a mediului Comportament față de O ₂ Formare de sediment Pigmentarea sedimentului Formarea de peliculă la suprafața mediului	mediu limpede anaerobă sediment slab galben-crem nu formează peliculă	mediu ușor tulbure aerotolerantă sediment accentuat crem-roz nu formează peliculă

Tabelul 4

Caracteristici fiziologice	Tulpina parentală <i>Propionibacterium shermanii</i> S.V. - 1987	Tulpina selecționată <i>Propionibacterium shermanii</i> V.D. - 1989
Reducere nitrați	-	-
Producere CO ₂	++	+++
Acidifierea mediului	+	+++
Producere H ₂ S	-	-
Activitate celulozolică	-	-
Temperatură optimă de creștere	30°C ± 1°C	30°C ± 1°C
pH optim de dezvoltare	6,5 ... 6,8	6,5 ... 6,8
Capacitate de biosinteză a vitaminei B ₁₂	15 µg/ml	25 µg/ml

Ca procedeu de obținere se procedează la treceri succesive de pe mediu solid de izolare pe mediul solid de selecție, urmate de selecția plus-variantelor tulpinei de tip sălbatic.

Mediul A folosit conține extract de porumb 2 g s.u., dextroză 3 g s.r., fosfat mo-

nopotasic 0,4 g, clorură de cobalt 0,001 g și ulei de floarea soarelui 0,2 g. Mediul B folosit conține extract de porumb 2 g s.u., dextroză 3 g s.r., fosfat monopotasic 0,4 g, clorură de cobalt 0,001 g și agar-agar 20g. Ingredientele se aduc la 100 ml cu apă de robinet, după care se sterilizează la 115 ...

... 120°C, timp de 30 min.

Creșterea culturii pe mediul lichid A se face în flacoane sterile de 500 ml mediu, prevăzute cu dop tare de vată și tifon, înșămânțate cu o ansă de cultură de *Propionibacterium sp.* V.D. - 1987, prelevată de suprafața conservului vegetativ, care se țin la termostat la temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, timp de 72 ... 96 h, după care se fac treceri pe suprafața mediului solid B, turnat în plăci Petri sterile, cu diametrul de 120 mm, care se țin la termostat, în aceleași condiții de temperatură, timp de 14 ... 21 zile, pentru dezvoltarea coloniilor tipice.

Sunt apoi preluate cu ansa un număr de 100 colonii tipice, de culoare crem-roz, care se înămânțează în bandă ondulată pe suprafața mediului agarizat B, turnat în eprubete înclinate de 20/40 mm, prevăzute cu dop tare de vată și tifon.

Selecția coloniilor stocate pe eprubete se face în urma determinării potențialului de biosinteză a vitaminei B₁₂, în finalul unei etape de selecție reținându-se, pentru treceri ulterioare pe mediile A și B, un număr de 2 ... 4 colonii, având cel mai ridicat nivel de biosinteză.

Determinarea potențialului de biosinteză a vitaminei B₁₂ se face prin cultivarea coloniilor stocate pe mediul lichid C, având următoarea compoziție, în gând: extract de porumb 4,5 g s.u.; dextroză 7 g s.r.; fosfat monopotasic 1,4 g; clorură de cobalt 0,005 g; clorură de magneziu 0,05 g; pantotenat de calciu 0,05 g; cistină 0,0001 g; 5,6 - dimetilbenzimidazol 0,001 g și ulei rafinat de floarea soarelui 0,125 g; pH-ul este 6,6 ... 6,8, corectat cu NaOH și sterilizat în etuvă, timp de 30 min, la temperatura 115 ... 120°C.

Fiecare din coloniile stocate este cultivată și crescută timp de 110 h în flacoane sterile de 500 ml cu 250 ml mediu C, la termostat, la temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, după care se face determinarea potenția-

lului de biosinteză prin extracția vitaminei B₁₂ din biomasă, prin tehnicile cunoscute și citirea titrului la spectrofometru în lungimea de undă de 550 nm.

5 După un număr de 8 ... 10 treceri succesive ale coloniilor selecționate pe mediile A și B după trecere stocându-se un număr de 100 colonii din care sunt selecționate 2 ... 4 colonii având cel mai ridicat nivel de biosinteză a vitaminei B₁₂, determinat pe 10 mediul C, se obține un material biologic nou, având un potențial de biosinteză maxim stabil de 22 ... 25 μg/ml vitaminei B₁₂. Acest material biologic, păstrat sub 15 formă de conserv vegetativ pe suprafața mediului solid B, în eprubete înclinate de 20/40 mm, constituie tulpina selecționată *Propionibacterium shermanii* V.D. - 1989.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

20 - realizează o tulpină selecționată de *Propionibacterium shermanii* V.D. - 1989, cu o capacitate de biosinteză a vitaminei B₁₂ de 25 μg/ml;

25 - reprezintă un material biologic cu o mare valoare aplicativă prin posibilitățile pe care le oferă în urma prelucrărilor genetice prin metode elastice și modernr, cum ar fi recombinare, mutageneză, fuziune de protoplaști, etc;

30 - oferă un produs de biosinteză cu un grad înalt de puritate, de 95 ... 99% vitaminei B₁₂;

35 - tulpina selecționată poate fi utilizată în industria de medicamente;

40 - tulpina selecționată poate fi utilizată în industria brânzeturilor de tip șvaițer, pentru obținerea unui produs calitativ superior, cu o pastă elastică și aromată și cu un conținut crescut de vitaminei B₁₂.

Revendicare

45 Tulpina *Propionibacterium shermanii* V.D. - 1989, caracterizată prin aceea că este înregistrată în Colecția de Bacterii și fungi de interes industrial a Institutului de

științe Biologice, București la nr.2011, pe mediile de cultură se prezintă sub formă de celule coco-bacilare, de dimensiuni 1/0,5 μ , dispuse în lamă ca celule în diplo, lanțuri scurte, litere chinezești, pe suprafața mediului solid de cultură formează colonii de 1 ... 3 mm cu baza rotundă, profil cilindric - emisferic și cu-

5 loare crem-roz, pe medii lichide de cultură aerotolerantă, tulbură ușor lichidul de cultură începând cu treimea a doua din înălțimea coloanei de lichid, prezintă sediment accentuat de culoare crem-roz, are capacitate de biosinteză a vitaminei B₁₂ de 25 μ g/ml și o puritate de 95 ... 99%.

(56)Referințe bibliografice

Brevet RO nr.99453

Președintele comisiei de invenții: ing.Panin Elena
Examinator: farm.Pentelescu Elena