



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00344**

(22) Data de depozit: **18/05/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/03/2019** BOPI nr. 3/2019

(41) Data publicării cererii:
26/02/2016 BOPI nr. 2/2016

(73) Titular:
• **CORAX-BIONER CEU S.A.**,
PIAȚA LIBERTĂȚII NR.1, ET.3, CAM.319,
MIERCUREA-CIUC, HR, RO

(72) Inventatori:
• **ABRAHAM BEATA**,
STR. MIHAI EMINESCU NR. 1, SC.A, AP.22,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **LANYI SZABOLCS**, STR.MIKO NR.21,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **MATHE ISTVAN**,
PIAȚA MAJLATH GUSZTAV KAROLY NR.4,
SC.A, AP.24, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **LASLO EVA**, BD. FRĂȚIEI NR. 2, SC. E,
AP. 18, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **ORBAN KALMAN CSONGOR**,
CART. FLORILOR, BL, C, SC. 2, AP. 6,
SOVATA, MS, RO;

• **BODOR ZSOLT**, BD. TIMIȘOAREI NR. 49,
AP. 18, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **TANCZOS SZIDONIA**, NR. 590,
SÂNCRĂIENI, HR, RO;
• **FEJER KIRALY GERGELY**, NR. 701,
CIUMANI, HR, RO;
• **KONCZ MIHALY**, STR. OITUZ NR.8
44/A/6, TÂRGU SECUIESC, CV, RO;
• **TORO SZABOLCS**, STR. SOMEȘULUI US
19, SATU MARE, SM, RO;
• **FUNKENHAUSER BERNADETT**,
ALEEA CLĂBUCET NR. 11, 4/90,
SATU MARE, SM, RO;
• **DOBRI EMOKE**, STR. PRINCIPALĂ
NR. 619, SATUL TURIA, CV, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 119062 B1; RO/EP 2582851 T2

(54) **TULPINĂ DE LACTOBACILLUS PLANTARUM SUBSP.
PLANTARUM UTILIZATĂ ÎN PROCESUL DE ÎNSILOZARE
A PLANTELOR FURAJERE**



1 Invenția se referă la o tulpină bacteriană lactică, *Lactobacillus plantarum* subs.
2 *plantarum*, care poate fi utilizată în procesul de însilozare a plantelor furajere.

3 Bacteriile lactice cuprind o largă varietate de genuri cu un număr considerabil de specii,
4 cu rol în diferite procese biotehnologice. Aceste microorganisme sunt gram-pozitive, catalazo-
5 negative și se dezvoltă în condiții de microaerofile sau sunt strict anaerobe și nu formează
6 spori (Banu, 2008). Speciile de bacterii lactice pot fi grupate în funcție de mecanismul de
7 fermentare a substratului glucidic și de natura produșilor finali. Se deosebesc specii homo-
8 fermentative, realizând conversia zaharurilor pe calea glicolizei, calea Embden-Meyerhof-
9 Parnas, și specii heterofermentative, numite și heterolactice, realizând conversia zaharurilor,
10 hexozelor și pentozelor pe calea ciclului pentozofosfat (Zarnea și Popescu, 2012).

11 Bacteriile lactice au un rol important în procesele fermentative ale plantelor utilizabile
12 la obținerea furajelor însilozate, datorită diferitelor proprietăți: produc diferiți acizi organici,
13 în principal acid lactic, dar și acid acetic, alcool, CO₂, iar unele bacterii lactice sunt antago-
14 niste față de alte microorganisme prin producerea bacteriocinelor și peroxidului de hidrogen
15 (H₂O₂). Antagonismul lor se poate manifesta și printr-o competiție nutrițională (Costin, 2005).
16 Prin reducerea pH-ului, se inhibă proliferarea microorganismelor patogene și de alterare, per-
17 mițând conservarea valorii nutritive a furajului.

18 Se cunosc mai multe proceduri de însilozare unde se aplică ca aditivi biologici
19 bacterii lactice cu rol benefic asupra fermentației.

20 Brevetul **RO 119062 B1** descrie un procedeu de conservare a plantelor furajere greu
21 însilozabile, cum ar fi lucerna, cocenii de porumb și tăiteii de sfeclă epuizați, prin utilizarea
22 unei noi tulpini de *Lactobacillus plantarum* CGMGB-3. Tulpina a fost izolată dintr-un furaj
23 natural de porumb, în fază incipientă de fermentație, și prezintă următoarele caracteristici:
24 celule sub formă de bastonașe, gram+, imobile, depuse izolat în perechi sau grămezi, este
25 catalazo-negativă, facultativ anaerobă, homofermentativă, dezvoltând pe mediu specific
26 solidificat colonii de tip "smooth", rotunde, bombate, lenticulare, de culoare crem-bej deschis.
27 Prin fermentare, formează acid din: glucoză, manoză, manitol, maltoză și lactoză.

28 Brevetul **RO/EP 2582851 T2** descrie o tulpină bacteriană de *Lactobacillus plantarum*
29 S KKP 2021p, utilizată în obținerea unui preparat sub formă de granule sau pulbere, destinat
30 însilozării furajelor grosiere. Tulpina a fost izolată din plante de porumb fermentate spontan
31 și se caracterizează prin: colonii de culoare albă până la crem, celulele în formă de tije scurte
32 care apar individual, în perechi sau în lanțuri, nu produc spori și sunt gram+. Prezintă
33 activitate antibacteriană foarte mare împotriva bacteriilor patogene din genul *Salmonella* și
34 *Listeria*, *Escherichia coli* și *Clostridium perfringens*, care sunt adesea prezente în produsele
35 agricole, cultivate pe terenuri agricole fertilizate organic, în special cu gunoi de grajd lichid.

36 Brevetul **EP 0369198 B1** descrie un procedeu de conservare a plantelor furajere prin
37 utilizarea tulpinii bacteriene *Lactobacillus plantarum* DSM 4904, împreună cu o enzimă, cum
38 ar fi celulaza, și aditivi, precum acizii organici sau sărurile lor. Acest brevet descrie procedeul
39 obținerii unui furaj fermentat cu valori nutriționale îmbunătățite și cu efecte benefice asupra
40 sănătății animalelor.

41 Brevetul **RO 85921** descrie un procedeu utilizabil pentru însilozarea plantelor furajere
42 în care, înainte de însilozare, se folosește un factor care degradează polizaharidele în zaha-
43 ruri fermentescibile, constituit din enzime (celulază și amilază fungică) și un complex de
44 bacterii (bacterii gram-negative din familia *Enterobacteriaceae*).

45 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția o reprezintă izolarea unei tulpini bacte-
riene lactice benefică în promovarea procesului de însilozare a plantelor furajere.

Tulpina de <i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i> , a fost izolată din probe de cașcaval obținut prin fermentare spontană, și este depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta sub numărul NCAIM (P) B 001436, fiind destinată utilizării în procesul de însilozare a plantelor furajere. Tulpina conform invenției prezintă rezistența la tetraciclină, cloramfenicol, kanamicină, streptomycină și gentamicină, și este caracterizată prin capacitatea de a fermenta N-acetil-D-glucozamina cu formare de acid lactic și acid acetic.	1 3 5 7
Avantajul obținut prin realizarea invenției îl constituie realizarea unui furaj cu calități nutritive superioare, datorită producerii de acid lactic și acid acetic de către noua tulpină bacteriană lactică.	9
În continuare, se prezintă un exemplu de realizare a invenției.	11
Faza 1. Izolarea și identificarea tulpinii bacteriene lactice	
Izolarea tulpinii bacteriene lactice s-a realizat din produs fermentat tradițional, și anume cașcaval pe mediu nutritiv selectiv MRS. Compoziția exactă a mediului MRS în gram/litru: peptonă universală 10,0%, extract din carne 5,0%, extract din drojdii 5,0%, D(+)-glucoză 20,0%, acetat de sodiu 5,0%, sulfat de magneziu 0,1%, sulfat de mangan 0,05%, fosfat acid dipotasic 2,0%, citrat de hidrogen diamoniac 2,0%, agar 12,0%, pH final 6,5 ± 0,2 la 25°C.	13 15 17
10 g de cașcaval fermentat tradițional au fost suspendate în 10 ml soluție fiziologică NaCl 0,9%, din care au fost realizate diluții seriale zecimale și au fost însămânțate pe suprafața mediului nutritiv selectiv MRS. Incubarea plăcilor însămânțate s-a realizat la 37°C în condiții de anerobioză.	19 21
Din coloniile pure obținute, tulpina bacteriană a fost selectată pe baza proprietăților specifice bacteriilor lactice: aspectul microscopic, caracterul gram și reacția catalazei.	23
Conform rezultatelor, izolatul bacterian lactic selectat a fost identificat genetic, respectiv clasificat genotipic prin amplificarea genei ARNr 16S.	25
Pentru izolarea ADN-ului bacterian s-a utilizat un kit de extracție AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit.	27
Amplificarea genei 16S ribosomal prin tehnica PCR s-a realizat cu 2 amorse special proiectate pentru organisme procariote: 27 f și 1492 r.	29
Identificarea tulpinii bacteriene a fost realizată pe baza secvențierii fragmentului 16S rADN (tabelul 1).	31

Tabelul 1

Încadrarea taxonomică a tulpinii bacteriene pe baza secvențelor 16S rADN

Tulpina	Lungimea secvenței 16S rADN (perechi de baze - pb)	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificarea tulpinilor pe baza similarității secvenței 16S rADN cu tulpinile din GenBank (nr. de referință); - procentul de similaritate
Izolatul bacterian	867	TCGGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGG AAACCCTCCAACACTTAGCATTATCG TTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCT AATCCTGTTTGCTACCCATACTTTGAG CCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAG CCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATA TATCTACGCATTTACCGCTACACATGG AGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAG TTTCCCAGTTTCCGATGCACCTTCTCGG TTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACT TAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACG CCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCA CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC GTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAAT ACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTC AGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTT TTACGAGCCGAAACCTTCTTCACTCAC GCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCTGTCC ATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC CCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGT CCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGG TCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAG CCGTTACCCACCATCTAGCTAATACG CCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCC GAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATG CGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGC ATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCGCTT CTGGGCAGGTTTCCACGTGTTACTCAC CAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAAT CATGATGCAAGCACCAATCAATACCAG AGTTCGTTGCACTTGCATGTATTAGGCA CGCCGCCAGCGTTCGTC	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>subsp. plantarum</i> ATCC 14917(T) 100%

Faza 2. Determinarea utilizării diferitelor surse de carbon și sensibilitatea chimică

Caracterizarea fenotipică a tulpinii bacteriene lactice identificată, a fost realizată cu ajutorul sistemului BiologMicrolog GenIII.

Tabelul 2

Rezultatele cele mai relevante ale utilizării diferitelor substraturi

Substrat	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i>
D-Maltose	+
D-Trehalose	

RO 130894 B1

Tabelul 2 (continuare)

Substrat	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	
D-Cellobiose		3
Gentiobiose		
Sucrose		5
D-Turanose		
pH6		7
pH5		
D-Raffinose		9
α -D-Lactose	+	
D-Melibiose		11
β -Methyl-D-Glucoside		
D-Salicin		13
N-Acetyl-DGlucosamine	+	
1% NaCl		15
α -D-Glucose	+	
D-Mannose	+	17
D-Fructose		
D-Galactose		19
Inosine		
1% SodiumLactate		21
D-Serine		
D-Sorbitol		23
D-Mannitol	+	
Glycerol		25
Rifamycin SV		
Minocycline		27
D-GalacturonicAcid		
D-GluconicAcid		29
D-Glucuronic Acid		
Vancomycin		31
L-Alanine		
L-Lactic Acid		33
Nalidixic Acid		
PotassiumTellurite		35
Aztreonam		

Faza 3. Determinarea rezistenței față de antibiotice prin detectarea concentrației minime inhibitorii

Rezistența la antibiotice a bacteriilor este o caracteristică care îi conferă proprietăți prin care acestea devin deloc sau doar puțin sensibile la efectele dăunătoare ale antibioticelor.

Rezistența bacteriilor la antibiotice poate fi de două tipuri: rezistență naturală sau primară și rezistență dobândită sau secundară.

Examinarea s-a realizat astfel: mediile lichide MRS cu antibioticele testate cu diferite concentrații au fost inoculate cu tulpina bacteriană și incubate timp de 48 h la o temperatură de 37°C. După o nouă incubare, s-a determinat OD față de mediul nutritiv lichid MRS control, la o lungime de undă de 600 nm.

Concentrația antibioticelor a fost: 0,01 mg/l; 0,02 mg/l; 0,04 mg/l; 0,08 mg/l; 0,16 mg/l; 0,32 mg/l; 0,64 mg/l; 1,28 mg/l.

Tabelul 3

Rezultatul determinării MIC la antibiotice a tulpinii bacteriene lactice *Lactobacillus plantarum* subs. *plantarum* prin măsurarea OD

C _{antibiotic} (m/V) [mg/L]	Ampicilină	Tetracilină	Cloram- fenicol	Kana- micină	Strepto- micină	Penicilină	Gentamicină
	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]
0	1,9808	1,9808	1,8920	1,8919	1,9838	1,9355	1,8944
0,01	0,2754	1,9857	1,9293	1,9245	1,9473	0,2406	1,8788
0,02	0,4239	1,9805	1,9080	1,8766	1,9612	0,2198	1,8998
0,04	0,1683	1,9301	1,3192	1,9534	1,9622	0,2567	1,9206
0,08	0,1803	1,5686	0,1482	1,8911	1,9342	0,1947	1,8459
0,16	0,1634	0,4852	0,1137	1,9340	1,9240	0,1203	1,7897
0,32	0,1467	0,1952	0,0543	1,9538	1,9200	0,1051	1,7681
0,64	0,1516	0,1914	0,0367	1,9556	1,7269	0,1155	1,5783
1,28	0,1323	0,1378	0,0509	1,8049	0,5912	0,1156	0,1207

Faza 4. Evaluarea capacității de producere a acidului lactic și acidului acetic în prezența diferitelor surse de carbon

Conservarea furajelor prin însilozare are la bază și bioconversia zaharurilor fermentescibile.

Rolul benefic asupra conservării furajelor, datorat tulpinii bacteriene *Lactobacillus plantarum* subs. *plantarum*, a fost descris prin determinarea capacității de fermentare a trei medii diferite având ca surse de carbon: glucoza, glucoza și xiloza, și cerealele uscate de distilerie solubile din porumb (DGS).

Concentrația acidului lactic și acetic a fost determinată prin metode de cromatografie lichidă de înaltă performanță, HPLC, tip Varian Pro Star 210, echipat cu coloană Coregel-87H3 (Transgenomic). Ca fază mobilă, s-a utilizat o soluție de FbSCMn, având o concentrație de 0,008 M, cu un debit de 0,6 ml/min și temperatura coloanei fiind de 50°C. Pentru determinarea concentrațiilor acizilor am pregătit curbă de calibrare.

Tabelul 4

Concentrația acidului lactic și acidului acetic rezultat din procesul de fermentație

<i>Lactobacillus plantarum subs. plantarum</i>	Timpul de fermentație h				
	24	36	48	60	72
Sursa de carbon utilizat: glucoza					
Acid lactic g/l	25,529	26,420	26,910	37,364	39,092
Acid acetic g/l	1,893	1,974	1,926	2,274	7,839
Sursa de carbon utilizat: glucoza și xiloza					
Acid lactic g/l	28,215	20,2995	28,1565	22,32	28,098
Acid acetic g/l	2,037	3,267	3,339	1,77	3,999
Sursa de carbon utilizat: DGGS					
Acid lactic g/l	4,464	5,202	6,9255	4,5945	5,8005
Acid acetic g/l	1,761	3,48	1,995	3,267	2,097

1

Revendicare

3

Tulpină de *Lactobacillus plantarum subsp. plantarum*, izolată din probe de cașcaval obținut prin fermentare spontană, depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta sub numărul NCAIM (P) B 001436, utilizată în procesul de însilozare a plantelor furajere.

5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 115/2019