

## 27. Antonello ANTONELLI. — Produzione di vitamina B<sub>12</sub> da parte di micobatteri.

**Riassunto.** — E' stata studiata la capacità di produrre vitamina B<sub>12</sub> da parte di alcuni ceppi di micobatteri, sia in condizioni normali di crescita, sia in condizioni favorevoli la produzione della vitamina. Su di un ceppo in particolare (il ceppo Milch di *Mycobacterium lacticola*) si è cercato di determinare in quale misura la produzione venga condizionata dalla presenza di ioni cobalto e di ioni cianuro nel terreno di crescita. Si è visto che il micobatterio in esame può adattarsi ad elevate concentrazioni di cobalto, con notevole incremento nella produzione di vitamina B<sub>12</sub>.

**Summary.** — The vitamin B<sub>12</sub> producing power by some mycobacteria was studied both in normal growth condition and in condition favorable to vitamin B<sub>12</sub> production. The influence upon this production by cobalt and cyanide ions, contained in the growth medium, was investigated using strain Milch of *Mycobacterium lacticola*. It was observed that this mycobacterium can grow in presence of high cobalt concentration: under this conditions the vitamin B<sub>12</sub> production was greatly increased.

---

E' noto che la Vit. B<sub>12</sub>, benchè reperibile in diverse fonti naturali, ha origine da batteri o da altri microrganismi sviluppantisi nel suolo, nell'acqua, nell'apparato digerente degli animali, etc. <sup>(1)</sup>. Forse unica documentata eccezione alla origine microbiologica della vitamina, è l'affermazione di D. W. WOOLLEY (1954; 1955) che essa può venire sintetizzata da tumori mammari spontanei nel topo <sup>(2)</sup>.

L'attuale produzione industriale è basata sulla scoperta di particolari ceppi di microrganismi capaci di produrre, in opportune condizioni di crescita, una notevole quantità di Vit. B<sub>12</sub>. Da quando sperimentatori dei laboratori Merck [E. L. RICKES, N. G. BRINK, *et al.*; 1948 <sup>(3)</sup>] riferirono che la vitamina poteva essere isolata da brodoculture di *Streptomyces griseus*, usate per la produzione di streptomycin, è stata studiata la capacità di biosintesi di numerosi microrganismi; gli studi hanno rivelato che un'alta percentuale di batteri e di actinomiceti, ma pochi lieviti e funghi filamentosi, producono Vit. B<sub>12</sub> <sup>(4)</sup>.

In questi ultimi anni si è verificata una continua ricerca di nuovi ceppi alto-produttori (ad es., isolamento di un batterio gram-negativo

non meglio classificato dal suolo del Sahara; produzione massima: 44  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  di brodocoltura; KAUFFMAN e COMBES, 1959); d'altro canto si sono ottenuti notevoli risultati migliorando le capacità fermentative di ceppi già noti (ad es., *Propinibacterium freudenreichii*) sia mediante particolari sostanze utilizzabili dai microrganismi come precursori della molecola della Vit. B<sub>12</sub> (cobalto (<sup>6</sup>), benzimidazolo, ac.  $\delta$ -aminolevulinico (<sup>7</sup>), etc.), sia mediante mutazione e selezione genetica [MAGNI, 1956 (<sup>8</sup>)].

Per quanto riguarda i micobatteri, non risulta che, alla data della presente ricerca, sia stata studiata la capacità di produrre Vit. B<sub>12</sub> da parte di questo interessante gruppo di germi ubiquitari. Sappiamo già che essi possono sintetizzare i pigmenti carotenoidi (CHARGAFF e LEDERER, 1935), la riboflavina (BOISSEVAIN, DREA e SCHULTZ, 1938), l'ac. folico e l'ac. nicotinico (YOSIDA, 1939), l'ac. paraminobenzoico (LANDY, LARKUM e OSTWALD, 1943), la biotina (LANDY e DICKEN, 1944), la tiamina, l'ac. pantotenico, la piridoxina e l'inositolo (POPE e SMITH, 1946) e l'aneurina (LUTZ, 1947). Facendo ora seguito alle precedenti note sui micobatteri, già apparse sui Rendiconti (<sup>9</sup>), si riportano i risultati di uno studio della produzione di Vit. B<sub>12</sub> da parte di 24 ceppi di micobatteri, appartenenti alla collezione dei Laboratori di Microbiologia dell'Istituto superiore di Sanità.

## MATERIALI E METODI

### CEPPI DI MICOBATTERI.

I ceppi studiati, appartenenti alla collezione dei Laboratori di Microbiologia dell'Istituto superiore di Sanità, sono tutti elencati nella tab. 1.

### TERRENI.

Per le prove di fermentazione sono stati usati il terreno di Sauton, un terreno analogo contenente Tween 80 al 7‰, e l'infuso di patata, glicerina e peptone [PENSO, 1940 (<sup>10</sup>)].

### ESTRAZIONE.

Per estrarre la Vit. B<sub>12</sub> dal corpo batterico si è proceduto ad ebollizione dei campioni di brodocolture in soluzione tampone ac. acetico-acetato di sodio (pH 4,6) per 30'. Sono state effettuate anche prove di criomacinazione in più tempi; la scomparsa della acido-resistenza del 100% dei germi ha coinciso con la massima quantità di vitamina titola-

bile. Questo metodo non è stato però adottato, date le finalità orientative della presente ricerca.

# TITOLAZIONE.

Il metodo usato è quello descritto da DAVIS e riportato dalla SALVINI-BOLZONI (1952) <sup>(11)</sup>, basato sull'impiego del ceppo di *E. coli* 113/3 (DAVIS) sensibile, su terreno solido, sino a concentrazioni di Vit. B<sub>12</sub> di 0,002 µg/cm<sup>3</sup>. In luogo dei pozzetti scavati nell'agar-germi, sono state usate perline di porcellana (*spine beads*) forate al centro, che assorbono per capillarità circa 0,05 cm<sup>3</sup> di liquido e ne permettono una migliore diffusione in superficie. Un controllo col mutante di *E. coli* 122/33 (sensibile alla metionina e non alla Vit. B<sub>12</sub>) ha dato risultati negativi.

# RISULTATI.

Una prima informazione circa la quantità di Vit. B<sub>12</sub> presente normalmente nelle brodocolture di micobatteri è stata ottenuta titolando campioni presi da matraccini di Sauton normale, inoculati 30 giorni prima. Si è visto che questa quantità era, in media, sui 30 µg/l di brodocoltura (v. tab. 1).

TABELLA 1

| Vit. B <sub>12</sub> (µg/l)       |    | Vit. B <sub>12</sub> (µg/l) |     |
|-----------------------------------|----|-----------------------------|-----|
| <i>Mycobacterium battaglini</i> : |    | <i>Myc. phlei</i> :         |     |
| ceppo Battaglini . . . . .        | —  | ceppo B 10 . . . . .        | 30  |
| » Butter . . . . .                | —  | » Fleol Lausanne . . . . .  | 60  |
| » Lanterna . . . . .              | 25 | » L 619 . . . . .           | 140 |
| <i>Myc. lacticola</i> :           |    | » Moeller . . . . .         | 25  |
| ceppo Brinckerhoff . . . . .      | 30 | » Timoteo . . . . .         | 30  |
| » Grassbacillus . . . . .         | 45 | » Vip 27 . . . . .          | 30  |
| » Korn . . . . .                  | 16 | <i>Myc. smegmatis</i> :     |     |
| » Milch . . . . .                 | 18 | cappo Smegma 19 . . . . .   | 25  |
| <i>Myc. marianum</i> :            |    | » Smegmatis 33 . . . . .    | 30  |
| ceppo Chauviré . . . . .          | 14 | » Smegmatis USA . . . . .   | 35  |
| <i>Myc. minetti</i> :             |    | <i>Myc. sp.</i> :           |     |
| ceppo Enteritidis C 42 . . . . .  | 20 | ceppo Clegg I . . . . .     | 50  |
|                                   |    | » Serpent S 20 . . . . .    | 18  |
|                                   |    | » Zironi . . . . .          | 18  |

Per avere un orientamento circa le effettive capacità di produzione dei ceppi in esame, la vitamina prodotta è stata titolata dopo 20 giorni di crescita in provette a T sottoposte ad agitazione. Il terreno (Sauton) conteneva 10 mg/l di CoCl<sub>2</sub>.

Nella tab. 2 si riportano i risultati ottenuti: 2 ceppi (*Mycobacterium battaglini* ceppi Battaglini e Butter) non hanno prodotto Vit. B<sub>12</sub> in quantità rivelabile con il metodo e le diluizioni usati; 4 ceppi (*Myc. lacticola* ceppi Brinckerhoff e Grassbacillus; *Myc. phlei* ceppo Fleol Lausanne; *Myc. smegmatis* ceppo Smegmatis USA) hanno prodotto meno di 100 µg/l di brodocoltura; i rimanenti hanno dato valori compresi tra i 120 µg/l (*Myc. marianum* ceppo Chauviré) e i 700 µg/l (*Myc. lacticola* ceppo Korn).

TABELLA 2

|                                  | Vit. B <sub>12</sub> (µg/l) |                            | Vit. B <sub>12</sub> (µg/l) |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>Myc. battaglini</i> :         |                             | <i>Myc. phlei</i> :        |                             |
| ceppo Battaglini . . . . .       | —                           | ceppo B 10 . . . . .       | 580                         |
| » Butter . . . . .               | —                           | » Fleol Lausanne . . . . . | 45                          |
| » Lanterna . . . . .             | 170                         | » L 619 . . . . .          | 350                         |
|                                  |                             | » Moeller . . . . .        | 400                         |
| <i>Myc. lacticola</i> :          |                             | » Timoteo . . . . .        | 420                         |
| ceppo Brinckerhoff . . . . .     | 60                          | » Vip 27 . . . . .         | 390                         |
| » Grassbacillus . . . . .        | 60                          |                            |                             |
| » Korn . . . . .                 | 700                         | <i>Myc. smegmatis</i> :    |                             |
| » Milch . . . . .                | 500                         | ceppo Smegma 19 . . . . .  | 190                         |
|                                  |                             | » Smegmatis 53 . . . . .   | 225                         |
| <i>Myc. marianum</i> :           |                             | » Smegmatis USA . . . . .  | 45                          |
| ceppo Chauviré . . . . .         | 120                         |                            |                             |
|                                  |                             | <i>Myc. sp.</i> :          |                             |
| <i>Myc. minetti</i> :            |                             | ceppo Clegg I . . . . .    | 200                         |
| ceppo Enteritidis C 42 . . . . . | 675                         | » Serpent S 20 . . . . .   | 500                         |
|                                  |                             | » Zironi . . . . .         | 220                         |

Nel corso della stessa prova, una titolazione effettuata al 30° giorno ha dato, per alcuni ceppi, risultati superiori a quelli relativi al 20° giorno (v. tab. 3). In particolare il ceppo Milch ha dato la quantità massima di Vit. B<sub>12</sub>.

TABELLA 3

|                              | Vit. B <sub>12</sub> (µg/l) |
|------------------------------|-----------------------------|
| <i>Myc. lacticola</i> :      |                             |
| ceppo Milch . . . . .        | 2150                        |
| <i>Myc. phlei</i> :          |                             |
| ceppo L 619 . . . . .        | 675                         |
| <i>Myc. smegmatis</i> :      |                             |
| ceppo Smegma 19 . . . . .    | 310                         |
| » Smegmatis USA . . . . .    | 310                         |
| <i>Myc. sp.</i> :            |                             |
| ceppo Serpent S 20 . . . . . | 1350                        |

Sono state fatte ulteriori prove su *Myc. lacticola* ceppo Milch, allo scopo di determinare in quale misura la produzione di Vit. B<sub>12</sub> venga condizionata dalla presenza di ioni cobalto (Co<sup>++</sup>) e cianuro (CN<sup>-</sup>). Sono stati usati il terreno sintetico al Tween 80 e l'infuso di patata glicerinato; ambedue i terreni permettono una rapida crescita del micobatterio.

Si è visto che, in terreni senza aggiunta di Co<sup>++</sup>, la Vit. B<sub>12</sub> prodotta è in media sui 50 µg/l, e non aumenta sensibilmente in relazione al tempo. L'aggiunta di 10 mg/l di CoCl<sub>2</sub> nel terreno di crescita ha fatto sì che, dopo 4 giorni, la vitamina prodotta superasse di circa 4 volte, e dopo 6 giorni di circa 7 volte, la quantità prodotta dai campioni di controllo senza cobalto (v. tab. 4).

TABELLA 4

| giorni | Vit. B <sub>12</sub> prodotta (µg/l) |                      |
|--------|--------------------------------------|----------------------|
|        | senza Co <sup>++</sup>               | con Co <sup>++</sup> |
| 4      | 50                                   | 210                  |
| 6      | 60                                   | 420                  |

L'aggiunta di CN<sup>-</sup> nel terreno di crescita può aumentare la resa in Vit. B<sub>12</sub> <sup>(12)</sup> per trasformazione dell'*idrossicobalamina*, eventualmente presente, in *cianocobalamina* (Vit. B<sub>12</sub>). Dalle prove effettuate risulta chiaramente che l'aggiunta di CN<sup>-</sup> in colture senza Co<sup>++</sup> non determina alcun aumento di produzione, mentre in colture con Co<sup>++</sup> l'aggiunta di CN<sup>-</sup> prima dell'estrazione ha per risultato un lieve aumento nel titolo di Vit. B<sub>12</sub> (v. tab. 5).

TABELLA 5

| terreno                | giorni | Vit. B <sub>12</sub> prodotta (µg l) |                     |
|------------------------|--------|--------------------------------------|---------------------|
|                        |        | senza CN <sup>-</sup>                | con CN <sup>-</sup> |
| senza Co <sup>++</sup> | 6      | 60                                   | 69                  |
| con Co <sup>++</sup>   | 6      | 420                                  | 460                 |
| senza Co <sup>++</sup> | 13     | 55                                   | 55                  |
| con Co <sup>++</sup>   | 13     | 825                                  | 840                 |

E' stata studiata, infine, la produzione di Vit. B<sub>12</sub> in rapporto al tempo e alla concentrazione di Co<sup>++</sup> nel terreno, mediante una doppia serie di colture sommerse. Il Co<sup>++</sup> era contenuto nel terreno alle seguenti concentrazioni (µg/cm<sup>3</sup>): 0; 10; 20; 40; 80; 150; 300.

Al 5<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> giorno dalla semina del ceppo in fase di attiva moltiplicazione, sono stati prelevati campioni per la determinazione del pH l'estrazione e la titolazione. Campioni di terreno sterile con  $\text{Co}^{++}$  alle suddette concentrazioni non hanno rivelato tracce titolabili di Vit.  $\text{B}_{12}$ .

I risultati (tab. 6) hanno dimostrato che a concentrazioni progressivamente maggiori di  $\text{Co}^{++}$  si accompagna un aumento della produzione di Vit.  $\text{B}_{12}$ . Per il micobatterio studiato, l'*optimum* della concentrazione di  $\text{Co}^{++}$  sembra compreso tra 80 e 150  $\mu\text{g}$  per  $\text{cm}^3$  di terreno di crescita.

TABELLA 6

| conc. $\text{Co}^{++}$<br>( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) | Vit. $\text{B}_{12}$ prodotta ( $\mu\text{g}$ l) |               |                |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------|----------------|
|                                                         | dopo 5 giorni                                    | dopo 8 giorni | dopo 10 giorni |
| 0                                                       | 50 (pH 7,4)                                      | 50 (pH 7,8)   | 50 (pH 8 )     |
| 10                                                      | 125 ( » 7,2)                                     | 260 ( » 7,4)  | 380 ( » 7,6)   |
| 20                                                      | 125 ( » 7,2)                                     | 350 ( » 7,2)  | 440 ( » 7,4)   |
| 40                                                      | 140 ( » 7 )                                      | 350 ( » 7,2)  | 590 ( » 7,2)   |
| 80                                                      | 160 ( » 7 )                                      | 425 ( » 6,8)  | 705 ( » 7 )    |
| 150                                                     | 160 ( » 7 )                                      | 350 ( » 7 )   | 705 ( » 7 )    |
| 300                                                     | 180 ( » 6,8)                                     | 420 ( » 6,8)  | 600 ( » 6,8)   |

Roma — Istituto superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

#### BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) LESTER SMITH E. - Vitamin  $\text{B}_{12}$ ; Methuen & Co., London (1960).
- (<sup>2</sup>) WOOLLEY D. W. - Fed. Proc., 13: 482 (1954).
- Idem*, - Proc. nat. Acad. Sci., Wash., 41: 111 (1955).
- (<sup>3</sup>) RICKES E. L. e BRINK N. G. *et al.* - Science, 107, 396 (1948).
- (<sup>4</sup>) Vari AA. - Industrial Fermentation; Chem. Publ. Co. (1954).
- (<sup>5</sup>) KAUFFMANN J. e COMBES R. - C. R. Acad. Sci., 248: 3232 (1959).
- (<sup>6</sup>) VOOD T. R. e HEDLIN D. - U. S. Patent, 2: 595, 499 (1952).
- (<sup>7</sup>) SHEMIN D. - Science, 124: 272 (1956).
- (<sup>8</sup>) MAGNI G. E. - Atti IX Cong. naz. Soc. ital. Microbiol., 143 (1956).
- (<sup>9</sup>) PENSO G., CATTANEO C., MORELLINI M. e ORTALI V. - Rend. Ist. sup. Sanità, 11: 1496 (1948).
- (<sup>10</sup>) PENSO G. - Rend. Ist. Sanità pubbl., 337 (1940).
- (<sup>11</sup>) SALVINI BOLZONI C. - Boll. Ist. sieroterap. milanese, 31: 97 (1952).
- (<sup>12</sup>) MCDANIEL L. E. e WOODRUFF H. B. - U. S. Patent, 2: 650, 896 (1953).

Direttore responsabile: Prof. DOMENICO MAROTTA

Reg. Stampa - Trib. di Roma n. 1534 del 14 luglio 1956