

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **217492**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **396684**

(22) Data zgłoszenia: **18.10.2011**

(51) Int.Cl.

C12N 1/18 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

(54)

Szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

29.04.2013 BUP 09/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.07.2014 WUP 07/14

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

KATARZYNA RAJKOWSKA, Łódź, PL

ALINA KUNICKA-STYCZYŃSKA, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

PL 217492 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, o właściwościach stabilizatora mikroflory jelitowej, który znajduje zastosowanie jako dodatek zootechniczny w żywieniu zwierząt.

Kontrolowana pozytywna regulacja składu mikroflory jelitowej może być osiągnięta na drodze probiozy, czyli przyjmowania w odpowiedniej ilości żywych komórek mikroorganizmów, które wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza. Stosowanie w żywieniu zwierząt drożdży z rodzaju *Saccharomyces* przynosi zarówno pożądaną efekt probiotyczny, jak i odżywczy (źródło witamin z grupy B i aminokwasów), co przyczynia się do polepszenia zdrowia zwierząt oraz do zwiększenia wydajności ich produkcji. Dlatego też, producenci pasz i dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt zainteresowani są pozyskiwaniem nowych szczepów tych drożdży o udokumentowanych właściwościach probiotycznych.

Dotychczas znane są szczepy drożdży z rodzaju *Saccharomyces* o właściwościach probiotycznych, jak *S. cerevisiae* MUCL 39885, *S. cerevisiae* NCYC Sc47, *S. cerevisiae* IFO 0203, *S. cerevisiae* CNCM I-1079, *S. cerevisiae* CNCM I-1077, *S. cerevisiae* CBS 493.94.

Szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* o właściwościach probiotycznych, stanowiący przedmiot wynalazku, zdeponowano w Kolekcji Zakładu Mikrobiologii Molekularnej Narodowego Instytutu Leków z siedzibą w Warszawie pod numerem kolekcyjnym 06/02/2011.

Szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 06/02/2011 wyizolowano z kału kury nioski rasy Rosa i zaliczono do gatunku *Saccharomyces cerevisiae* na podstawie cech morfologicznych, sposobu rozmnażania, uzdolnień biochemicznych i kariotypu.

Właściwości probiotyczne szczepu stwierdzono w wyniku badań *in vitro*, zgodnie z właściwymi wytycznymi Scientific Committee on Animal Nutrition EC do oceny dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.

Komórki szczepu mają kształt elipsoidalny i wymiary 3-4 μm x 6-8 μm . Rozmnażają się wegetatywnie poprzez pączkowanie oraz generatywnie, wytwarzając od 2 do 4 zarodników w komórce.

Biomasę szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 06/02/2011 otrzymuje się w wyniku hodowli na płynnym podłożu YPG zawierającym 1% ekstraktu drożdżowego, 2% peptonu, 2% glukozy, o pH 7,2 bądź na podłożu agarowym YPG o składzie 1% ekstraktu drożdżowego, 2% peptonu, 2% glukozy, 1,5% agaru, o pH 7,2, w zakresie temperatur 30 - 37°C, korzystnie 30°C. Na podłożu agarowym szczep rośnie w postaci beżowych, okrągłych, lekko wypukłych kolonii o gładkiej linii brzegowej.

W rozdziale elektroforetycznym chromosomalnego DNA szczepu obserwuje się 14 prążków o wielkości molekularnej w zakresie 229 - 2125 kb i profilu typowym dla *Saccharomyces sp.*

Szczep charakteryzuje się zdolnością do asymilacji glukozy, galaktozy, α -metylo-D-glukozydu, maltozy, sacharozy i rafinozy (w 1/3), co stwierdzono na podstawie testu API 20C AUX (bioMerieux), natomiast nie wykazuje zdolności do wykorzystania glicerolu, 2-keto-D-glukonianu, L-arabinozy, D-ksylozy, adonitolu, ksylitolu, inozytolu, sorbitolu, N-acetylo-D-glukozaminy, celobiozy, laktozy, trehalozy oraz melezytozy jako źródeł węgla i azotu.

Profil biochemiczny szczepu, według taksonomii Barnett i wsp., potwierdza przynależność tego szczepu do gatunku *Saccharomyces cerevisiae*.

Szczep wykazuje wysoką aktywność enzymatyczną aryamidazy leucyny i kwaśnej fosfatazy oraz na niższym poziomie aktywność fosfatazy alkalicznej, esterazy, esterazy lipazy, aryamidazy waliny, fosfohydrolazy naftylo-AS-BI i α -glukozydazy, co stwierdzono w oparciu o test API-ZYM (bioMerieux).

Wykazuje odporność na niskie pH (kwasowość soku żołądkowego), na obecność soli żółci oraz działanie enzymów trawiennych: pepsyny i pankreatyny w czasie do 8 godzin, co - uwzględniając czas tranzytu paszy przez kolejne odcinki przewodu pokarmowego gospodarza - zapewnia przeżycie i aktywność jego komórek w obrębie całego przewodu pokarmowego. Wpływa stabilizująco na mikroflorę jelitową gospodarza poprzez wiązanie do swojej ściany komórkowej patogennych lub oportunistycznych szczepów bakterii: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* oraz *Enterococcus faecalis*.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

P r z y k ł a d I.

Szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 06/02/2011 hodowano w płynnym podłożu YPG, w temperaturze 30°C. Po 24 godzinach inkubacji wyhodowane komórki oddzielono od podłoża przez

wirowanie (5000 x g, 5 minut) i zawieszono w buforze PBS (chlorek sodu 0,8%, chlorek potasu 0,02%, wodorofosforan disodu 0,144%, diwodorofosforan potasu 0,024%; pH 7,4), uzyskując gęstość $6,1 \times 10^7$ komórek/ml.

Przykład II.

Szczep drożdży otrzymany jak w przykładzie I umieszczono w środowiskach o pH 2,5 oraz 1,5, co odpowiada niskim wartościom pH w przewodzie pokarmowym. W środowisku o pH 2,5 po 8 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C przeżyło $2,0 \times 10^6$ jtk/ml, przy wyjściowej liczbie drożdży wynoszącej $3,1 \times 10^6$ jtk/ml.

W środowisku o pH 1,5 po 8 godzinach przeżyło $1,1 \times 10^6$ jtk/ml, przy wyjściowej liczbie na poziomie $3,6 \times 10^6$ jtk/ml.

Przykład III.

Szczep drożdży otrzymany jak w przykładzie I poddano działaniu soli żółci o stężeniach 0,1% i 1,0% w czasie do 240 minut. Procentowa przeżywalność drożdży w środowisku symulującym warunki przewodu pokarmowego z dodatkiem soli żółci o stężeniu 0,1% po 240 minutach wynosiła 92,6%. W obecności soli żółci w stężeniu 10-krotnie wyższym, tj. 1,0% po 240 minutach przeżywalność drożdży wynosiła 76,8%.

Przykład IV.

Szczep drożdży otrzymany jak w przykładzie I umieszczono w środowiskach odtwarzających *in vitro* warunki przewodu pokarmowego, z uwzględnieniem działania enzymów trawiennych: pepsyny i pankreatyny oraz niskiego pH. W obecności pepsyny (3 g/l; 3260 U/mg; pH 2,0) po 240 minutach inkubacji w temperaturze 37°C przeżyło $7,6 \times 10^5$ jtk/ml, przy wyjściowej liczbie drożdży wynoszącej $6,2 \times 10^6$ jtk/ml.

W środowisku z dodatkiem pankreatyny (1 g/l; 903 U/mg) po 240 minutach przeżyło $3,1 \times 10^6$ jtk/ml, przy wyjściowej liczbie drożdży na poziomie $8,4 \times 10^6$ jtk/ml. Wysoka przeżywalność szczepu zapewnia jego aktywność w całym przewodzie pokarmowym gospodarza.

Przykład V.

Szczep drożdży otrzymany jak w przykładzie I barwiono w temperaturze 28°C 0,1% roztworem prymuliny i łączono z komórkami bakterii wybawionymi 0,1 % roztworem DAPI w temperaturze 37°C. Połączone hodowle drożdży i bakterii inkubowano w temperaturze 28°C przez 3 godziny. Oceny adhezji komórek patogennych lub oportunistycznych szczepów bakterii do ściany komórkowej szczepu drożdży 06/02/2011 dokonano w preparatach mikroskopowych, z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego. W oparciu o dokumentację fotograficzną, przy wykorzystaniu programu komputerowego, wyznaczono liczbę komórek bakterii zaadherowanych do ściany komórkowej szczepu drożdży. W przypadku *Salmonella Typhimurium* adherowało 149 komórek bakterii w przeliczeniu na 100 komórek drożdży. Dla *Escherichia coli* wartość ta wynosiła 256 komórek bakterii, dla *Staphylococcus aureus* - 103, *Enterococcus faecalis* - 176, a dla *Campylobacter jejuni* - 18.

Zdolność szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 06/02/2011 do wiązania do swojej ściany komórkowej patogennych bakterii warunkuje usuwanie tych szczepów bakterii z przewodu pokarmowego oraz stabilizację mikroflory jelitowej gospodarza.

W celu określenia przynależności gatunkowej szczepu 06/02/2011 profil chromosomalnego DNA tego szczepu porównano, za pomocą odpowiedniego programu komputerowego, z kariotypem szczepu *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 (BioRad). W rozdziale elektroforetycznym chromosomalnego DNA odnotowano 14 prążków o wielkości molekularnej: 2125, 1558, 1433, 1146, 1089, 905, 795, 763, 651, 557, 393, 324, 257, 229 kb. Układ kilkunastu prążków o wielkości w zakresie 225 - 2200 kb w rozdziale elektroforetycznym jądrowego DNA był typowy dla drożdży *Saccharomyces sp.*

Poniżej przedstawiono profil elektroforetyczny chromosomalnego DNA szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 06/02/2011 w odniesieniu do kariotypu szczepu markerowego *S. cerevisiae* YNN 295.

Zastrzeżenie patentowe

Szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* o właściwościach probiotycznych, zdeponowany w Kolekcji Zakładu Mikrobiologii Molekularnej Narodowego Instytutu Leków pod numerem kolekcyjnym 06/02/2011.

Rysunek