

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233582**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422602**

(22) Data zgłoszenia: **21.08.2017**

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

(54)

Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus rhamnosus*

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

25.02.2019 BUP 05/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

29.11.2019 WUP 11/19

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

KATARZYNA ŚLIŻEWSKA, Łódź, PL

AGNIESZKA CHLEBICZ, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

PL 233582 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus rhamnosus*, o właściwościach probiotycznych.

Dotychczas znane są szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus*, jak *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* Lc705, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 8530, *Lactobacillus rhamnosus* CASL oraz z opisu patentowego PL 226 294 szczep *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1.

Wiadomo jest, iż preparaty probiotyczne podawane zwierzętom hodowlanym w paszy lub zaaplikowane oralnie wpływają korzystnie na ich wzrost poprzez stymulujące oddziaływanie na przewód pokarmowy i procesy w nim zachodzące. Odpowiednio dobrane bakterie probiotyczne determinują przyswajanie paszy, pełniąc jednocześnie rolę regulatora równowagi mikroorganizmów przewodu pokarmowego zwierząt. Efekty działania preparatów probiotycznych zbliżone są do efektów uzyskanych w wyniku zastosowania antybiotyków paszowych, bowiem jedne i drugie redukują liczbę bakterii patogennych, jednak sposób ich działania jest różny. Probiotyki nie powodują żadnych skutków ubocznych i nie implikują odkładania się szkodliwych substancji obcych, stąd nie mają okresu karencji i nie ma niebezpieczeństwa ich przedawkowania. Z punktu widzenia konsumenta i producenta żywności, ważne jest również, że stosowanie probiotyków dzięki możliwości obniżania, a nawet całkowitej eliminacji konieczności stosowania antybiotyków, jest sposobem otrzymywania bezpiecznej żywności.

Przedmiotem **wynalazku** jest nowy szczep bakterii mlekowych z gatunku *Lactobacillus rhamnosus*, który oznaczono symbolem ŁOCK 1087 i który został zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu pod numerem B/00121.

Szczep bakterii ŁOCK 1087 wyizolowano z pomiotu indyków rzeźnych.

Szczep ŁOCK 1087 jest to Gram-dodatnia pałeczka, nieruchliwa, nieprzetrwalnikująca. Jest szczepem o właściwościach probiotycznych, stanowiącym homolog bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA przedstawionej na końcu opisu.

W celu określenia przynależności gatunkowej nowego szczepu ŁOCK 1087 zsekwencjonowano region DNA kodujący gen 16S rRNA o długości 1400 pz. Otrzymaną sekwencję nukleotydową genu 16S rRNA porównano za pomocą programu BLASTN 2.6.0+ z sekwencjami dostępnymi w bazie National Center of Biotechnology Information (NCBI) oraz programie DNA Baser v4.36.0. Na podstawie porównania sekwencji nukleotydowych genów 16S rRNA bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 stwierdzono podobieństwo nowego szczepu bakterii do gatunku *Lactobacillus rhamnosus* z prawdopodobieństwem 99,86%.

Nowy szczep ŁOCK 1087 hoduje się na podłożu Rogosa przeznaczonym do hodowli bakterii z rodzaju *Lactobacillus* sp., przejrzystym, o barwie żółto-brązowej, o składzie w g/l: pepton kazeinowy – 10,0, ekstrakt drożdżowy – 5,0, D(+)glukoza – 20,0, fosforan potasu – 6,0, cytrynian amonu – 2,0, Tween 80 – 1,0, octan sodu – 15,0, siarczan magnezu – 0,575, siarczan żelaza II – 0,034, siarczan manganu – 0,12, agar – 15,0, o pH 5–6, w temperaturze 15–45°C, korzystnie 37°C w czasie 48 godzin. Na podłożu Rogosa szczep rośnie w postaci białokremowych, okrągłych kolonii, o gładkiej powierzchni i regularnych brzegach, o średnicy około 1–2 mm.

Szczep ŁOCK 1087 hoduje się także w podłożu płynnym MRS, stanowiącym modyfikację podłoża Rogosa, zawierającym jako źródło glukozę, o składzie w g/l: ekstrakt drożdżowy – 4,0, ekstrakt mięsny – 10,0, pepton z kazeiny – 10,0, D(+)glukoza – 20,0, Tween 80 – 1,0, wodorocytrynian amonu – 2,0, fosforan dwupotasowy – 2,0, octan sodu – 5,0, siarczan magnezu 7-wodny – 0,20, siarczan magnezu 4-wodny – 0,05, o pH 5–6, w temperaturze 15–45°C, korzystnie 37°C w czasie 48 godzin. W podłożu tym szczep rośnie tworząc jednorodne zmętnienie pożywki.

Do wzrostu szczep preferuje środowisko wzbogacone w CO₂ wprowadzony w ilości 5% (v/v). Rośnie jednak zarówno w warunkach tlenowych, jak i względnie beztlenowych.

Cechy morfologiczne szczepu ŁOCK 1087

W obrazie mikroskopowym bakterie mają kształt krótkich, prostych pałeczek o długości 4–5 µm i o szerokości do 1 µm. Pałeczki nie wytwarzają przetrwalników.

Cechy fizjologiczne i biochemiczne szczepu ŁOCK 1087

Szczep nie wytwarza katalazy oraz oksydazy cytochromowej. Wybarwia się na Gram (+).

Badanie metabolizmu glukozy w warunkach tlenowych i beztlenowych na pożywce Hugh-Leifsona w wysokich słupach wykazało, że szczep ŁOCK 1087 jest zdolny do rozkładu glukozy zarówno w obecności tlenu, jak i w warunkach beztlenowych, czyli na drodze fermentacji.

Test API 50 CHL wykazał, że szczep ŁOCK 1087 jest zdolny do fermentacji następujących sacharydów i ich pochodnych: glicerolu, rybozy, galaktozy, glukozy, fruktozy, mannozy, sorbozy, ramnozy, inozytolu, mannitolu, sorbitolu, metylo- α ,D-mannopiranozydu, metylo- α ,D-glukopiranozydu, N-acetyloglukozaminy, amygdaliny, arbutyny, esculiny, salicyny, celobiozy, maltozy, laktozy, sacharozy, trehalozy, inuliny, melecycytozy, gencjobiozy, D-turanozy, tagatozy, glukonianu.

Szczep ŁOCK 1087 charakteryzuje się metabolizmem względnie heterofermentatywnym. Glukozę fermentuje z wytworzeniem kwasu mlekowego w ilości 11,19 $\mu\text{mol/ml}$, kwasu octowego (3,79 $\mu\text{mol/ml}$), kwasu masłowego (0,49 $\mu\text{mol/ml}$), aldehydu octowego (0,07 $\mu\text{mol/ml}$) i etanolu (0,15 $\mu\text{mol/ml}$).

Test API ZYM wykazał, że szczep ŁOCK 1087 wykazuje aktywność następujących enzymów: fosfatazy alkalicznej, esterazy, α -galaktozydazy, β -galaktozydazy, β -glukozydazy, α -glukozydazy, kwaśnej fosfatazy, fosfoamidazy, aryamidazy leucyny, aryamidazy waliny, aryamidazy cysteiny, α -fukozydazy.

Szczep ŁOCK 1087 nie wytwarza siarkowodoru, ani amoniaku z argininy, nie wykazuje zdolności rozkładu H_2O_2 .

Zdolność szczepu ŁOCK 1087 do wykorzystywania prebiotyków

Szczep ŁOCK 1087 jest zdolny do wzrostu w podłożu zawierającym jako jedyne źródło węgla prebiotyki, jak skrobia, β -glukan, maltodekstryna, inulina, pektyna, jednak wzrost jest zróżnicowany i zależy od rodzaju i stężenia sacharydu. Najlepszym źródłem węgla jest inulina w stężeniu 2%. Z porównania wzrostu szczepu w obecności prebiotyków i w obecności glukozy (próba odniesienia) wynika, że w przypadku wszystkich przebadanych prebiotyków wzrost jest lepszy lub porównywalny, co obrazuje wykres 1 na rysunku.

Również w wyniku fermentacji inuliny szczep wytwarza najwyższe ilości kwasu mlekowego przy najwyższym udziale kwasu L(+) mlekowego wynoszącym 86%. Oprócz kwasu mlekowego produktami fermentacji prebiotyków (skrobi, β -glukanu, maltodekstryny, inuliny i pektyny) są kwas octowy, kwas masłowy, aldehyd octowy i etanol.

Cechy probiotyczne szczepu ŁOCK 1087

Szczep ŁOCK 1087 spełnia kryteria stawiane bakteriom probiotycznym, co stwierdzono w wyniku badań *in vitro* wykonanych według procedur zalecanych przez FAO/WHO.

Nowy szczep wykazuje wysoką odporność na niskie pH (kwasowość soku żołądkowego) w zakresie od 2,0 do 3,0.

Szczep ŁOCK 1087 wykazuje również wysoką odporność na sole żółci w stężeniach 1% i 2%.

Szczep ŁOCK 1087 wykazuje oporność w stosunku do antybiotyków najczęściej stosowanych u zwierząt hodowlanych, jak penicylina, kanamycyna, amoksycylina, doksycyklina, erytromycyna, tetracyklina.

Wykazuje również oporność w stosunku do kokcydiostatyków, jak diclazuril, decoquinat, narazyne-nikrabazyn.

Wykazuje aktywność antagonistyczną w stosunku do patogenów jelitowych zwierząt i odpowiedzialnych za zoonozy ludzi, takich jak *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes*.

Posiada niską aktywność fekalną. Spośród trzech enzymów: β -glukozydazy, β -glukuronidazy i ureazy aktywna jest tylko β -glukozydaza.

Wykazuje zdolności detoksyfikacyjne mykotoksyn, jak aflatoksyn B_1 , ochratoksyna A, fumonizyna, toksyna T-2, zearalenon, deoksyniwalenol, które najczęściej mogą stanowić zanieczyszczenie zbóż i pasz dla zwierząt.

Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1087

Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1087 określono w trzech pożywkach fermentacyjnych (mieszkankach paszowych (P1, P2 i P3) o następującym składzie zmielonych ziaren: P1 – 50% pszenicy, 30% jęczmienia i 20% kukurydzy, P2 – 40% pszenicy, 30% jęczmienia, 20% kukurydzy i 10% żyta, P3 – 40% pszenicy, 30% jęczmienia, 20% kukurydzy i 10% soi. Kompozycje pożywek fermentacyjnych ustalono na bazie ziaren stosowanych w żywieniu zwierząt monogastrycznych. Mieszanki paszowe przygotowano w wodzie w proporcjach: 1 : 1,0; 1 : 1,5; 1 : 2,0. Pożywki fermentacyjne zaszczerpiono zawiesiną bakterii w ilości 10^6 jtk/ml. Dynamikę wzrostu w pożywkach fermentacyjnych (jtk/g paszy) oznaczono w 4, 8, 12, 16, 24 i 30 godzinie hodowli, a próbą odniesienia była hodowla w pożywce MRS (jtk/ml pożywki).

Dynamikę wzrostu szczepu przedstawiono w postaci wykresu 2 na rysunku, zaś parametry wzrostu szczepu w pożywkach fermentacyjnych oraz w pożywce MRS przedstawiono w poniższej tablicy.

T a b l i c a

Szczep	Plon komórek N [jtk/g; jtk/ml]			Produktywność P [jtk/kg×h; jtk/l×h]			Właściwa szybkość wzrostu μ [h ⁻¹]			Faza adaptacyjna [h]		
	Pożywka fermentacyjna											
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
<i>Lb. rham-nosus</i> ŁOCK 1087	5,99 ×10 ⁹	2,30 ×10 ¹⁰	9,60 ×10 ⁷	2,00 ×10 ¹¹	7,66 ×10 ¹¹	3,07 ×10 ⁹	0,19	0,17	0,17	3,25	2,34	4,57
Pożywka kontrolna MRS												
<i>Lb. rhamno-sus</i> ŁOCK 1087	6,96×10 ⁸			2,31×10 ¹⁰			0,19			0,74		

Okazało się, iż plon biomasy oraz produktywność hodowli są uzależnione od składu pożywki fermentacyjnej i najwyższe wartości, w odniesieniu do podłoża kontrolnego MRS, otrzymuje się dla hodowli w pożywce fermentacyjnej P2. Plon komórek w tej pożywce wynosi $2,30 \times 10^{10}$ jtk/g, a produktywność szczepu wzrasta do poziomu $7,66 \times 10^{11}$ jtk/kg × h. Stwierdzono ponadto, że optymalną pożywką dla wzrostu szczepu ŁOCK 1087 jest pożywka o stosunku zmielonych ziaren (mąki) do wody 1 : 1,5. W tych warunkach bakteria osiąga najwyższy przyrost biomasy, również produktywność jest wyższa w porównaniu do proporcji mąki do wody 1 : 1,0 oraz 1 : 2,0.

Szczep ŁOCK 1087 wykazuje także trwałość przechowalniczą w postaci liofilizatu w warunkach chłodniczych (4–5°C) oraz w temperaturze pokojowej (25°C) podczas 4 miesięcy przechowywania.

Szczep ŁOCK 1087 znajduje zastosowanie jako dodatek do pasz dla zwierząt monogastrycznych w profilaktyce występowania chorób bakteryjnych i zatruc wywołanych mykotoksynami oraz w celu poprawiania bezpieczeństwa chowu zwierząt.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

P r z y k ł a d I

Szczep ŁOCK 1087 hodowano w podłożu płynnym Rogosa (firmy Difco) o składzie w g/l: pepton kazeinowy – 10,0, ekstrakt drożdżowy – 5,0, D(+)glukoza – 20,0, fosforan potasu – 6,0, cytrynian amonu – 2,0, Tween 80 – 1,0, octan sodu – 15,0, siarczan magnezu – 0,575, siarczan żelaza II – 0,034, siarczan manganu – 0,12, agar – 15,0, o pH 5–6, w obecności CO₂ wprowadzonego w ilości 5% (v/v), w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych.

Po 48 godzinach hodowli wyhodowane komórki oddzielono od podłoża na wstrząsarce uzyskując gęstość $6,50 \times 10^8$ komórek/ml.

P r z y k ł a d II

Szczep ŁOCK 1087 hodowano w podłożu płynnym MRS (firmy Merck), o składzie w g/l: ekstrakt drożdżowy – 4,0, ekstrakt mięsny – 10,0, pepton z kazeiny – 10,0, D(+)glukoza – 20,0, Tween 80 – 1,0, wodorocytrynian amonu – 2,0, fosforan dwupotasowy – 2,0, octan sodu – 5,0, siarczan magnezu 7-wodny – 0,20, siarczan magnezu 4-wodny – 0,05, o pH 5–6, w obecności CO₂ wprowadzonego w ilości 5% (v/v), w temperaturze 37°C w warunkach względnie beztlenowych, w temperaturze 37°C.

Po 48 godzinach hodowli wyhodowane komórki oddzielono od podłoża na wstrząsarce uzyskując gęstość $6,96 \times 10^8$ komórek/ml.

Przykład III

Bakterie otrzymane jak w przykładzie I umieszczono w środowisku o pH 2 i 3. W środowisku pH 3,0 przeżywalność komórek po 60 minutach wynosiła 99%, a po 240 minutach 96%. Natomiast w środowisku o pH 2,0 po 60 minutach przeżyło 96% komórek, a po 240 minutach 91%.

Przykład IV

Bakterie otrzymane jak w przykładzie I poddano działaniu żółci o stężeniach 1% i 2% w czasie do 4 godzin. Po 4 godzinach inkubacji przy stężeniu żółci 2% przeżywalność komórek wynosiła 93%, a przy stężeniu żółci 1% przeżyło 96% komórek bakterii.

Przykład V

Liofilizat bakterii otrzymanych jak w przykładzie I przechowywano w temperaturze 4–5°C oraz w temperaturze pokojowej 25°C w ciągu 4 miesięcy. Po tym czasie nastąpiło obniżenie liczby żywych komórek o 7% dla temperatury chłodniczej i o 16% dla temperatury pokojowej. Temperatura chłodnicza zapewniła większą stabilność i trwałość.

Wykaz sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA szczepu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* ŁOCK 1087, która określa jego przynależność gatunkową:

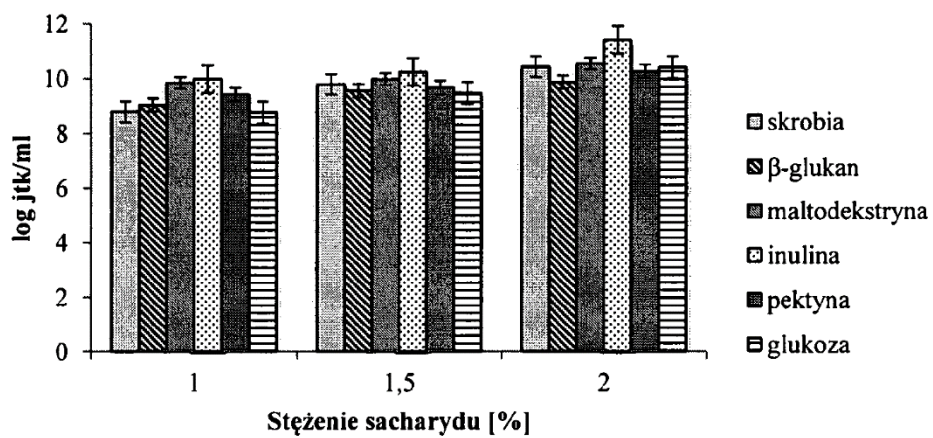
```
GCTTGCATCTTGATTTGATTTTGAACGAGTGGCGGTACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC-
CTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAAC-
CGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGTAT-
TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAGTACGAGAGGTT-
GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT-
CTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA-
GGCTTTTCGGGTTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCCGCAGAGTAAGTGT-
GTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAT-
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA-
GGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAA-
ACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA-
TATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGA-
AAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTA-
GGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAT-
TAAGCATTCGCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT-
GACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC-
CAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAAATGACA-
GGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCA-
ACGAGCGCAACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGT-
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA-
CACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAAT-
CTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAAT-
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC-
CGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACTCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTAGGGAGCG
```

w której: A – oznacza adeninę, G – guaninę, C – cytozynę, T – tyminę.

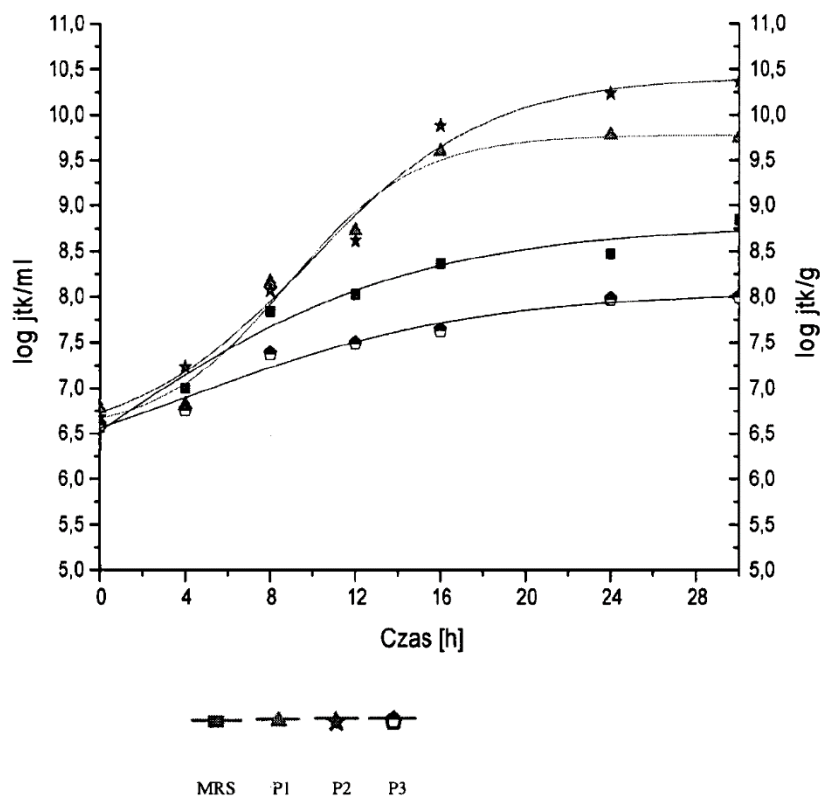
Zastrzeżenie patentowe

1. Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus rhamnosus* ŁOCK 1087 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu pod numerem B/00121, o właściwościach probiotycznych.

Rysunki



Wykres 1



Wykres 2