

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233263**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422593**

(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 reuteri*

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

25.02.2019 BUP 05/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.09.2019 WUP 09/19

(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 233263 B1

Opis wynalazku

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

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.

Dotychczas są znane szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus reuteri*, jak *Lactobacillus reuteri* INLA 4, *Lactobacillus reuteri* ATCC55730, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus reuteri* M KKP 2048.

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii mlekowych z gatunku *Lactobacillus reuteri*, który oznaczono symbolem ŁOCK 1092 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/00123.

Szczep ŁOCK 1092 wyizolowano z treści jelitowej prosiąt.

Szczep ŁOCK 1092 jest to Gram-dodatnia pałeczka, nieruchliwa, nie przetrwalnikująca. Jest szczepem o właściwościach probiotycznych, stanowiącym homolog bakterii z gatunku *Lactobacillus reuteri* o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA przedstawionej na końcu opisu.

W celu określenia przynależności gatunkowej nowego szczepu *Lactobacillus reuteri* ŁOCK 1092 zsekwencjonowano region DNA kodujący gen 16S rRNA o długości 1379 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 reuteri* JCM 1112 stwierdzono podobieństwo nowego szczepu bakterii do gatunku *Lactobacillus reuteri* z prawdopodobieństwem 99,71%.

Nowy szczep ŁOCK 1092 hoduje się na podłożu Rogosa stanowiącym wybiórcze medium przeznaczone 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, korzystnie 5,5, w temperaturze 15–45°C, korzystnie 37°C w czasie 48 godzin. W podłożu tym szczep rośnie w postaci białych-kremowych, okrągłych kolonii, o gładkiej powierzchni i regularnych brzegach, o średnicy około 1–2 mm.

Szczep ŁOCK 1091 hoduje się także na podłożu płynnym MRS, stanowiącym modyfikację podłoża Rogosa, 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, korzystnie 5,5, w temperaturze 15–45°C, korzystnie 37°C w czasie 48 godzin. W podłożu tym szczep rośnie tworząc jednorodną zmiętniętą pożywkę.

Do wzrostu szczep preferuje środowisko wzbogacone w 5% (v/v) CO₂. Rośnie jednak zarówno w warunkach tlenowych, jak i względnie beztlenowych. Cechy morfologiczne szczepu ŁOCK 1092

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 1092

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 1092 jest zdolny do rozkładu glukozy zarówno w obecności tlenu, jak i w warunkach beztlenowych, czyli na drodze fermentacji.

Zgodnie z testem API 50 CHL szczep ŁOCK 1092 jest zdolny do fermentacji sacharydów i ich pochodnych, jak ryboza, ksyloza, galaktoza, glukoza, maltoza, laktoza, melibioza, sacharoza, rafinoza.

Szczep ŁOCK 1092 charakteryzuje się metabolizmem względnie heterofermentatywnym. Glukozę fermentuje z wytworzeniem kwasu mlekowego w ilości 10,79 $\mu\text{mol/ml}$, kwasu octowego (4,04 $\mu\text{mol/ml}$), kwasu masłowego (0,47 $\mu\text{mol/ml}$), aldehydu octowego (0,08 $\mu\text{mol/ml}$) i etanolu (0,15 $\mu\text{mol/ml}$). Test API ZYM wykazał, iż szczep ŁOCK 1092 wykazuje aktywność następujących enzymów: fosfatazy alkalicznej, esterazy, α -galaktozydazy, β -galaktozydazy, α -glukozydazy, β -glukozydazy, kwaśnej fosfatazy, fosfoamidazy, aryamidazy leucyny, aryamidazy waliny, aryamidazy cystyny. Ponadto stwierdzono, że szczep ŁOCK 1092 nie wytwarza siarkowodoru, ani amoniaku z argininy, nie wykazuje zdolności rozkładu H_2O_2 .

Zdolność do wykorzystywania prebiotyków szczepu ŁOCK 1092

Szczep ŁOCK 1092 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%. Porównując natomiast wzrost szczepu ŁOCK 1092 w obecności prebiotyków ze wzrostem w obecności glukozy (próba odniesienia) stwierdzono, że w przypadku wszystkich przebadanych prebiotyków wzrost jest lepszy, co obrazuje wykres 1 przedstawiony na rysunku. Również w wyniku fermentacji inuliny szczep ŁOCK 1092 wytwarza najwyższe ilości kwasu mlekowego, przy najwyższym udziale kwasu L(+) mlekowego wynoszącym 88%. 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 1092

Szczep ŁOCK 1092 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 pH od 2,0 do 3,0. Szczep ŁOCK 1092 wykazuje również wysoką odporność na sole żółci w stężeniach 1% i 2% w czasie do 4 godzin. Szczep ŁOCK 1092 wykazuje oporność w stosunku do antybiotyków najczęściej stosowanych

u zwierząt hodowlanych, jak penicylina, kanamycyna, amoksycylina, doksycyklina, erytromycyna, tetracyklina. Szczep ten wykazuje również oporność w stosunku do kokcydiostatyków, takich jak diclazuril, decoquinat, narazyna-nikrabazyn.

Nadto nowy szczep 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*.

Szczep ŁOCK 1092 posiada niewielką aktywność fekalną. Spośród trzech enzymów: β -glukozydazy, β -glukuronidazy i ureazy aktywna jest tylko β -glukozydaza.

Szczep wykazuje także zdolności detoksyfikacyjne mykotoksyn, jak aflatoksyny B₁, ochratoksyny A, fumonizyny, toksyny T-2, zearalenonu, deoksyniwalenolu, które najczęściej mogą stanowić zanieczyszczenie zbóż i pasz dla zwierząt.

Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1092

Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1092 określono w trzech pożywkach fermentacyjnych (mieszkankach paszowych (P1, P2 i P3) o następującym składzie zmielonych ziaren: pasza P1 – 50% pszenicy, 30% jęczmienia i 20% kukurydzy, pasza P2 – 40% pszenicy, 30% jęczmienia, 20% kukurydzy i 10% żyta, pasza P3 – 40% pszenicy, 30% jęczmienia, 20% kukurydzy i 10% soi. Kompozycję pożywek fermentacyjnych ustalono na bazie ziaren stosowanych w żywieniu zwierząt monogastrycznych. Mieszanki paszowe roztworzono w wodzie w proporcjach: 1:1,0; 1:1,5; 1:2,0. Pożywki fermentacyjne zaszczerpiono zawiesiną bakterii w ilości 10⁶ 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 przedstawiono w postaci wykresu 2 na rysunku, zaś plon biomasy oraz produktywność hodowli 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. reuteri</i> ŁOCK 1092	1,10 ×10 ⁹	3,13 ×10 ¹⁰	4,96 ×10 ⁸	3,65 ×10 ¹⁰	1,04 ×10 ¹²	1,65 ×10 ¹⁰	0,15	0,16	0,21	8,42	5,80	4,18
Pożywka kontrolna MRS												
<i>Lb. reuteri</i> ŁOCK 1092	1,95×10 ⁹			6,48×10 ¹⁰			0,09			0,95		

Okazało się, że dynamika wzrostu oraz plon biomasy są uzależnione od składu pożywki fermentacyjnej i najwyższe wartości, w odniesieniu do podłoża kontrolnego MRS, otrzymano dla hodowli w pożywce fermentacyjnej P2. Plon komórek w tej pożywce wynosił $3,13 \times 10^{10}$ jtk/g, a produktywność szczepu wzrosła do poziomu $1,04 \times 10^{12}$ jtk/kgxh. Stwierdzono ponadto, że optymalną pożywką dla wzrostu szczepu ŁOCK 1092 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 1092 wykazuje także trwałość przechowalniczą w postaci liofilizatu w warunkach chłodniczych (4-5°C) oraz w temperaturze pokojowej (25°C) w trakcie 4 miesięcy przechowywania.

Szczep ŁOCK 1092 znajduje zastosowanie jako dodatek do pasz dla zwierząt monogastrycznych w profilaktyce występowania chorób bakteryjnych i zatruc wywołanych mykotoksynami oraz poprawiający bezpieczeństwo chowu zwierząt.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

P r z y k ł a d I

Szczep ŁOCK 1092 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 5,5, 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 $1,9 \times 10^9$ komórek/ml.

P r z y k ł a d II

Szczep ŁOCK 1092 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 5,5, w obecności CO₂ wprowadzonego w ilości 5% (v/v), w temperaturze 37°C w warunkach względnie beztlenowych.

Po 48 godzinach hodowli wyhodowane komórki oddzielono od podłoża na wstrząsarce uzyskując gęstość $1,95 \times 10^9$ komórek/ml.

P r z y k ł a d III

Bakterie otrzymane jak w przykładzie I umieszczono w środowisku o pH 2 i 3. W pH 3,0 przeżywalność komórek po 60 minutach wynosi 95%, a po 240 minutach 90%. Natomiast w pH 2,0 po 60 minutach przeżywa 93% komórek, a po 240 minutach 88%.

P r z y k ł a d IV

Bakterie otrzymane jak w przykładzie I poddano działaniu żółci o stężeniach 1% i 2% w czasie do 4 godzin. Po 4 godzinach inkubacji w obecności 2% żółci przeżywalność komórek wynosi 92%, a przy stężeniu żółci 1% przeżywa 98% 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. Temperatura chłodnicza zapewniła większą stabilność i trwałość. Przechowywanie szczepu LOCK 1092 przez 4 miesiące spowodowało obniżenie liczby żywych komórek o 8% dla temperatury chłodniczej i o 15% dla temperatury pokojowej.

Wykaz sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA szczepu bakterii *Lactobacillus reuteri* LOCK 1092, która określa jego przynależność gatunkową:

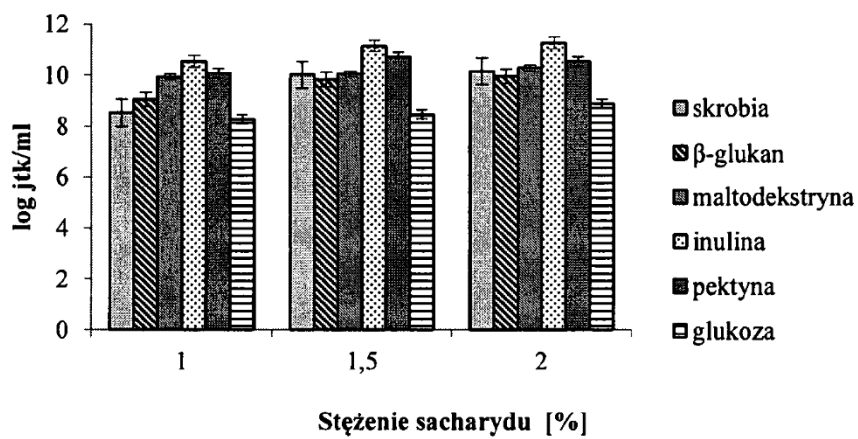
```
TGATTGTATGGTGCTTGACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTA-
ACACGTAGGTAACCTGCCCCGAGCGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATA-
ACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGAC-
CTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTT-
GAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAACACGGTCCATACTCCTACGGGA-
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAA-
GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAAGTGCCTGAGAGTAAGTGT-
CACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT-
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTA-
GGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTT-
GAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAA-
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGA-
AAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTA-
GGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCAT-
TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT-
GACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTAC-
CAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCCTTCGGGGACGCAATGACA-
GGTGGTGCATGGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA-
ACGAGCGCAACCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGT-
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA-
CACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAAT-
CTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAAT-
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACAC-
CGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTA
```

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

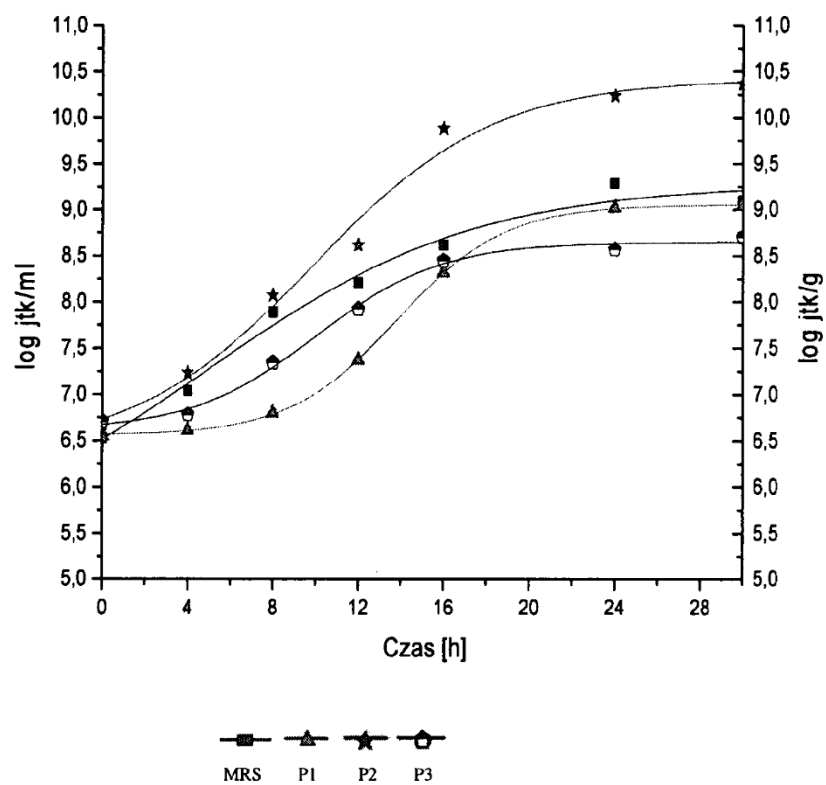
Zastrzeżenie patentowe

1. Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus reuteri* LOCK 1092 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu pod numerem B/00123, o właściwościach probiotycznych.

Rysunki



Wykres 1



Wykres 2