

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233262**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422603**

(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 paracasei*

(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 233262 B1

Opis wynalazku

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

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.

Dotychczas znane są szczepy bakterii mlekowych *Lactobacillus paracasei* o właściwościach probiotycznych, jak *Lactobacillus paracasei* CRL-431, *Lactobacillus paracasei* F19, *Lactobacillus paracasei* ŁOCK 0919 z opisu patentowego PL 209988, *Lactobacillus paracasei* ŁOCK 0910 z opisu patentowego PL 221961, *Lactobacillus paracasei* ŁOCK 0920 z opisu zgłoszenia patentowego P. 396640.

Przedmiotem **wynalazku** jest nowy szczep bakterii mlekowych z gatunku *Lactobacillus paracasei*, który oznaczono symbolem ŁOCK 1091 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/00122.

Szczep bakterii ŁOCK 1091 wyizolowano z treści jelitowej lochy.

Szczep ŁOCK 1091 jest to Gram-dodatnia pałeczka, nieruchliwa, nie przetrwalnikująca. Jest szczepem o właściwościach probiotycznych, stanowiącym homolog bakterii z gatunku *Lactobacillus paracasei* o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA przedstawionej na końcu opisu.

W celu określenia przynależności gatunkowej nowego szczepu *Lactobacillus paracasei* ŁOCK 1091 zsekwencionowano region DNA kodujący gen 16S rRNA o długości 1442 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 paracasei subsp. paracasei* ATCC 25302 stwierdzono podobieństwo nowego szczepu bakterii do gatunku *Lactobacillus paracasei* z prawdopodobieństwem 99,51%.

Nowy szczep ŁOCK 1091 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 zawiesinę pożywkową.

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 1091

W obrazie mikroskopowym bakterie szczepu ŁOCK 1091 mają kształt krótkich, prostych pałeczek o długości 4–5 µm i o szerokości do 1 µm. Pałeczki nie wytwarzają przetrwalników.

Cechy fizjologiczne i biochemiczne nowego szczepu ŁOCK 1091

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 1091 jest zdolny do rozkładu glukozy zarówno w obecności tlenu, jak i w warunkach beztlenowych, czyli na drodze fermentacji.

Według testu API 50 CHL szczep ŁOCK 1091 zdolny jest do fermentacji następujących sacharydów i ich pochodnych: rybozy, galaktozy, glukozy, fruktozy, mannozy, inozytolu, mannitolu, sorbitolu, N-acetyloglukozaminy, amygdaliny, arbutyny, esculiny, salicyny, celobiozy, maltozy, laktozy, sacharozy, trehalozy, inuliny, melecytozy, gencjobjozy, D-turanozy, D-tagatozy, glukonianu.

Szczep ŁOCK 1091 charakteryzuje się metabolizmem względnie heterofermentatywnym. Glukozę fermentuje z wytworzeniem kwasu mlekowego w ilości 9,41 $\mu\text{mol/ml}$, kwasu octowego (4,02 $\mu\text{mol/ml}$), kwasu masłowego (0,40 $\mu\text{mol/ml}$), aldehydu octowego (0,09 $\mu\text{mol/ml}$) i etanolu (0,14 $\mu\text{mol/ml}$).

Test API ZYM wykazał, że szczep ŁOCK 1091 wykazuje aktywność następujących enzymów: fosfatazy alkalicznej, esterazy, α -galaktozydazy, β -glukuronidazy, β -glukozydazy, kwaśnej fosfatazy, fosfoamidazy, aryamidazy leucyny, aryamidazy waliny, aryamidazy cystyny, N-acetyloglukozaminidazy.

Ponadto stwierdzono, że szczep ŁOCK 1091 nie wytwarza siarkowodoru, ani amoniaku z argininy, nie wykazuje zdolności rozkładu H_2O_2 .

Zdolność szczepu ŁOCK 1091 do wykorzystywania prebiotyków

Szczep ŁOCK 1091 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 maltodekstryna i inulina w stężeniu 2%. Z porównania wzrostu szczepu ŁOCK 1091 w obecności prebiotyków do wzrostu w obecności glukozy (próba odniesienia) wynika, że w przypadku wszystkich przebadanych prebiotyków wzrost jest porównywalny lub lepszy, co obrazuje wykres 1 na rysunku. W wyniku fermentacji inuliny (12,59 $\mu\text{mol/ml}$) szczep ŁOCK 1091 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 1091

Szczep ŁOCK 1091 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.

Lactobacillus paracasei ŁOCK 1091 wykazuje również wysoką odporność na sole żółci w stężeniach 1% i 2% w czasie do 4 godzin.

Szczep ŁOCK 1091 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, jak diclazuril, decoquat, narazyna-nikrabazyn.

Lactobacillus paracasei ŁOCK 1091 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 1091 posiada niewielką aktywność fekalną. Spośród trzech enzymów: β -glukozydazy, β -glukuronidazy i ureazy aktywna jest tylko β -glukuronidaza.

Szczep ŁOCK 1091 wykazuje zdolności detoksyfikacyjne mykotoksyn, jak aflatoksyna B₁, ochratoksyna A, fumonizyna, toksyna T-2, zearalenon, deoksyniwalenol, które najczęściej mogą stanowić zanieczyszczenie zbóż i pasz dla zwierząt.

Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1091

Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1091 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 monogastycznych. Mieszkanki paszowe roztworzono 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 kontrolnej MRS przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela

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. para-casei</i> ŁOCK 1091	1,25 ×10 ⁹	2,08 ×10 ¹⁰	2,70 ×10 ⁹	4,16 ×10 ¹⁰	6,95 ×10 ¹¹	8,99 ×10 ¹⁰	0,17	0,19	0,15	7,71	2,38	5,21
Pożywka kontrolna MRS												
<i>Lb. para-casei</i> ŁOCK 1091	3,15×10 ⁹			1,05×10 ¹¹			0,18			1,34		

Okazało się, że dynamika wzrostu, 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 $2,08 \times 10^{10}$ jtk/g, a produktywność szczepu wzrasta do poziomu $6,95 \times 10^{11}$ jtk/kgxh. Stwierdzono ponadto, że optymalną pożywką dla wzrostu szczepu ŁOCK 1091 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 1091 wykazuje również trwałość przechowalniczą w postaci liofilizatu w warunkach chłodniczych (4–5°C) oraz w temperaturze pokojowej (25°C) w trakcie 4 miesięcy przechowywania.

Szczep ŁOCK 1091 znajduje zastosowanie jako dodatek do pasz dla zwierząt monogastycznych w profilaktyce występowania chorób bakteryjnych i zatruc wywołanych mykotoksynami oraz w celu poprawienia bezpieczeństwa chowu zwierząt.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

Przykład I

Szczep ŁOCK 1091 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 $3,10 \times 10^9$ komórek/ml.

Przykład II

Szczep ŁOCK 1091 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 $3,15 \times 10^9$ komórek/ml.

Przykład III

Bakterie otrzymane jak w przykładzie I umieszczono w środowisku o pH 2 i 3.

W pH 3,0 przeżywalność komórek po 60 minutach wynosiła 96%, a po 240 minutach 93%. Natomiast w pH 2,0 po 60 minutach przeżyło 94% 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 w obecności żółci o stężeniu 2% przeżywalność komórek wynosiła 94%, a przy stężeniu żółci 1% przeżyło 95% 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 14% dla temperatury pokojowej. Temperatura chłodnicza zapewniła większą stabilność i trwałość.

Wykaz sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16SrRNA szczepu bakterii *Lactobacillus paracasei* ŁOCK 1091, która określa jego przynależność gatunkową:

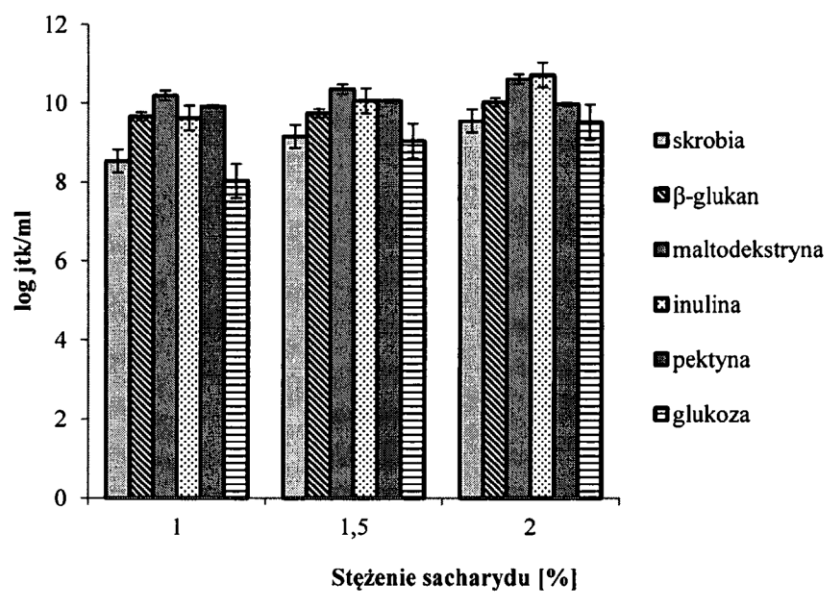
```
GCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGACCCGAGATTCAACATGGA-
ACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTT-
GGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAA-
GATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAT-
GGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACGTAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA-
CACGGCCAAACTCCTACGGGACGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCT-
GATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAA-
GAATGGTCGGCAGAGTAACGTGTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTA-
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATT-
GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGA-
GGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCTC-
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAA-
GGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA-
TACCTTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTT-
CAGTGCCGCGAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT-
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA-
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCA-
GGTTTCCCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGATGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGA-
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTT-
GGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT-
CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGAC-
CGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTA-
ACCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTTGAAAT-
ACGTTTCCCGGGCCTTGATACACCCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAACACCCGAAC-
CCGGGGGCGTAACCCCTTGTAGGGAGCGATACCGT
```

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

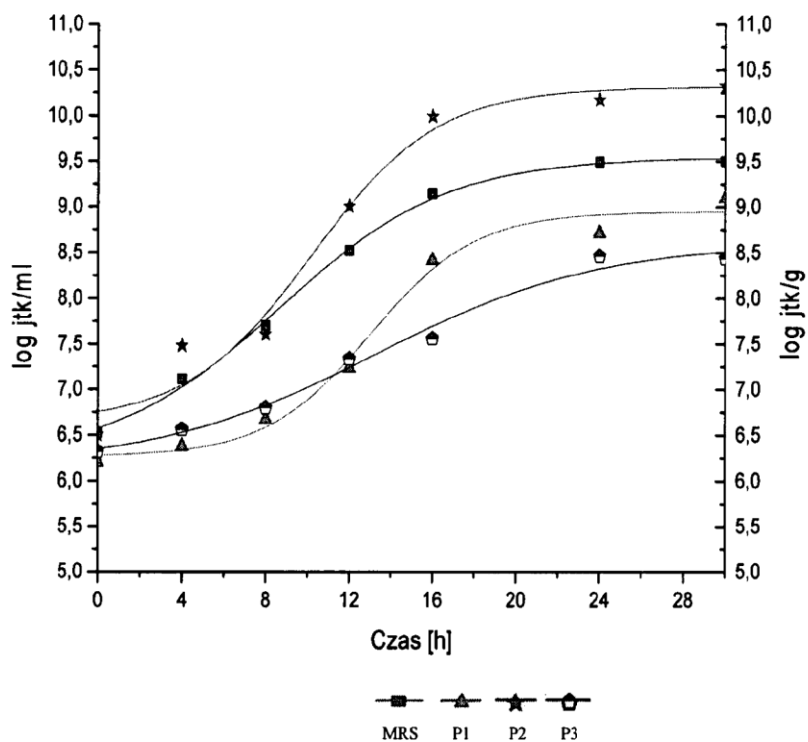
Zastrzeżenie patentowe

1. Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus paracasei* ŁOCK 1091 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu pod numerem B/00122, o właściwościach probiotycznych.

Rysunki



Wykres 1



Wykres 2