

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **226294**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **411316**

(22) Data zgłoszenia: **19.02.2015**

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

(54) **Szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus*
oraz sposób otrzymywania L-mleczanu wapnia przy użyciu tego szczepu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
29.08.2016 BUP 18/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.07.2017 WUP 07/17

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

PIOTR WALCZAK, Łódź, PL

ELŻBIETA OŁTUSZAK-WALCZAK, Łódź, PL

ANNA OTLEWSKA, Łódź, PL

ANNA RYGAŁA, Łódź, PL

AGATA CZYŻOWSKA, Łódź, PL

KATARZYNA DYBKA, Skomlin, PL

PATRYCJA PIETRASZEK, Dobiecin, PL

PL 226294 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus* oraz sposób otrzymywania mleczanu wapnia przy użyciu tego szczepu.

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.

Kwas L-mlekowy lub jego sole znajdują zastosowanie w produkcji biodegradowalnych tworzyw sztucznych – polimleczanów PLA. Produkcja biodegradowalnego polimeru PLA wymaga optycznie czystego kwasu L-mlekowego, który jest przerabiany na LL-laktyd, prekursor izotaktycznego krystalicznego kwasu polimlekowego o pożądanych cechach fizykochemicznych. LL-laktyd poddaje się następnie reakcji polimeryzacji z otwarciem pierścienia co prowadzi do wytworzenia polilaktydu PLA. Zastosowanie do produkcji polimeru mieszaniny racemicznej DL kwasu mlekowego prowadzi do powstawania ataktycznego polimeru o strukturze bezpostaciowej i cechach elastomeru. Kwas L-mlekowy jest produkowany metodami fermentacyjnymi przy wykorzystaniu wyselekcjonowanych szczepów bakterii mlekowych zdolnych do syntezy izomeru L kwasu mlekowego. Podstawową zaletą metody fermentacyjnej jest fakt, iż przy doborze odpowiedniego mikroorganizmu otrzymuje się jeden izomer kwasu mlekowego, w przeciwieństwie do metod chemicznych, gdzie produktem jest mieszanina racemiczna. Wybór drobnoustroju do produkcji kwasu L-mlekowego metodą fermentacyjną zależy przede wszystkim od rodzaju węglowodanów stosowanych do fermentacji. Do pożądanych cech drobnoustrojów wykorzystywanych w przemyśle do produkcji tego kwasu zalicza się: zdolność do szybkiej i całkowitej fermentacji sacharydów, niskie zapotrzebowanie szczepów na substancje azotowe, wysoką wydajność produkcji, a przede wszystkim wytwarzanie pożądanej formy izomerycznej i małej ilości produktów ubocznych. Bakterie produkujące kwas mlekowy powinny być odporne na niskie pH pożywki i rosnąć w podwyższonej temperaturze 40–55°C. Cechami takimi charakteryzują się, między innymi, bakterie mlekowe należące do rodzajów *Lactobacillus* i *Enterococcus*. Kwas mlekowy jest produkowany na skalę przemysłową z wykorzystaniem różnych substratów takich jak glukoza, sacharoza, sacharoza techniczna, laktoza, melasa buraczana i trzcinowa, serwatka, permeat serwatki WPC, hydrolizaty skrobi zbóż (kukurydza, owies, żyto, pszenżyto, jęczmień, pszenica, ryż) i roślin okopowych (ziemniaki, kasawa), hydrolizaty surowców lignocelulozowych.

W tradycyjnej, fermentacyjnej technologii wytwarzania kwasu mlekowego wykorzystuje się szczepy bakterii *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* charakteryzujące się wysokim optimum temperatury wzrostu 50–55°C, odpornością na niskie pH i dużą szybkością fermentacji. Szczepy należące do tego gatunku wytwarzają w przewodzie kwas D-mlekowy lub mieszaninę racemiczną 50% formy L i 50% formy D. Ich podstawowym ograniczeniem jest wąskie spektrum fermentowanych sacharydów, co sprawia, że mogą one fermentować jedynie niektóre substraty (glukoza, fruktoza, mannoza, sacharoza, maltoza, laktoza – 20% szczepów) i surowce zawierające te sacharydy. Bakterie *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* fermentują preferencyjnie sacharozę, a fermentacja glukozy zachodzi wolno. Ponieważ bakterie mlekowe są wrażliwe na niskie pH powodowane wytwarzaniem kwasu mlekowego, pożywkę zobojętnia się roztworem wodorotlenku sodu, wodą amoniakalną lub wodorotlenkiem wapnia. Najczęściej do pożywki dodaje się zmieloną kredę (węglan wapnia) w ilości niezbędnej do zobojętnienia powstającego kwasu mlekowego, co stabilizuje pH podczas procesu fermentacji na poziomie 5,4–5,6. Proces fermentacji zachodzi w temperaturze 50–55°C w ciągu 2 do 8 dni (zwykle 4–5 dni).

Do produkcji kwasu L-mlekowego w skali przemysłowej wykorzystuje się także szczepy bakterii *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* (szczepy *Lactobacillus rhamnosus* CASL, *Lactobacillus rhamnosus* M1), *Lactobacillus zeae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus mundtii*.

Znany jest sposób fermentacyjny wytwarzania kwasu L-mlekowego przy użyciu szczepu *Lactobacillus rhamnosus* CASL z hydrolizatu skrobi zawartej w bulwach manioku *Manihot esculenta*. Szczep ten produkuje kwas L-mlekowy z wydajnością dochodzącą do 96% osiągając końcowe stężenie produktu na poziomie 180 g/l.

Znany jest także sposób wytwarzania kwasu L-mlekowego przy użyciu szczepu *Lactobacillus rhamnosus* M1 z hydrolizatu skrobi kukurydzianej.

Wysokie wymagania pokarmowe bakterii mlekowych sprawiają że pożywka wzbogacana jest w organiczne formy azotu w postaci ekstraktu drożdżowego, namoku kukurydzianego, ekstraktu kiełków słodowych, hydrolizatów białek i innych źródeł aminokwasów oraz witamin.

Czysty kwas L-mlekowy wytwarza się także przy użyciu szczepu przetrwalnikujących bakterii *Bacillus coagulans* w warunkach beztlenowych oraz przy użyciu szczepu *Enterococcus mundtii* z surowców zawierających D-ksylozę.

Szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 **stanowiący przedmiot wynalazku**, został zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00049.

Szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 wyizolowano z fermentującej roślinnej kiszonki paszowej. Szczep ten charakteryzuje się zdolnością do wzrostu w temperaturze 45°C, co odróżnia go od blisko spokrewnionych gatunków *Lactobacillus casei* oraz *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei*, których optymalna temperatura wzrostu jest niższa i wynosi 37°C. Przynależność gatunkową nowego szczepu określono metodą sekwencjonowania genu 16S rybosomalnego RNA i stwierdzono, że jest on podobny do znanych szczepów *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* Lc705, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 8530, których sekwencje DNA zdeponowano w GenBank Database Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH, National Institute of Health, USA) pod numerami AP011548, FM179322, NC013199, CP003094.

Na końcu opisu jest zamieszczony wykaz pełnej sekwencji genu 16S rRNA szczepu *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1, w porównaniu z analogicznymi sekwencjami genu 16S rRNA szczepów *Lactobacillus rhamnosus*, ATCC 53103, GG, Lc705 i ATCC 8530. Sekwencja DNA genu 16S rybosomalnego RNA szczepu BioPL1 jest w 100% zgodna z analogiczną sekwencją szczepu ATCC 8350 i różni się dwoma nukleotydami z analogiczną sekwencją szczepów GG oraz ATCC 53103 (99,9% zgodności) oraz jednym nukleotydem z sekwencją szczepu Lc705 (99,9%). Dane te wskazują jednoznacznie na przynależność szczepu BioPL1 do gatunku *Lactobacillus rhamnosus*, lecz jednocześnie nie świadczą o identyczności tego szczepu ze szczepem *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 8530.

Szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 wytwarza preferencyjnie wyłącznie kwas L-mlekowy i fermentuje glicerol, D-arabinozę, D-rybozę, galaktozę, glukozę, fruktozę, mannozę, ramnozę, dulcytol, inozytol, mannitol, sorbitol, N-acetyloglukozaminę, amigdalinę, arbutynę, eskulinę, salicynę, celobiozę, maltozę, laktozę, sacharozę, trehalozę, melezytozę, amidon (skrobia), gentiobiozę, tagatozę, L-fukozę, L-arabitol i glukonian oraz nie fermentuje sorbozy, metylo-D-glukozydu i turanozy. Nowy szczep zawiera system CRISPR-Cas (ang. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated proteins), który zabezpiecza komórki bakterii przed inwazją obcego DNA fagowego lub plazmidowego. System ten składa się z czterech genów *csn1*, *cas1*, *cas2*, i *cas3* kodujących białka sprzężone ze zgrupowanymi, regularnie przedzielonymi krótkimi palindromowymi powtórzeniami (CRISPR). Powtarzalną sekwencję nukleotydów o długości 36 par zasad w strukturze CRISPR szczepu *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 przedstawiono na końcu opisu, przy czym pogrubioną i podkreśloną czcionką zaznaczono różnice pomiędzy prostymi powtórzeniami.

Region zgrupowanych regularnie przedzielonych krótkich palindromowych powtórzeń (CRISPR) zawiera 21 prostych powtórzeń o długości 36 nukleotydów i występującej 17 razy sekwencji DNA 5'-GTCTCAGGTAGATGTCAGATCAATCAGTTCAAGAGC-3', a także zawiera 20 unikalnych i charakterystycznych sekwencji łącznikowych (ang. spacers) o kolejności nukleotydów przedstawionej na końcu opisu, przy czym na końcu opisu, dla porównania, przedstawiono także sekwencje palindromowe powtórzeń systemu CRISPR-Cas szczepów *Lactobacillus rhamnosus* GG i ATCC53103.

Z porównania wynika, iż sekwencje łącznikowe systemu CRISPR-Cas szczepów *Lactobacillus rhamnosus* GG i ATCC53103 występują w ilości 24 sztuk i różnią się całkowicie od sekwencji łącznikowych szczepu *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1.

Nowy szczep bakterii ma charakterystyczne cechy gatunku *Lactobacillus rhamnosus*, komórki mają kształt krótkich gramdodatnich pałeczek połączonych w łańcuszki, jest nieruchliwy, nieprzetrwalnikujący, nie wytwarza katalazy oraz oksydazy.

Nowy szczep charakteryzuje się metabolizmem względnie heterofermentatywnym wytwarzając kwas L-mlekowy jako główny produkt fermentacji sacharydów. Spośród 49 substratów wchodzących w skład testu API 50CHL BioMerieux Francja, fermentuje 29 badanych substancji: glicerol, D-arabinozę, D-rybozę, galaktozę, glukozę, fruktozę, mannozę, ramnozę, dulcytol, inozytol, mannitol, sorbitol, N-acetylo-glukozaminę, amigdalinę, arbutynę, eskulinę, salicynę, celobiozę, maltozę, laktozę, sacharozę, trehalozę, melezytozę, amidon (skrobia), gentiobiozę, tagatozę, L-fukozę, L-arabitol, gluko-

nian. W odróżnieniu od szczepu typowego nie fermentuje sorbozy, metylo-D-glukozydu i turanozy. Fermentacja D-arabinozy, dulcytolu, skrobi (amidonu), L-fukozy L-arabitolu odróżnia ten szczep od typowych przedstawicieli tego gatunku.

Nowy szczep dobrze rośnie w pożywce płynnej wg De Man, Rogosa, Sharpe o nazwie handlowej MRS zawierającej fermentowane monosacharydy jak i disacharydy w ilości 2% wagowych/objętościowych. Na pożywce MRS z dodatkiem 2% wagowych/objętość D-glukozy zestalanej agarem szczep rośnie w postaci średniej wielkości wypukłych błyszczących kolonii o średnicy 2–3 mm i jasno kremowej barwie.

W systemie CRISPR pomiędzy palindromowymi powtórzeniami znajdują się unikalne sekwencje nukleotydów zwane łącznikami o długości 30–31 par zasad odpowiedzialne za odporność komórek bakterii na atak określonego bakteriofaga lub plazmidu. Sekwencje te po transkrypcji na RNA i odpowiedniej obróbce rybonukleazami, wraz z białkami Cas i Csn, rozpoznają obce DNA fagowe lub plazmidowe i hamują jego replikację. System CRISPR-Cas rejestruje historię infekcji fagowych lub plazmidowych danego szczepu i jest jego unikalną cechą genetyczną odróżniającą go od innych szczepów tego samego gatunku. Jest to rodzaj odcisku palca pozwalający na bezbłędną identyfikację szczepu zawierającego system CRISPR-Cas.

Na końcu opisu przedstawiono także unikalną charakterystyczną sekwencję CRISPR w nowym szczepie *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1, o długości 1357 par zasad.

Sposób otrzymywania L-mleczanu wapnia, w drodze hodowli szczepu bakterii mlekowych *Lactobacillus rhamnosus*, polegający na hodowli inokulum bakterii w wyjałowionej płynnej pożywce inokulacyjnej zawierającej glukozę, Pepton Bacto, ekstrakt drożdżowy, CaCO_3 oraz wodę destylowaną, o początkowym pH = 7,2, w temperaturze 37–45°C w czasie 24 godziny, następnie zaszczepieniu otrzymanym inokulum wyjałowionej pożywki produkcyjnej zawierającej ekstrakt drożdżowy, produkt pochodzenia roślinnego i/lub zwierzęcego, sole mineralne, jak K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nadto CaCO_3 i wodę destylowaną, o początkowym pH=7,2 i prowadzeniu hodowli produkcyjnej wgłębniej w warunkach beztlenowych, a po jej zakończeniu na dodaniu do bioreaktora zawiesiny $\text{Ca}(\text{OH})_2$, inaktywacji bakterii, oddzieleniu biomasy bakterii od brzezki pofermentacyjnej zawierającej L-mleczan wapnia i krystalizacji L-mleczanu wapnia z brzezki, **według wynalazku** charakteryzuje się tym, że stosuje się szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1. Hodowlę inokulum prowadzi się na pożywce zawierającej w 1 l pożywki 50 g glukozy, 5 g Pepton Bacto, 10 g ekstraktu drożdżowego, 25 g CaCO_3 i wodę destylowaną do 1000 ml. Hodowlę produkcyjną prowadzi się w pożywce zawierającej jako produkt pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego sok gęsty cukrowniczy, enzymatyczny hydrolyzат ziarna owsa nagiego *Avena nuda*, koncentrat permeatu serwatki lub glukozę w ilości 5–15% wagowych, ekstrakt drożdżowy w ilości 1–5 g/l pożywki, K_2HPO_4 w ilości 0,5–2,5 g/l pożywki, NaH_2PO_4 w ilości 0,5–2,5 g/l pożywki, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w ilości 0,02–0,2 g/l pożywki, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ w ilości 0,05–0,2 g/l pożywki, CaCO_3 w ilości 25,0–83,0 g/l pożywki i wodę destylowaną do 1000 ml, zaszczepionej inokulum użytym w ilości 10–50 ml/l, w temperaturze 35–45°C przy pH zmieniającym się samorzutnie od 7,2 do 5,2 w czasie 30–72 godziny. Krystalizację L-mleczanu wapnia z brzezki pofermentacyjnej prowadzi się w temperaturze 0–5°C, po czym powstający krystaliczny L-mleczan wapnia oddziela się od ługu pokrystalizacyjnego, przemywa wodą lodową i suszy w suszarce próżniowej lub z nawiewem gorącego powietrza.

W wyniku hodowli szczepu *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 w pożywkach produkcyjnych uzyskuje się L-mleczan wapnia, który może być stosowany jako dodatek do pasz dla bydła, trzody chlewnej i drobiu. L-mleczan wapnia może być również wykorzystywany jako surowiec do otrzymywania czystego kwasu L-mlekowego do zastosowań w przemyśle spożywczym bądź do produkcji biodegradowalnych polimerów – polimleczanu PLA.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

P r z y k ł a d 1

Szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1, przechowywany w formie zamrożonej zawiesiny komórek w pożywce MRS z dodatkiem 15% objętościowo glicerolu, uaktywniono przez jego rozmrożenie i posiew redukcyjny na zestaloną agarem pożywkę MRS, po czym płytki Petriego inkubowano w czasie od 48 do 72 godzin w temperaturze od 37 do 45°C. Po tym czasie na powierzchni pożywki agarowej wyrosły pojedyncze kolonie bakterii o średnicy od 1 do około 2,5 mm. Kolonie bakterii sprawdzono mikroskopowo pod kątem prawidłowej morfologii komórek bakterii i obecności potencjalnych zakażeń innymi bakteriami. Do sporządzenia hodowli inokulacyjnej wybrano dwa razy po trzy sprawdzone największe kolonie i przeniesiono je do 10 ml jałowej płynnej pożywki MRS o następują-

cym składzie [g/l]: glukoza 20,0, ekstrakt drożdżowy 4,0, ekstrakt mięsny 8,0, cytrynian di-amonu 2,0, wodorofosforan di-potasu 2,0, octan sodu 5,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05, woda destylowana do 1000 ml. Początkowe pH pożywki nastawiono na 7,2 za pomocą 30% roztworu NaOH, rozlano po 10 ml do probówek bakteriologicznych i sterylizowano w temperaturze 121°C przez 15 minut. Zaszczepione probówki inkubowano w temperaturze od 37 do 45°C przez 16–24 godziny. Mikroskopowo sprawdzono czy otrzymane hodowle bakterii nie zawierają obcej mikroflory. Zawartość poszczególnych probówek przeniesiono jałowo do dwóch porcji po 250 ml pożywki inokulacyjnej o następującym składzie [g/l]: glukoza 50,0, Pepton Bacto 5,0, ekstrakt drożdżowy 10,0, CaCO_3 25,0, woda destylowana do 1000 ml. Początkowe pH pożywki nastawiono na 7,2 za pomocą 30% roztworu NaOH, rozlano po 250 ml do butelek o pojemności 500 ml z zakrętką i sterylizowano w temperaturze 121°C przez 15 minut. Zaszczepione butelki inkubowano w temperaturze od 37 do 45°C przez 24 godziny. Po hodowli sprawdzono jakość otrzymanego inokulum metodą mikroskopową i makroskopowo. Całkowite rozpuszczenie się kredy i intensywne gazowanie wskazywało na dobrą jakość otrzymanego inokulum. Do zaszczepienia bioreaktora wybierano inokulum ocenione jako bardziej aktywne. Proces fermentacji mlekowej prowadzono w bioreaktorze o pojemności 7,0 l zawierającym 5 l jałowej pożywki o następującym składzie [g/l]: sok gęsty buraczany 66°Bx 227,3, ekstrakt drożdżowy K_2HPO_4 0,5, NaH_2PO_4 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05, CaCO_3 83,4, odpieniacz „Structol” 0,2, woda destylowana do 1000 ml. Początkowe pH pożywki nastawiono na 7,2 za pomocą 30% roztworu NaOH. Pożywkę sterylizowano w bioreaktorze z włączonym mieszadłem (200 obrotów/minutę) w temperaturze 121°C przez 30 minut. Po sterylizacji i ochłodzeniu zawartości bioreaktora do temperatury roboczej uzupełniono jego zawartość do objętości 5 l jałową wodą destylowaną. Bioreaktor zaszczepiono 250 ml wcześniej przygotowanego inokulum. Proces fermentacji mlekowej prowadzono w temperaturze 42°C z mieszaniem (300 obrotów/minutę) w czasie 45 godzin. Końcowa wartość pH pożywki fermentacyjnej wynosiła 5,2. Po zakończeniu procesu fermentacji do bioreaktora dodano 30% zawiesinę $\text{Ca}(\text{OH})_2$ w ilości niezbędnej do zobojętnienia wolnego kwasu mlekowego i alkalizacji środowiska do pH = 10,0. Zawartość bioreaktora ogrzano do temperatury 80°C w celu inaktywacji komórek bakterii i koagulacji białek wytworzonych w procesie fermentacji. Po ochłodzeniu do temperatury 50°C brzeczkę pofermentacyjną w ilości 4900 ml odwirowano w litrowych porcjach (4500 obrotów/min., 40°C, 15 minut). Oddzielono supernatant od skoagulowanej biomasy otrzymując 4800 ml klarownej brzeczki pofermentacyjnej i 193,3 g mokrej masy bakterii i osadów organicznych i nieorganicznych. Zawartość bezwodnego mleczanu wapnia w brzeczce pofermentacyjnej wynosiła 189 g/l, a w przeliczeniu na czysty kwas mlekowy 156,0 g/l, co stanowiło 97% wydajności konwersji cukru do kwasu L-mlekowego. Do oznaczenia zawartości kwasów D- i L-mlekowego wykorzystano testy enzymatyczne o nazwie handlowej „D-Lactic Acid Test” i „L-Lactic Acid Test” firmy Megazyme. Udział procentowy izomeru kwasu L-mlekowego w otrzymanym kwasie mlekowym wynosił 98,1%.

Następnie przeprowadzono krystalizację L-mleczanu wapnia. W tym celu klarowną brzeczkę pofermentacyjną (4800 ml) przeniesiono do krystalizatora i pozostawiono w temperaturze +4°C przez 24 godziny. Zawartość krystalizatora uległa zestaleniu do gęstej pasty. Oddzielono kryształ pięciowodnego L-mleczanu wapnia przez odwirowanie powstałej pasty (4500 obrotów/minutę, +4°C, 15 minut) otrzymując 2427 g mokrego mleczanu wapnia oraz 2400 ml ługu pokrystalizacyjnego. Mleczan wapnia wysuszono w suszarce z nawiewem powietrza (44°C) otrzymując 890,5 g suchego produktu. Ług pokrystalizacyjny zatężono w wyparce próżniowej (60°C, 120 obrotów/minutę, 9000 Pa) do 1/3 objętości (800 ml) i poddano kolejnej krystalizacji, w wyniku której otrzymano 481,3 g mokrego mleczanu wapnia. Otrzymane kryształy pięciowodnego mleczanu wapnia przemyto wodą lodową o temperaturze 0°C i odwirowano (4500 obrotów/minutę, 4°C, 15 minut). Po płukaniu otrzymano 403,2 g mokrej masy mleczanu wapnia, a po jego wysuszeniu uzyskano 171,4 g suchego mleczanu wapnia. Po krystalizacji pozostało 400 ml ługu i 300 ml popłuczyn. Ogółem z procesu fermentacji otrzymano 1061,9 g suchego L-mleczanu wapnia, co stanowiło 82,6% wydajności w przeliczeniu na wykorzystany cukier. Pozostały w ługu pokrystalizacyjnym i popłuczynach mleczan wapnia wyodrębniono dodatkowo w kolejnym procesie krystalizacji.

P r z y k ł a d 2

Proces fermentacji mlekowej prowadzono w bioreaktorze o pojemności 7,0 l zawierającym 5 l jałowej pożywki o następującym składzie [g/l]: glukoza 150,0, ekstrakt drożdżowy 5,0, K_2HPO_4 2,6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05, CaCO_3 83,4, woda wodociągowa do 1000 ml. Początkowe pH pożywki nastawiano na 7,2 za pomocą 30% roztworu NaOH. Pożywkę sterylizowano w bioreaktorze z włączonym mieszadłem (200 obrotów/minutę) w temperaturze 121°C przez 30 minut.

Po sterylizacji i ochłodzeniu zawartości bioreaktora do temperatury roboczej, uzupełniano jego za wartość do objętości 5 l jałową wodą destylowaną. Bioreaktor zaszczepiano 250 ml inokulum otrzymanego z nowego szczepu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 i przygotowanego jak w przykładzie 1. Proces fermentacji mlekowej prowadzono w temperaturze 42°C z mieszaniem (300 obrotów/minutę) w czasie 72 godzin.

Po fermentacji zawartość bezwodnego mleczanu wapnia w brzeczce pofermentacyjnej wynosiła 139 g/l, a w przeliczeniu na czysty kwas 114,8 g/l, co stanowiło 76,5 % wydajności konwersji cukru do kwasu L-mlekowego.

Przykład 3

Proces fermentacji mlekowej prowadzono w bioreaktorze o pojemności całkowitej 1000 ml zawierającym 700 ml jałowej pożywki o składzie [g/l]: glukoza 100,0, ekstrakt drożdżowy 5,0, K_2HPO_4 2,6, $(NaH_4)_2SO_4$ 2,5, $CaCO_3$ 55,6, woda destylowana do 1000 ml. Początkowe pH pożywki nastawiano na 7,0 za pomocą 30% roztworu NaOH. Pożywkę sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut. Do zaszczepienia hodowli produkcyjnej użyto inokulum otrzymane z nowego szczepu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 i przygotowane jak w przykładzie 1, w ilości 70 ml. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C w czasie 53 godziny z mieszaniem (300 obrotów/minutę).

Po procesie fermentacji otrzymano roztwór mleczanu wapnia o stężeniu 105,2 g/l, a w przeliczeniu na czysty kwas 86,9 g/l, co stanowiło 93,2% wydajności konwersji cukru do kwasu L-mlekowego. W pożywce pozostało 6,8 g/l nieprzefermentowanej glukozy.

Przykład 4

Pożywka produkcyjna do fermentacji mlekowej zawierała enzymatyczny hydrolizat śruty owsa nagiego o zawartości cukrów redukujących 191,7 g/l. Hydrolizat śruty owsa nagiego przygotowano znaną metodą z 1,5 kg surowca, wykorzystując do procesu handlowe preparaty enzymatyczne – termostabilną α -amylazę „Aquazym ATL”, glukoamylazę „Spritase GA 14400” oraz słód owsiany z owsa nagiego. Proces fermentacji mlekowej prowadzono w kolbach stożkowych z płaskim dnem o pojemności 300 ml zawierających 200 ml jałowej pożywki o następującym składzie [g/l]: hydrolizat śruty owsa nagiego 625 ml (120 g cukrów redukujących), ekstrakt drożdżowy 1,0; K_2HPO_4 0,5, NaH_2PO_4 0,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,05, $CaCO_3$ 67,0, woda destylowana do 1000 ml. Początkowe pH pożywki nastawiano na 7,2 za pomocą 30% roztworu NaOH. Pożywkę sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut. Do zaszczepienia hodowli produkcyjnej użyto inokulum otrzymane z nowego szczepu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 i przygotowane jak w przykładzie 1, w ilości 10 ml. Hodowlę prowadzono w temperaturze 42°C przez 48 godzin na wytrząsarce (100 obrotów/minutę).

Po procesie fermentacji otrzymano roztwór mleczanu wapnia o stężeniu 117,7 g/l, a w przeliczeniu na czysty kwas 97,2 g/l, co stanowiło 90,7% wydajności konwersji cukru do kwasu mlekowego. Udział procentowy izomeru kwasu L-mlekowego w otrzymanym kwasie mlekowym wynosił 98,5%.

Przykład 5

Proces fermentacji mlekowej prowadzono w kolbach stożkowych z płaskim dnem o pojemności 500 ml zawierających 200 ml jałowej pożywki o następującym składzie [g/l]: koncentrat permeatu serwatki (80% wagowych laktozy) 150,0, ekstrakt drożdżowy 5,0, K_2HPO_4 2,6, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,05, $CaCO_3$ 67,0, woda destylowana do 1000 ml. Początkowe pH pożywki nastawiano na 7,2 za pomocą 30% roztworu NaOH. Pożywkę sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut. Do zaszczepienia hodowli produkcyjnej użyto inokulum otrzymane z nowego szczepu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 i przygotowane jak w przykładzie 1, w ilości 10 ml. Hodowlę prowadzono w temperaturze 42°C przez 48 godzin na wytrząsarce (100 obrotów/minutę).

Po procesie fermentacji otrzymano roztwór mleczanu wapnia o stężeniu 125,7 g/l, a w przeliczeniu na czysty kwas 103,8 g/l, co stanowiło 86,5% wydajności konwersji laktozy do kwasu mlekowego.

Wykaz pełnej sekwencji genu 16S rRNA szczepu *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1

	1	50
BioPL1	(1) AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG	
GG	(1) AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG	
ATCC 53103	(1) AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG	
ATCC 8530	(1) AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG	
Lc705	(1) AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG	
Konsensus	(1) AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG	
	51	100
BioPL1	(51) CAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAAT	
GG	(51) CAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAAT	
ATCC 53103	(51) CAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAAT	
ATCC 8530	(51) CAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAAT	
Lc705	(51) CAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAAT	
Konsensus	(51) CAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAAT	
	101	150
BioPL1	(101) TTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAA	
GG	(101) TTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAA	
ATCC 53103	(101) TTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAA	
ATCC 8530	(101) TTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAA	
Lc705	(101) TTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAA	
Konsensus	(101) TTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAA	
	151	200
BioPL1	(151) GTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAA	
GG	(151) GTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAA	
ATCC 53103	(151) GTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAA	
ATCC 8530	(151) GTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAA	
Lc705	(151) GTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAA	
Konsensus	(151) GTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAA	
	201	250
BioPL1	(201) CCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAAGCTATCGCTTTTGGATGGA	
GG	(201) CCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAAGCTATCGCTTTTGGATGGA	
ATCC 53103	(201) CCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAAGCTATCGCTTTTGGATGGA	
ATCC 8530	(201) CCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAAGCTATCGCTTTTGGATGGA	
Lc705	(201) CCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAAGCTATCGCTTTTGGATGGA	
Konsensus	(201) CCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAAGCTATCGCTTTTGGATGGA	
	251	300
BioPL1	(251) CCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAATGA	
GG	(251) CCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAATGA	

ATCC 53103	(251)	CCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGA	
ATCC 8530	(251)	CCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGA	
Lc705	(251)	CCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGA	
Konsensus	(251)	CCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGA	
		301	350
BioPL1	(301)	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG	
GG	(301)	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG	
ATCC 53103	(301)	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG	
ATCC 8530	(301)	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG	
Lc705	(301)	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG	
Konsensus	(301)	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG	
		351	400
BioPL1	(351)	CCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCA	
GG	(351)	CCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCA	
ATCC 53103	(351)	CCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCA	
ATCC 8530	(351)	CCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCA	
Lc705	(351)	CCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCA	
Konsensus	(351)	CCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCA	
		401	450
BioPL1	(401)	AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA	
GG	(401)	AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA	
ATCC 53103	(401)	AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA	
ATCC 8530	(401)	AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA	
Lc705	(401)	AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA	
Konsensus	(401)	AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA	
		451	500
BioPL1	(451)	ACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTGGCGTGA	
GG	(451)	ACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTGGCGTGA	
ATCC 53103	(451)	ACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTGGCGTGA	
ATCC 8530	(451)	ACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTGGCGTGA	
Lc705	(451)	ACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTGGCGTGA	
Konsensus	(451)	ACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTGGCGTGA	
		501	550
BioPL1	(501)	CGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA	
GG	(501)	CGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA	
ATCC 53103	(501)	CGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA	
ATCC 8530	(501)	CGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA	
Lc705	(501)	CGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA	
Konsensus	(501)	CGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA	

	551	600
BioPL1	(551) ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	
GG	(551) ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	
ATCC 53103	(551) ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	
ATCC 8530	(551) ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	
Lc705	(551) ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	
Konsensus	(551) ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	
	601	650
BioPL1	(601) AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGT	
GG	(601) AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGT	
ATCC 53103	(601) AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGT	
ATCC 8530	(601) AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGT	
Lc705	(601) AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGT	
Konsensus	(601) AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGT	
	651	700
BioPL1	(651) GCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCAT	
GG	(651) GCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCAT	
ATCC 53103	(651) GCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCAT	
ATCC 8530	(651) GCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCAT	
Lc705	(651) GCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCAT	
Konsensus	(651) GCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCAT	
	701	750
BioPL1	(701) GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC	
GG	(701) GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC	
ATCC 53103	(701) GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC	
ATCC 8530	(701) GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC	
Lc705	(701) GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC	
Konsensus	(701) GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC	
	751	800
BioPL1	(751) GGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAA	
GG	(751) GGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAA	
ATCC 53103	(751) GGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAA	
ATCC 8530	(751) GGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAA	
Lc705	(751) GGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAA	
Konsensus	(751) GGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAA	
	801	850
BioPL1	(801) CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTG	
GG	(801) CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTG	
ATCC 53103	(801) CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTG	

ATCC 8530	(801)	CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTG	
Lc705	(801)	CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTG	
Konsensus	(801)	CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTG	
		851	900
BioPL1	(851)	TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG	
GG	(851)	TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG	
ATCC 53103	(851)	TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG	
ATCC 8530	(851)	TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG	
Lc705	(851)	TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG	
Konsensus	(851)	TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG	
		901	950
BioPL1	(901)	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	
GG	(901)	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	
ATCC 53103	(901)	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	
ATCC 8530	(901)	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	
Lc705	(901)	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	
Konsensus	(901)	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	
		951	1000
BioPL1	(951)	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCT	
GG	(951)	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCT	
ATCC 53103	(951)	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCT	
ATCC 8530	(951)	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCT	
Lc705	(951)	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCT	
Konsensus	(951)	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCT	
		1001	1050
BioPL1	(1001)	TACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTC	
GG	(1001)	TACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTC	
ATCC 53103	(1001)	TACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTC	
ATCC 8530	(1001)	TACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTC	
Lc705	(1001)	TACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTC	
Konsensus	(1001)	TACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTC	
		1051	1100
BioPL1	(1051)	GGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG	
GG_B	(1051)	GGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG	
ATCC 53103	(1051)	GGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG	
ATCC 8530	(1051)	GGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG	
Lc705	(1051)	GGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG	
Konsensus	(1051)	GGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG	

		1101		1150
BioPL1	(1101)	ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAG		
GG	(1101)	ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAG		
ATCC 53103	(1101)	ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAG		
ATCC 8530	(1101)	ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAG		
Lc705	(1101)	ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAG		
Konsensus	(1101)	ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAG		
		1151		1200
BioPL1	(1151)	CATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG		
GG	(1151)	CATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG		
ATCC 53103	(1151)	CATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG		
ATCC 8530	(1151)	CATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG		
Lc705	(1151)	CATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG		
Konsensus	(1151)	CATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG		
		1201		1250
BioPL1	(1201)	TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT		
GG	(1201)	TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT		
ATCC 53103	(1201)	TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT		
ATCC 8530	(1201)	TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT		
Lc705	(1201)	TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT		
Konsensus	(1201)	TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT		
		1251		1300
BioPL1	(1251)	GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATC		
GG	(1251)	GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATC		
ATCC 53103	(1251)	GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATC		
ATCC 8530	(1251)	GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATC		
Lc705	(1251)	GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATC		
Konsensus	(1251)	GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATC		
		1301		1350
BioPL1	(1301)	TCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGA		
GG	(1301)	TCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGA		
ATCC 53103	(1301)	TCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGA		
ATCC 8530	(1301)	TCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGA		
Lc705	(1301)	TCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGA		
Konsensus	(1301)	TCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGA		
		1351		1400
BioPL1	(1351)	AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTTC		
GG	(1351)	AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTTC		
ATCC 53103	(1351)	AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTTC		

ATCC 8530	(1351)	AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTT	
Lc705	(1351)	AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTT	
Konsensus	(1351)	AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTT	
		1401	1450
BioPL1	(1401)	CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCG	
GG	(1401)	CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCG	
ATCC 53103	(1401)	CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCG	
ATCC 8530	(1401)	CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCG	
Lc705	(1401)	CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCG	
Konsensus	(1401)	CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCG	
		1451	1500
BioPL1	(1451)	AAGCCGGTGGCGTAACCCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAA	
GG	(1451)	AAGCCGGTGGCGTAACCCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAA	
ATCC 53103	(1451)	AAGCCGGTGGCGTAACCCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAA	
ATCC 8530	(1451)	AAGCCGGTGGCGTAACCCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAA	
Lc705	(1451)	AAGCCGGTGGCGTAACCCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAA	
Konsensus	(1451)	AAGCCGGTGGCGTAACCCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAA	
		1501	1550
BioPL1	(1501)	ATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTG	
GG	(1501)	ATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTG	
ATCC 53103	(1501)	ATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTG	
ATCC 8530	(1501)	ATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTG	
Lc705	(1501)	ATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTG	
Konsensus	(1501)	ATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTG	
		1551	
BioPL1	(1551)	GATCACCT	
GG	(1551)	GATCACCT	
ATCC 53103	(1551)	GATCACCT	
ATCC 8530	(1551)	GATCACCT	
Lc705	(1551)	GATCACCT	
Konsensus	(1551)	GATCACCT	

Wykaz sekwencji łącznikowych regionu palindromowych powtórzeń (CRISPR) nowego szczepu

- a. 5'-GCGTTTAGAATGATGCCACTTGAATGCTGT-3'
- b. 5'-AGTGTGATCCTCATCACCTCTTTGCCACTA-3'
- c. 5'-GATCGAATGCCTCATGAAATCGTATGTGCG-3'

d. 5' -TTTAGCAACAACCTACACGGTTATTTGTGG-3'
d. 5' -TTGGATTTCTTTGGAACAGTGACCGGCAGAA-3'
e. 5' -CTTAAAAGAGGTAATTAAAAATGGAAAATT-3'
f. 5' -ATTTTGATACTGAAATTGGTGAAAGTAAAG-3'
g. 5' -CGCAGCAGGTTAGTCAAGTGGCTAGTAGTC-3'
h. 5' -AATAGGAAACGTGAGTGTGTCTAAGCCCGT-3'
i. 5' -TTCTGCATCAACTGCCAAATATTTTTTGCT-3'
j. 5' -CACAAGCAGACGCGAATACCTATCAGTCTT-3'
k. 5' -TTGGGATTGGTAAGCTGCGACATGAATTTA-3'
l. 5' -GGATCAAGGCGTTTCGCGGACAAGCAAGACA-3'
m. 5' -TCCCATGATGTTCTTGGGGCTTATCAGCGT-3'
n. 5' -GTGATCATTGGTCACTGCTTAGGCCACAGC-3'
o. 5' -AAGTGTGATGGAAGCAATATCACTCTTCTT-3'
p. 5' -ACGTTTAGAATGATAACCACTTGGATGTTGT-3'
q. 5' -AGCCCTGAAAGAAATTGATTACGGTGTATT-3'
r. 5' -AGGCGAAGAAGTGGCGCTGACAGTCGGTGA-3'
s. 5' -ACTCGGGTATTGACAAAGATCGACGCGGCA-3'

Sekwencje palindromowych powtórzeń systemu CRISPR - Cas szczepu *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1

Sekwencja prostego palindromowego powtórzenia systemu	Liczba powtórzeń
5' -GTCTCAGGTAGATGTCAGATCAAT <u>TCAGTT</u> <u>CAAGAGC</u> -3'	17
5' -GTCTCAGGTAGATGTCAGATCAAT <u>TCAGTT</u> <u>CAAGAAC</u> -3'	3
5' -GTCTCAGGTAGATGTCAGATCAAA <u>AAACCT</u> <u>TCAGTGA</u> -3'	1

Pogrubioną i podkreśloną czcionką zaznaczono różnice pomiędzy prostymi powtórzeniami.

Sekwencje palindromowych powtórzeń systemu CRISPR-Cas szczepów *Lactobacillus rhamnosus* GG i ATCC53103

L.p.	Sekwencja prostego palindromowego powtórzenia	Liczba powtórzeń
1	5' -GTCTCAGGTAGATGTCAGAT <u>CAAT</u> CAGTTCAAGAG <u>GC</u> -3'	21

- 2 5' -GTCTCAGGTAGATGTCAGATTAATCAGTTCAAGAGC-3' 1
- 3 5' -GTCTCAGGTAGATGTCAGATCAATCAGTTCAAGAGG-3' 1
- 4 5' -GTCTCAGGTAGATGTCAGATCAATCAGTTCAAGAAT-3' 1
- 5 5' -GTCTCAGGTAGATGTCAGATCAAAAACTTCAGTG-3' 1

Pogrubioną i podkreśloną czcionką zaznaczono różnice pomiędzy prostymi powtórzeniami.

Charakterystyczna sekwencja CRISPR w nowym szczepie *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1, o długości 1357 par zasad.

>BioPl1-CRISPR

gtctcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagagcgcgtttagaatgatgccacttgaatgctgtgtct
caggtagatgtcagatcaatcagttcaagagcagtgatcctcatcacctcttggcactagtctcagg
tagatgtcagatcaatcagttcaagagcgaatgcctcatgaaatcgtatgtcgggtcaggtaga
tgtcagatcaatcagttcaagagccttagcaacaacctacacgggtatttgggtctcaggtagatgtc
agatcaatcagttcaagagccttgattcttgaacagtgaccggcagaagtctcaggtagatgtcaga
tcaatcagttcaagagccttaaaagaggttaataaaatggaaaattgtctcaggtagatgtcagatcaa
tcagttcaagagcatttgatactgaaattggtgaaagtaaaggctcaggtagatgtcagatcaatcag
ttcaagagccgcagcaggttagtcaagtggctagtagtcgtctcaggtagatgtcagatcaatcagttca
agagcaataggaaacgtgagtgtgtctaagccgtgtctcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagag
cttctgcatcaactgccaaatatttttgcgtctcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagagccac
aagcagacgcgaatacctatcagttctcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagagccttgggat
tggttaagctgcgacatgaatttagtctcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagagcggatcaaggcg
ttcgccgacaagcaagacagttcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagagctccatgatgttctt
ggggccttatcagcgtgtctcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagagcgtgatcattggtcactgct
taggccacagcgtctcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagagcaagtgtcatggaagcaatatcac
tcttctgtctcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagagcacgtttagaatgataccacttgatgt
tgtgtctcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagaacagccctgaaagaaattgattacggtgtattg
tctcaggtagatgtcagatcaatcagttcaagaacaggcgaagaactggcgtgacagtcggtgagtctc
aggtagatgtcagatcaatcagttcaagaacactcgggtattgacaagatcgacgcggcagttcaggt
agatgtcagatcaaaaaccttcagtga

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00049.
2. Sposób otrzymywania L-mleczanu wapnia, w drodze hodowli szczepu bakterii mlekowych *Lactobacillus rhamnosus*, polegający na hodowli inokulum bakterii w wyjałowionej płynnej pożywce inokulacyjnej zawierającej glukozę, Pepton Bacto, ekstrakt drożdżowy, CaCO_3 oraz wodę destylowaną, o początkowym $\text{pH}=7,2$, w temperaturze $37\text{--}45^\circ\text{C}$ w czasie 24 godziny, następnie zaszczepieniu otrzymanym inokulum wyjałowionej pożywki produkcyjnej zawierającej ekstrakt drożdżowy, produkt pochodzenia roślinnego i/lub zwierzęcego, sole mineralne, jak K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, nadto CaCO_3 i wodę destylowaną, o początkowym $\text{pH}=7,2$ i prowadzeniu hodowli produkcyjnej wgłębnej w warunkach beztlenowych, a po jej zakończeniu na dodaniu do bioreaktora zawiesiny $\text{Ca}(\text{OH})_2$, inaktywacji bakterii, oddzieleniu biomasy bakterii od brzezki pofermentacyjnej zawierającej L-mleczan wapnia i krystalizacji L-mleczanu wapnia z brzezki, **znamienny tym**, że stosuje się szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1, przy czym hodowlę inokulum prowadzi się na pożywce zawierającej w 1 l: 50 g glukozy, 5 g Pepton Bacto, 10 g ekstraktu drożdżowego, 25 g CaCO_3 i wodę destylowaną do 1000 ml, hodowlę produkcyjną prowadzi się w pożywce zawierającej: jako produkt pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego sok gęsty cukrowniczy, enzymatyczny hydrolizat ziarna owsa nagiego *Avena nuda*, koncentrat permeatu serwatki lub glukozę w ilości 5–15% wagowych, ekstrakt drożdżowy w ilości 1–5 g/l pożywki, K_2HPO_4 w ilości 0,5–2,5 g/l pożywki, NaH_2PO_4 w ilości 0,5–2,5 g/l pożywki, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w ilości 0,02–0,2 g/l pożywki, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ w ilości 0,05–0,2 g/l pożywki, CaCO_3 w ilości 25,0–87,0 g/l pożywki i wodę destylowaną do 1000 ml, zaszczepionej inokulum użytym w ilości 10–50 ml/l, w temperaturze $35\text{--}45^\circ\text{C}$ przy pH zmieniającym się samorzutnie od 7,2 do 5,2 w czasie 30–72 godziny, zaś krystalizację L-mleczanu wapnia z brzezki pofermentacyjnej prowadzi się w temperaturze $0\text{--}5^\circ\text{C}$, po czym powstający krystaliczny L-mleczan wapnia oddziela się od ługu pokrystalizacyjnego, przemywa wodą lodową i suszy w suszarce próżniowej lub z nawiewem gorącego powietrza.

