

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245146 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **441131**

(22) Data zgłoszenia: **2022.05.09**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.11.13 BUP 46/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.05.20 WUP 21/2024**

(51) MKP:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

A23B 7/155 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**FRUKTUS AGROS NOVA SPÓŁKA
Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ
SPÓŁKA KOMANDYTOWA, Wąsosz Dolny, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ADAM PAWLUK, Łowicz, PL
MAGDALENA DUCHANT, Radomsko, PL
ILONA MOTYL, Bukowiec, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Mariusz Kondrat, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

**Szczepy bakterii mlekowych z rodzaju *Lactiplantibacillus plantarum*,
zawierająca je kompozycja oraz jej zastosowanie do fermentacji produktów roślinnych**

PL 245146 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy bakterii mlekowych *Lactiplantibacillus plantarum* o właściwościach probiotycznych, kompozycja nowych szczepów oraz jej zastosowanie do fermentacji produktów roślinnych.

Lactobacillus plantarum to gramodatnie nieprzetwarzające bakterie, wykazujące zdolność do wzrostu w temperaturach od 12 do 40°C przy pH od 3,4 do 8,8. Są bakteriami względnie heterofermentatywnymi i podobnie jak inne bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mają kształt pałeczek i często spotyka się je w skupiskach krótkich łańcuszków.

Zgodnie z literaturą, w ostatnich latach systematyka bakterii uległa zmianie i obecnie *Lactobacillus plantarum* zostało przemianowane na *Lactiplantibacillus plantarum* (Zheng, L., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis G.E., Gänzle, M.G., and Lebeer, S. "A taxonomic note on the genus description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2020; 70(4): 2782–2858). Przy czym, obie nazwy są poprawne i w rozumieniu niniejszego wynalazku mogą być stosowane zamiennie.

Brak występowania u nich łańcucha oddechowego oraz cytochromów generuje powstawanie nadtlenu wodoru, który działa toksycznie na bakterie konkurujące z nimi o pokarm. Bakterie te nie mają również zdolności do wytwarzania katalazy, jednak na odpowiednich podłożach mogą wykazywać aktywność pseudokatalityczną. *Lactobacillus plantarum* posiada oporność na kilka antybiotyków, w tym na streptomycynę, kolastynę, kanamycynę, gentamycynę czy neomycynę. Gatunek ten ma uznany status GRAS, a jego liczne szczepy wyizolowano z różnych nisz ekologicznych, w tym mięsa, ryb, owoców, warzyw, mleka i produktów zbożowych. *L. plantarum* jest powszechnie stosowany jako kultura początkowa w procesach fermentacji żywności, wpływa również na właściwości organoleptyczne, smak i teksturę. Produkcja kwasu mlekowego oraz związków przeciwdrobnoustrojowych sprawia, że gatunek ten przyczynia się do wytworzenia bezpiecznych do spożycia produktów procesu fermentacji (Svetoslav, D. T., Gombossy De Melo Franco, B. D., *Lactobacillus Plantarum. Characterization of the Species and Application in Food Production „Food Reviews International”, 2010; 26(3):. 205–229*).

Zastosowanie *Lactobacillus plantarum* w fermentacji produktów roślinnych jest znane ze stanu techniki. Na przykład z opisu zgłoszeniowego EP2708599 znany jest szczep *Lactobacillus plantarum* CCFM8661, który może być przeznaczony do fermentacji buraków, ogórków czy kapusty. Przy czym ujawniony szczep wykazuje odporność na kwasy, dobrą tolerancję na jony ołowiu *in vitro* z możliwością tolerowania początkowego stężenia roztworu jonów ołowiu 150 mg/L oraz dobrą zdolność wiązania jonów ołowiu, dzięki czemu może obniżyć zawartość ołowiu we krwi, wątrobie, nerkach i żołądkach. Ujawniony może być stosowany do wytwarzania kompozycji farmaceutycznych i sfermentowanej żywności zdolnej do łagodzenia toksyczności ołowiu.

Z opisu zgłoszeniowego KR20110073897 znany jest sposób wytwarzania produktu fermentowanego przez bakterie kwasu mlekowego, który przewiduje zastosowanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PMO08 o doskonałej przeżywalności w żołądku, zdolności adhezyjnej jelit, zdolności fermentacyjnej na materiałach roślinnych, działaniu przeciwnowotworowym lub przeciwbakteryjnym.

Z kolei z opisu zgłoszeniowego EP1869161 znane jest zastosowanie *L. plantarum* do przygotowywania żywności dla alergików, w szczególności dla osób chorujących na celiakię.

Celem wynalazku jest uzyskanie nowych uniwersalnych szczepów z rodzaju *Lactiplantibacillus* łączących aktywność przeciw drobnoustrojom chorobotwórczym oraz aktywność probiotyczną z wysoką efektywnością prowadzenia procesu fermentacji warzyw, co pozwoli na ich zastosowanie jako szczepionek lub składnika szczepionek do przetwórstwa żywności pochodzenia roślinnego.

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy bakterii z rodzaju *Lactiplantibacillus* wyizolowane z kiszonych buraków: *Lactobacillus plantarum* BPC1 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod numerem B/00373, *Lactiplantibacillus plantarum* BPC2 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod numerem B/00374.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kompozycja nowych szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, która zawiera szczep *Lactiplantibacillus plantarum* BPC1 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

pod numerem B/00373 oraz *Lactiplantibacillus plantarum* BPC2 w proporcji 1:1 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod numerem B/00374.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kompozycji według wynalazku do fermentacji produktów roślinnych, korzystnie buraka.

Wynalazek dostarcza następujących korzyści:

- Zapewnienie szczepionek do efektywnej fermentacji ukierunkowanej surowców roślinnych;
- Korzystne właściwości produktów – kiszzonek roślinnych wyprodukowanych z wykorzystaniem szczepów według wynalazku, w tym:
 - stanowią dobry składnik diet odchudzających;
 - są dobrze przyswajane;
 - wspierają pracę układu pokarmowego;
 - wspomagają działanie układu odpornościowego;
 - stabilizują witaminę C;
 - zawierają silne przeciwutleniacze – witaminy A, C, E;
 - są źródłem witaminy B2 i PP;
 - są źródłem wielu składników mineralnych (wapń, potas, magnez, żelazo i fosfor);
 - obniżają poziom cholesterolu;
 - regulują wchłanianie glukozy we krwi;
 - zawierają acetylocholinę;
 - stanowią źródło probiotyków i prebiotyków;
 - wpływają na poprawę odporności organizmu na choroby, zwłaszcza wirusowe;
 - chronią mikroflorę jelitową podczas przewlekłej lub częstej antybiotykoterapii;
 - wpływają na prawidłową pracę jelit – zapobiegając zaparciom;
 - dzięki obecności witaminy C – przyczyniają się do poprawy stanu skóry;
 - wpływają na poprawę profilu lipidowego we krwi;
 - wpływają na obniżenie ciśnienia tętniczego krwi;
 - pomagają w walce z anemią;
 - wspomagają odchudzanie;
 - regulują przemianę materii (pomagają w wydalaniu kwasu moczowego z organizmu);
 - odkwaszają organizm;
 - oczyszczają organizm z toksyn wspomagając pracę nerek i wątroby;
 - obniżają poziom złego cholesterolu;
- Szczepy BPC1 oraz BPC2 wykazują właściwości probiotyczne;
- Szczepy BPC1 oraz BPC2 wykazują aktywność przeciw drobnoustrojom chorobotwórczym.

Charakterystyka ogólna szczepów według wynalazku

Szczep bakterii mlekowych *Lactiplantibacillus plantarum* BPC1 (dalej jako szczep BPC1) oraz *Lactiplantibacillus plantarum* BPC2 (dalej jako szczep BPC2) wyizolowano z fermentowanego buraka. Szczep BPC1 należy do gatunku *Lactiplantibacillus plantarum* i stanowi Gram-dodatnie krótkie pałeczki (koko-pałeczki) o metabolizmie względnie heterofermentatywnym. Szczep BPC1 został zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod numerem B/00373, wykazuje właściwości probiotyczne oraz stanowi homolog bakterii z gatunku *Lactobacillus plantarum* IPhp-GM13 (KY658476.1).

Szczep BPC2 należy do gatunku *Lactiplantibacillus plantarum* i stanowi Gram-dodatnie pałeczki o metabolizmie względnie heterofermentatywnym. Szczep BPC2 został zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod numerem B/00374, wykazuje właściwości probiotyczne oraz stanowi homolog bakterii z gatunku *Lactobacillus plantarum* JNULCC001 (MK294312.1).

Identyfikacja genetyczna szczepu BPC1 oraz BPC2

W celu określenia przynależności gatunkowej nowego szczepu *Lactiplantibacillus plantarum* BPC1 zsekwenjonowano region DNA kodujący gen 16S rRNA. Określenie przynależności gatunkowej nowego szczepu *Lactiplantibacillus plantarum* BPC2 prowadzono analogicznie. Otrzymane sekwencje nukleotydowe genu 16S rRNA porównano za pomocą programu BLASTN 2.8.0+ z sekwencjami dostępnymi w bazie National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Na podstawie porównania sekwencji nukleotydowych genów 16S rRNA szczepów według wynalazku oraz sekwencji dostępnych w bazie NCBI stwierdzono 92% podobieństwo nowego szczepu bakterii BPC1 do szczepu *Lactobacillus plantarum* IPhp-GM13 (KY658476.1) oraz 94% podobieństwo nowego szczepu bakterii BPC2 do szczepu *Lactobacillus plantarum* IPhp-GM 13 (KY658476.1).

Cechy morfologiczne szczepu BPC1 oraz BPC2

Na podłożu stałym MRS zawierającym jako źródło węgla 2% glukozy nowy szczep BPC1 charakteryzuje się wzrostem w postaci białych, błyszczących i lekko wypukłych kolonii (średnica około 2 mm) o gładkich brzegach. W obrazie mikroskopowym bakterie mają kształt bardzo krótkiej długości pałeczek (koko-pałki). Szczep BPC1 nie wytwarza przetrwalników oraz wybarwia się na Gram (+).

Na podłożu stałym MRS zawierającym jako źródło węgla 2% glukozy nowy szczep BPC2 charakteryzuje się wzrostem w postaci białych, błyszczących i lekko wypukłych kolonii (średnica około 1–3 mm) o gładkich brzegach. W obrazie mikroskopowym bakterie mają kształt pałeczek. Szczep BPC2 nie wytwarza przetrwalników oraz wybarwia się na Gram (+).

Cechy fizjologiczne i biochemiczne szczepu BPC1 oraz BPC2

Szczep BPC1 rośnie w temperaturach od 10–40°C, natomiast optymalna temperatura wzrostu szczepu wynosi 30–37°C. Szczep BPC1 nie wytwarza katalazy.

Szczep BPC1 charakteryzuje się metabolizmem względnie heterofermentatywnym. Według testu API 50 CHL zdolny jest do fermentacji następujących sacharydów i ich pochodnych: L-arabinozy, rybozy, D-ksylozy, galaktozy, glukozy, fruktozy, mannozy, mannitolu, sorbitolu, A-metylo-D-glukozydu, N-acetyloglukozoaminy, amygdaliny, arbutyny, eskuliny, salicyny, celobiozy, maltozy, laktozy, melibiozy, sacharozy, trehalozy, melezytozy, rafinozy, gentobiozy, i D-turanozy. Szczep BPC1 fermentuje glukozę z wytworzeniem kwasu mlekowego w ilości 8,40 g/l, przy czym udział kwasu L(+) mlekowego wynosi 95,4%, kwasu octowego (1,20 g/l) i etanolu (6,70 mg/l).

Szczep BPC2 rośnie w temperaturach od 10–40°C, natomiast optymalna temperatura wzrostu szczepu wynosi 30–37°C. Szczep BPC2 nie wytwarza katalazy.

Szczep BPC2 charakteryzuje się metabolizmem względnie heterofermentatywnym. Według testu API 50CHL jest zdolny do fermentacji następujących sacharydów i ich pochodnych: rybozy, galaktozy, glukozy, fruktozy, mannozy, mannitolu, sorbitolu, A – metylo – D – mannozydu, N-acetylo glukazaminy, amyglainy, arbutyny, eskuliny, salicyny, celobiozy, maltozy, laktozy, melibiozy, sacharozy, trehalozy, melezytozy, rafinozy, glikogenu, gentiobiozy, glukonianu. Szczep BPC2 fermentuje glukozę z wytworzeniem kwasu mlekowego w ilości 15,33 g/l, przy czym udział kwasu L(+) mlekowego wynosi 94,2%, kwasu octowego (4,0 g/l), natomiast nie stwierdzono obecności etanolu.

Cechy probiotyczne szczepu BPC1 oraz BPC2

Szczep BPC1 wykazuje bardzo dużą zdolność do przeżycia w warunkach pasażu jelitowego przy pH 3 i pH 4 na poziomie odpowiednio log 8,26 jtk/ml i log 9,06 jtk/ml oraz dużą przy pH 2 wynoszącą log 6,19 jtk/ml.

Szczep BPC2 wykazuje bardzo dużą zdolność do przeżycia w warunkach pasażu jelitowego przy pH 3 i pH 4 na poziomie odpowiednio log 8,35 jtk/ml i log 8,94 jtk/ml oraz dużą przy pH 2 wynoszącą log 6,27 jtk/ml.

Szczepy BPC1 i BPC2 wykazują oporność w stosunku do następujących antybiotyków i chemioterapeutyków o działaniu przeciwbakteryjnym: kolistyny, kanamycyny, gentamycyny, streptomycyny, cefoperazonu, ampicyliny, linezolidu, cefuroksymu, amoksycyliny, norfloksacyny, cyprofloksacyny, cefotaksymu, erytromecyny, nitrofurantoinu, azitromycyny.

Szczep BPC1 charakteryzuje się silną adhezją do szkła (stopień adhezji wynosi 6,3) i żelatyny (stopień adhezji wynosi 3,5) oraz słabą do polistyrenu (stopień adhezji wynosi 1,8) i kolagenu (stopień adhezji wynosi 1,5). Szczep BPC2 charakteryzuje się silną adhezją do żelatyny (stopień adhezji wynosi 4,8) oraz słabą adhezją do szkła (stopień adhezji wynosi 1,7), polistyrenu (stopień adhezji wynosi 1,9) oraz kolagenu (stopień adhezji wynosi 1,6).

Szczep BPC1 wykazuje aktywność antagonistyczną w stosunku do bakterii patogennych przenoszonych drogą pokarmową: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*.

Szczep BPC2 wykazuje aktywność antagonistyczną w stosunku do następujących bakterii patogennych: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*,

Klebsiella aerogenes, Salmonella typhimurium, Salmonella enterica, Enteropacter cloacae, Escherichia coli, Campylobacter jejuni, Pseudomonas earuginosa.

Szczepy BPC1 i BPC2 wykazują oporność w stosunku do następujących antybiotyków i chemioterapeutyków o działaniu przeciwbakteryjnym: kolistyny, kanamycyny, gentamycyny, streptomycyny, cefoperazonu, ampicyliny, linezolidu, cefuroksymu, amoksycyliny, norfloksacyny, cyprofloksacyny, cefotaksymu, erytromecyny, nitrofurantoinu, azitromycyny.

Cechy biotechnologiczne szczepu BPC1 oraz BPC2

Szczepy BPC1 oraz BPC2 przeżywają wielokrotne pasażowanie na pożywce MERS, a zatem jako szczepy przeżywające przechowywanie wykazują potencjał technologiczny.

Każdy ze szczepów BPC1 oraz BPC2 znajduje zastosowanie jako szczepionka lub składnik szczepionki do fermentacji ukierunkowanej produktów spożywczych, w szczególności produktów roślinnych, w szczególności fermentacji buraka.

Wyższą efektywność działania wykazują dodatkowo preparaty wieloszczepowe. Dlatego w kolejnym aspekcie wynalazek dotyczy kompozycji nowych szczepów zawierającej szczep Lactiplantibacillus plantarum BPC1 oraz Lactiplantibacillus plantarum BPC2 w proporcji 1:1. Wyniki badania aktywności antagonistycznej nie wykazały znaczącego antagonizmu, a zatem należy uznać, że szczepy BPC1 oraz BPC2 cechują się harmonijnym współbiodzieniem. A zatem szczepy BPC1 oraz BPC2 mogą wchodzić w skład jednej szczepionki oraz preparatu stosowanego do produkcji warzyw fermentowanych.

Proces fermentacji ukierunkowanej przebiegał z udziałem szczepionki w skład której wchodziły szczepy BPC1 w ilości od 10^5 jtk/ml do 10^6 jtk/ml oraz BPC2 w ilości od 10^5 jtk/ml do 10^6 jtk/ml wyizolowane ze spontanicznie fermentowanego surowca w stosunku 1:1.

Kiszonki wytworzone z udziałem zastosowanych szczepionek wykazały się wysokim namnożeniem bakterii fermentacji mlekowej 10^8 jtk/ml, co świadczy o poprawności przebiegającego procesu.

Wynalazek przedstawiono w przykładach wykonania na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia profil mikrobiologiczny buraka kiszzonego; fig. 2 przedstawia dynamikę ilości komórek szczepu Lactiplantibacillus plantarum BPC1 w kolejnych etapach warunków symulujących pasaż jelitowy, gdzie BPC1 K – próbka kontrolna; BPC1 2 – próbka o pH=2,0; BPC1 3 – próbka o pH=3,0; BPC1 4 – próbka o pH=4,0; fig. 3 przedstawia dynamikę ilości komórek szczepu Lactiplantibacillus plantarum BPC2 w kolejnych etapach warunków symulujących pasaż jelitowy, gdzie BPC2 K – próbka kontrolna; BPC2 2 – próbka o pH=2,0; BPC2 3 – próbka o pH=3,0; BPC2 4 – próbka o pH=4,0.

Przykład 1

Izolacja szczepów i identyfikacja szczepów BPC1 oraz BPC2

Szczep bakterii mlekowych Lactiplantibacillus plantarum BPC1 (dalej jako szczep BPC1) oraz Lactiplantibacillus plantarum BPC2 (dalej jako szczep BPC2) wyizolowano z fermentowanego buraka. Wykorzystany surowiec stanowił burak w plastrach albo w postaci wiórek. Zakres badań mikrobiologicznych prowadzonych w pierwszym etapie obejmował określenie liczebności następujących grup mikroorganizmów:

- bakterii fermentacji mlekowej (LAB),
- bakterii fermentacji mlekowej metabolizujących sacharozę (przypuszczalne Leuconostoc)
- grzybów (drożdże i pleśnie)
- bakterii z rodziny Enterobacteriaceae

Badania przeprowadzono na różnych etapach fermentacji:

- po dwóch dobach
- po tygodniu
- po dwóch tygodniach
- po sześciu tygodniach.

Próbki do badań przygotowywano zgodnie z procedurą zawartą w normie PN-EN ISO 6887-1. Liczebność mikroorganizmów oznaczano metodą hodowlaną (posiew wgłębny). Pożywki hodowlane oraz warunki inkubacji stosowane w trakcie oznaczania poszczególnych grup mikroorganizmów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Pożywki hodowlane oraz warunki hodowli

Grupa mikroorganizmów	Pożywka	Temperatura hodowli	Czas hodowli
Bakterie fermentacji mlekowej	Podłoże z sokiem pomidorowym wg Davisa, Bisseta i Hale'a z dodatkiem nystatyny	30°C	72 godz.
Bakterie fermentacji mlekowej metabolizujących sacharozę (przypuszczalne <i>Leuconostoc</i>)	Podłoże z sacharozą i węglanem wapnia wg Wemana z dodatkiem nystatyny	30°C	72 godz.
Grzyby (drożdże i pleśnie)	YGC	30°C	5 dni
Bakterie z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	VRBG	30°C	24-48 godz.

Po zadanym okresie inkubacji zliczono wyrosłe kolonie. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Równocześnie na poszczególnych etapach fermentacji oznaczano zawartość głównych i ubocznych produktów fermentacji metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, stosując metodykę opisaną w literaturze (Guide to Aminex HPLC Columns for Food and Beverage, Biotechnology, and Bio-Organic Analysis, Bio-Rad). Do badań stosowano chromatograf cieczowy Surveyor z detektorem RI firmy ThermoScientific. Związki rozdzielano stosując kolumnę Aminex HPX 87 H+ (300x7,8 mm) firmy (Bio-Rad). Szybkość wymywania wynosiła 0,6 ml/min, fazę ruchomą stanowił 0,005 M H₂SO₄. Zawartość poszczególnych związków wyznaczano z krzywych wzorcowych. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń. Po każdym etapie badań izolowano dominujące mikroorganizmy (z pożywki z sokiem pomidorowym – oznakowane LAB, oraz z pożywki z sacharozą – oznakowane LEU). Czyste kultury drobnoustrojów poddano trzykrotnemu pasażowaniu na płynnej pożywce MRS o pH 6,2–6,3 (2,0% amoniak; 0,8% ekstrakt wołowy; 0,4% ekstrakt drożdżowy; 1% glukoza; 0,2% K₂HPO₄; 0,5% CH₃COONa; 0,2% C₂H₄OH; 0,02% MgSO₄ · 7H₂O; 0,005% MnSO₄ · 4 H₂O; 0,1% obj. Tween 80) w celu wyeliminowania drobnoustrojów o niskiej przydatności technologicznej (nie przeżywających przechowywania). Po etapie pasażowania przeprowadzono hodowlę w płynnej pożywce MRS w celu określenia profilu metabolicznego, który był jedną z cech branych pod uwagę podczas screeningu mikroorganizmów.

Profil mikrobiologiczny buraka kiszzonego przedstawiono na fig. 1. W pierwszym okresie fermentacji (po 2 dobach) liczebność bakterii fermentacji mlekowej pozostawała na podobnym poziomie tj. 10⁸ jtk/g (jednostek tworzących kolonie/gram). W kolejnych dniach fermentacji i przechowywania liczebność tej grupy sukcesywnie spadała do 10⁶ jtk/g drobnoustrojów. Znalazło to odzwierciedlenie w zwiększonej dynamice tworzenia etanolu. Wnioskować należy, że drożdże izolowane z produktu nie należą do grupy psujących, a ich obecność może nadawać właściwe walory organoleptyczne produktowi. Różnice w liczebności bakterii metabolizujących sacharozę (potencjalne *Leuconostoc*) oraz pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* pomiędzy oboma rodzajami surowca pozostają w granicach błędów metody. W przypadku buraków w plastrach na początku, a w przypadku buraków w wiórkach w końcowym okresie przechowywania zaobserwowano niewielkie ilości grzybów strzępkowych, które są organizmami niepożądanymi w trakcie procesu. Przy takim poziomie namnożenia nie obserwowano jednak objawów zepsucia. Grzyby strzępkowe pochodziły najprawdopodobniej z surowca wykorzystanego do badań. W cieczy pofermentacyjnej stwierdzono obecność następujących związków: z grupy kwasów: bursztynowy, octowy, propionowy oraz główny produkt fermentacji – kwas mlekowy jak również alkoholi: glicerol i etanol. Kwas bursztynowy oraz glicerol powstały najprawdopodobniej w wyniku działania drożdży, na pewno też część powstałego etanolu jest produktem fermentacji alkoholowej prowadzonej z ich udziałem, o czym wspomniano wcześniej. Dominującym związkiem był kwas mlekowy, jego zawartość w burakach fermentowanych w postaci plasterków kształtowała się na poziomie od 0,06 g/100 ml w fazie początkowej procesu do 0,45 g/100ml na końcu procesu. Stężenie tej substancji w buraku kiszonym w postaci wiórków było ponad dwukrotnie wyższe na początku procesu, a w fazie końcowej osiągnęło wartość 0,51 g/100 ml. Ponadto podczas kiszenia buraka zaobserwowano znaczące ilości etanolu do 0,23 g/100 ml. Z fermentowanego buraka w trakcie badań wyizolowano dwa szczepy bakterii fermentacji

mlekowej oznaczone jako BPC1 oraz BPC2, które najlepiej przeżyły trzykrotny pasaż na płynnej pożywce MRS, co świadczy o ich potencjale biotechnologicznym. Następnie szczepy BPC1 oraz BPC2 poddano ocenie biochemicznej oraz identyfikacji genetycznej.

Oznaczenie profilu biochemicznego szczepów BPC1 oraz BPC2

Profil biochemiczny mikroorganizmów wyizolowanych z kiszonek w trakcie fermentacji spontanicznej określano w oparciu o metabolizm sacharydów z zastosowaniem testu API 50 CHL. Wyniki odczytywano po 48 godzinach inkubacji. Jako wynik pozytywny uznawano, zgodnie ze wskazaniem producenta testów próbę zabarwioną na kolor żółty, co świadczyło o zmianie wartości pH, będącej rezultatem fermentacji badanych związków do kwasów organicznych. W przypadku próby 25 wynik pozytywny oznaczał zmianę zabarwienia na kolor czarny. Wyniki przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Zdolność wykorzystywania różnych źródeł węgla przez bakterie izolowane z kiszonych buraków (test API 50 CHL)

Test	Substrat	BPC1	BPC2
API 50 CH	Glicerol	-	-
	Erytritol	-	-
	D arabinoza	-	-
	L arabinoza	+	-
	Ryboza	+	+
	D ksyloza	+	-
	L ksyloza	-	-
	Adonitol	-	-
	B metylo- D-ksylozyd	-	-
	Galaktoza	+	+
	Glukoza	+	+
	Fruktoza	+	+
	Mannoza	+	+
	Sorboza	-	-
	Ramnoza	-	-
	Dulcytol	-	-
	Inozytol	-	-
	Mannitol	+	+
	Sorbitol	+	+
	A – metylo – D - mannozyd	-	+
	A – metylo – D – glukozyd	+	-
	N – acetylo-glukozamina	+	+
	Amygdalina	+	+
	Arbutyna	+	+
	Eskulina	+	+
	Salicyna	+	+
	Celobioza	+	+
	Maltoza	+	+
	Laktoza	+	+
	Melibioza	+	+
	Sacharoza	+	+
	Trehaloza	+	+
	Inulina	-	-
	Melezytoza	+	+
	Rafinoza	+	+
	Skrobia	-	-
	Glikogen	-	+
	Ksylitol	-	-
	Gentiobioza	+	+
	D turanoza	+	-
	D lyksoza	-	-
	D tagatoza	-	-
	D fruktoza	-	-
	L fruktoza	-	-
	D arabitol	-	-
	L arabitol	-	-
	Glukonian	-	+
2-ketoglukonian	-	-	
5-keto-glukonian	-	-	

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że badane bakterie zdolne były do fermentowania: rybozy, galaktozy, glukozy, fruktozy, mannozy, mannitolu, sorbitolu, N-acetyloglukozoaminy, amygdaliny, arbutyny, eskuliny, salicyny, celobiozy, maltozy, laktozy, melibiozy, sacharozy, trechalozy, melezytozy, rafinozy i gentobiozy. Nie metabolizowały natomiast: glicerolu, erytrytolu, D-arabinozy, L-ksylozy, adonitolu, β -metylo-D-ksylozydu, sorbozy, ramnozy, dulcytolu, inozytolu, inuliny, skrobi, ksytilolu, D-lyksozy, D-tagatozy, D-fruktozy, L-fruktozy, L-arabitolu, 2-ketoglukonianu i 5-ketoglukonianu.

Charakterystyka morfologii szczepów BPC1 oraz BPC2

Charakterystykę morfologii oraz zmienność morfologiczną szczepów BPC1 oraz BPC2 pochodzących z kiszonych buraków oceniano po 24 godzinach hodowli w pożywce MRS w temperaturze 30°C. Szczep BPC1 występował w postaci koko-pałeczki a BPC2 w formie pałeczek. Wielkość kolonii na płytkach kształtowała się od 1 do 3 mm. Wyniki przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyka morfologii szczepów BPC1 oraz BPC2

Szczep	McF* 24 godz.	McF 48 godz.	pH 48 godz.	Kolonia/morfologia	Metabolity (pożywka MRS) [%]		
					Kwas mlekowy	Kwas octowy	Etanol
BPC1	7,17	8,18	4,34	Kolonie białe, błyszczące, wypukłe o gładkich brzegach, 2 mm/ koko-pałki	0,84	0,12	0,007
BPC2	1,97	11,5	3,89	Kolonie białe, błyszczące, wypukłe o gładkich brzegach, 1-3 mm/ pałeczki	1,53	0,10	0,004

*McF oznacza skalę McFarlanda

Przeprowadzone analizy wykazały, że szczep BPC1 występował w postaci koko-pałeczki a BPC2 w formie pałeczek. Wielkość kolonii na płytkach kształtowała się od 1 do 3 mm. Wzrost bakterii w podłożu płynnym MRS był zróżnicowany i po 24 godzinach inkubacji mieścił się w przedziale od 1,97 McF do 8,18 McF, przedłużenie czasu hodowli do 48 godzin znacznie polepszyło wzrost tych drobnoustrojów i otrzymane wyniki mieściły się w przedziale od 8,18 McF do 11,5 McF. Dokonano również pomiaru kwasowości przy użyciu pH-metru. Otrzymane wyniki wskazywały na zróżnicowane zdolności kwaszące badanych bakterii i mieściły się w przedziale od pH=4,34 dla BPC1 do pH=3,89 dla BPC2.

W hodowli bakterii prowadzonej na pożywce MRS oznaczono również ilość wytworzonego przez te bakterie kwasu mlekowego, octowego i etanolu. Głównym metabolitem był kwas mlekowy, którego zawartość, w zależności od zdolności fermentacyjnych bakterii, mieściła się w przedziale od 0,84% BPC1 do 1,53 % BPC2. Drugim ilościowo istotnym produktem metabolizmu był kwas octowy obecność tego metabolitu mieściła się w przedziale od 0,1% dla BPC2 do 0,12% dla BPC1. Stwierdzono także śladowe ilości etanolu i wynosiły one od 0,004 do 0,007%.

Identyfikacja genetyczna szczepów BPC1 oraz BPC2

Czyste kultury drobnoustrojów BPC1 oraz BPC2 poddano trzykrotnemu pasażowaniu na płynnej pożywce MRS w celu wyeliminowania drobnoustrojów o niskiej przydatności technologicznej (nie przeżywających przechowywania). Po etapie pasażowania przeprowadzono hodowlę w płynnej pożywce MRS w temperaturze 30°C przez 24 godziny w celu identyfikacji wyizolowanych szczepów bakterii. Identyfikację bakterii przeprowadzono metodami molekularnymi w oparciu o sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA, gdzie DNA genomowe izolowano przy użyciu zestawu Genomie Mini (A&A Biotechnology), zgodnie z metodyką podaną przez producenta. Mieszaninę reakcyjną przygotowano w objętości 50 μ l zawierającej: 25 μ l polimerazy (1,5 jednostki) REDTaq™ ReadyMix™ (Sigma), 0,4 μ l roztworu każdego ze starterów (o stężeniu 100 μ M) i 25 μ l wody oraz 20 ng matrycowego DNA. Gen 16S rRNA amplifikowano metodą PCR w termocyklerze MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad) przy użyciu uniwersalnych starterów o sekwencjach: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA-3' (forward) i 5'-GGAGGTGATCCAGCGGC-3' (reverse) w cyklu składającym się z denaturacji wstępnej w 94°C

przez 2 min, denaturacji w 94°C przez 1 min, przyłączania starterów w 50°C przez 1 min (34 powtórzenia), elongacji 72°C przez 3 min i elongacji końcowej w 72°C przez 3 min.

Uzyskane produkty reakcji PCR analizowano techniką elektroforezy w żelu agarozowym o stężeniu 1% (w/v). Amplifikowane produkty PCR oczyszczono za pomocą zestawu Clean-Up AX (A&A Biotechnology), a następnie poddano reakcji sekwencjonowania w firmie GENOMED S.A. (Warszawa). Otrzymane sekwencje nukleotydowe genu 16S rRNA dla bakterii porównano za pomocą programu BLAST 2.8.0+ (The Basic Local Alignment Search Tool) z sekwencjami dostępnymi w bazie NCBI. Wyniki identyfikacji przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Wyniki porównania sekwencji 16S rRNA BPC1 i BPC2 z sekwencjami zdeponowanymi w bazie NCBI

Symbol szczepu	Zidentyfikowany gatunek	Podobieństwo	Porównywana sekwencja z najwyższym stopniem podobieństwa
BPC2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	94%	<i>Lactobacillus plantarum</i> JNULCC001 (MK294312.1)
BPC1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	92%	<i>Lactobacillus plantarum</i> IPhp-GM13 (KY658476.1)

Na podstawie porównania sekwencji nukleotydowych genów 16S rRNA szczepów według wynalazku oraz sekwencji dostępnych w bazie NCBI stwierdzono 92% podobieństwo nowego szczepu bakterii BPC1 do szczepu *Lactobacillus plantarum* IPhp-GM13 (KY658476.1) oraz 94% podobieństwo nowego szczepu bakterii BPC2 do szczepu *Lactobacillus plantarum* IPhp-GM13 (KY658476.1). W rezultacie stwierdzono, że bakterii BPC1 i BPC2 przynależą do gatunku *Lactiplantibacillus plantarum* (inaczej uprzednio zwanego *Lactobacillus plantarum*).

Natomiast w bazie NCBI nie odnaleziono sekwencji identycznej do sekwencji 16S rRNA BPC1 ani do sekwencji 16S rRNA BPC2. A zatem należy uznać, że szczepy BPC1 oraz BPC2 według wynalazku są nowe.

Przykład 2

Badanie antagonistycznych właściwości szczepów BPC1 oraz BPC2

Jednym z aspektów wynalazku jest zastosowanie szczepów BPC1 oraz BPC2 jako szczepionek lub składników szczepionki fermentacyjnej przeznaczonej do wspomaganie fermentacji produktów roślinnych (np. fermentacji buraka).

Wyższą efektywność działania wykazują dodatkowo preparaty wieloszczepowe. Natomiast konstrukcja szczepionek i mieszanych preparatów oparta jest na harmonijnym współbytowaniu szczepów składowych. W celu wytypowania kultur, które można wprowadzać w skład szczepionek oraz preparatów stosowanych do produkcji warzyw fermentowanych określono stopień hamowania bakterii wyizolowanych z badanych kiszonek.

W tym przykładzie wykonania analizowano antagonizm szczepów BPC1 oraz BPC2 w celu weryfikacji czy mogą one zostać składnikami jednej szczepionki fermentacyjnej do fermentacji żywności. W badaniach antagonizmu szczepów BPC1 oraz BPC2 zastosowano metodę słupkową opartą na równoległym wroście szczepu wskaźnikowego i antagonistycznego. W tym celu z przerośniętego bakteriami mlekowymi stałego podłoża MRS po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, wycinano słupki o średnicy 10 mm i umieszczano je na płytkach z murawą zaszczepioną szczepem wskaźnikowym (10^5 - 10^6 jtk/ml). Przy czym, wspomnianą murawę stanowiła pożywka bulionowa z agarem o pH 7,4–7,6 (skład: 0,2% ekstrakt wołowy; 0,2% ekstrakt drożdżowy; 0,5% aminobak; 0,4% NaCl; 1,5% agar). Dla szczepu BPC1 murawa była zaszczepiona szczepem BPC1, natomiast słupki MRS były przerośnięte szczepem BPC2. Natomiast dla szczepu BPC2 murawa była zaszczepiona szczepem BPC1, natomiast słupki MRS były przerośnięte szczepem BPC1.

Po 16 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C odczytywano strefy przejaśnienia murawy wokół słupków. Wynik podawano w mm po odjęciu średnicy słupka. Uzyskane wyniki poddano ocenie statystycznej określając: średnią wartość strefy hamowania wzrostu mikroorganizmu testowego, odchylenie standardowe populacji, przedział ufności, współczynniki korelacji i współczynnik aktywności antagonisticznej dla poszczególnych metod badawczych. Wyniki przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Współczynnik aktywności antagonistycznej

Oznaczenie szczepu	BPC1	BPC2
BPC(1)Lab	x	0,1
BPC(2)Lab	0,1	x

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że szczepy BPC1 oraz BPC2 wyizolowane z kiszonych buraków działały w niewielkim stopniu antagonistycznie w stosunku do siebie. Średnie strefy zahamowania wzrostu bakterii były bardzo niewielkie i nie wykluczają możliwości łączenia ich w szczepionki.

Przykład 3

Fermentacja warzyw z wykorzystaniem kompozycji według wynalazku zawierającej szczep BPC1 w ilości 10^5 jtk/ml oraz BPC2 w ilości 10^5 jtk/ml

W tym przykładzie wykonania kompozycja według wynalazku zawiera szczep *Lactiplantibacillus plantarum* BPC1 oraz szczep *Lactiplantibacillus plantarum* BPC2 w proporcji 1:1. W tym przykładzie wykonania przed szczepieniem szczepy zawieszane były w soli fizjologicznej. Natomiast do zawieszania szczepów można wykorzystać również np. PBS lub wodę.

W przeprowadzonych badaniach szczepy były hodowane na brzeczce.

Fermentacja za pomocą wyselekcjonowanych szczepów starterowych w warunkach laboratoryjnych

Proces fermentacji ukierunkowanej przebiegał z udziałem szczepionki, w skład której wchodziły szczepy BPC1 w ilości 10^5 jtk/ml oraz BPC2 w ilości 10^5 jtk/ml wyizolowane ze spontanicznie fermentowanego surowca w stosunku 1:1.

Kiszonka wytworzona z udziałem badanej szczepionki, wykazała się wysokim namnożeniem bakterii fermentacji mlekowej 10^8 jtk/ml. Liczebność LAB na skutek fermentacji ukierunkowanej jest porównywalna do liczebności LAB w procesie fermentacji spontanicznej, co świadczy o poprawności przebiegającego procesu z użyciem kompozycji szczepionki według wynalazku.

W badanej próbie fermentacji ukierunkowanej nie stwierdzono wzrostu bakterii z rodzaju *Leuconostoc*. Namnożenie drożdży w przebiegu fermentacji ukierunkowanej mieści się w przedziale 10^4 – 10^5 jtk/ml. Ilość bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* jest mniejsza niż 10^3 jtk/ml. Z uwagi na to możemy przypuszczać, że procesy fermentacji z udziałem kultury starterowej przebiega prawidłowo.

W próbach fermentacyjnych kiszzonego buraka zaobserwowano wszystkie metabolity charakterystyczne dla fermentacji spontanicznej, jednakże kwas bursztynowy i glicerol występowały w ilościach śladowych. Stężenie kwasów octowego i propionowego kształtowało się na poziomie poniżej 0,1%. Badane szczepy tworzyły powyżej 0,3% kwasu mlekowego.

Przykład 4

Fermentacja warzyw z wykorzystaniem kompozycji według wynalazku zawierającej szczep BPC1 w ilości 10^6 jtk/ml oraz BPC2 w ilości 10^6 jtk/ml

Fermentację ukierunkowaną prowadzono jak w przykładzie 3, z tym że proces fermentacji ukierunkowanej przebiegał z udziałem szczepionki, w skład której wchodziły szczepy BPC1 w ilości 10^6 jtk/ml oraz BPC2 w ilości 10^6 jtk/ml wyizolowane ze spontanicznie fermentowanego surowca w stosunku 1:1.

Przykład 5

Badanie właściwości probiotycznych szczepów BPC1 oraz BPC2

Badanie właściwości probiotycznych szczepów BPC1 oraz BPC2 prowadzono z wykorzystaniem szeregu szczepów testowych, które przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Szczepy testowe wykorzystane w badaniu uzdolnień antagonistycznych

Lp.	Szczepy wskaźnikowe
Bakterie Gram - dodatnie	
1.	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538
2.	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923
3.	<i>Staphylococcus aureus</i> 27734
4.	<i>Staphylococcus aureus</i> 27794
5.	<i>Enterococcus faecalis</i> 29212
6.	<i>Bacillus cereus</i> 11778
7.	<i>Listeria monocytogenes</i> 19115
8.	<i>Listeria monocytogenes</i> 18195
9.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> J.W. 1533
Bakterie Gram - ujemne	
10.	<i>Klebsiella aerogenes</i> 13048
11.	<i>Salmonella typhimurium</i> 13311
12.	<i>Salmonella typhimurium</i> 2182 TA
13.	<i>Salmonella typhimurium</i> 2180 PCM
14.	<i>Salmonella typhimurium</i> 14033
15.	<i>Salmonella enterica</i> 7001
16.	<i>Enterobacter cloacae</i> 13047
17.	<i>Escherichia coli</i> 10536
18.	<i>Escherichia coli</i> 8738
19.	<i>Escherichia coli</i> 8739
20.	<i>Campylobacter jejuni</i> 11351
21.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 15442
22.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24755
Drożdże	
23.	<i>Rhodotorula glutinis</i> R13 Ł0056
24.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> R12 Ł0054
25.	<i>Candida pelliculoza</i>
26.	<i>Cyberlindnera jadinii</i> ŁOCK 0021
Pleśnie	
27.	<i>Aspergillus fumigatus</i> E34 Ł0426
28.	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
29.	<i>Penicillium notatum</i> E40 Ł0533
30.	<i>Penicillium expansum</i> E42 Ł00536

Do badań wykonanych w celu sprawdzenia tolerancji wyizolowanych szczepów na warunki zachodzące w pasażu jelitowym, na ich adherencję do powierzchni biotycznych i abiotycznych, oraz zbadanie ich antagonizmu w stosunku do bakterii, drożdży i pleśni wykorzystano pożywki oraz odczynniki zestawione w Tabeli 7.

Tabela 7. Stosowane podłoża hodowlane i odczynniki wraz z ich składem oraz przeznaczeniem

Lp.	Nazwa roztworu/pożywki	Skład żywki	Cel stosowania roztworu/pożywki
1.	Roztwór podstawowy A	6,2 g/l NaCl 2,2 g/l KCl 0,22 g/l CaCl ₂ 1,2 g/l NaHCO ₃	Badanie przeżywalności wyizolowanych szczepów w warunkach pasażu jelitowego.
2.	Roztwór podstawowy B	5 g/l NaCl 0,6 g/l KCl 0,3 g/l CaCl ₂	Badanie przeżywalności wyizolowanych szczepów w warunkach pasażu jelitowego.
3.	Pepsyna (BTL) 2000 FIP/g	-	Przygotowanie roztworu o składzie odpowiadającym składowi roztworu soku żołądkowego.
4.	Sole żółci	-	Przygotowanie roztworu o składzie odpowiadającym składowi roztworu soku jelitowego.
5.	Pankreatyna	-	Przygotowanie roztworu o składzie odpowiadającym składowi roztworu soku jelitowego.
6.	Sterylna woda destylowana	-	Sporządzenie zawiesin i przemywanie odwirowanej biomasy.
7.	PBS pH=7,4	10 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM KH ₂ PO ₄ 140 mM NaCl 3 mM KCl	Przemywanie i sporządzenie zawiesin z odwirowanej biomasy.
8.	1M HCl	-	Ustalenie pH roztworów. Ustalenie pH zawiesiny komórkowej badanych szczepów przy sprawdzaniu tolerancji na warunki pasażu jelitowego.
9.	1M NaOH	-	Ustalenie pH roztworów. Ustalenie pH zawiesiny komórkowej badanych szczepów przy sprawdzaniu tolerancji na warunki pasażu jelitowego. Neutralizacja badanych prób przed wysiewem.
10.	1M NaHCO ₃	-	Neutralizacja zawiesiny komórek
11.	MRS Podłoże MRS płynne (BTL) pH= 6,2-6,3	2,0% amoniak 0,8% ekstrakt wołowy 0,4% ekstrakt drożdżowy 1% glukoza 0,2% K ₂ HPO ₄ 0,5% CH ₃ COONa 0,2% C ₂ H ₄ OH 0,02% MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,005% MnSO ₄ · 4 H ₂ O 0,1% obj. Tween 80	Namnażanie biomasy wyizolowanych szczepów.
12.	Bufor cytrynianowy 1 M, pH = 4,5	2,1g/l kwas cytrynowy Woda destylowana 1M NaOH	Ustalenie pH roztworów używanych do zbadania zdolności adhezyjnych komórek bakterii.
13.	Fiolet krystaliczny 0,1%	-	Wybarwienie komórek podczas badania zdolności adhezyjnych.
14.	Kwas octowy 33%	-	Ekstrakcja fioletu krystalicznego z komórek bakterii podczas badania ich zdolności adhezyjnych.
15.	Bulion płynny pH=7,4-7,6	0,2% ekstrakt wołowy 0,2% ekstrakt drożdżowy 0,5% aminobak 0,4% NaCl	Aktywacja i namnożenie szczepów testowych przy określaniu antagonizmu.
16.	Bulion zestalony agarem pH=7,4-7,6	0,2% ekstrakt wołowy 0,2% ekstrakt drożdżowy 0,5% aminobak 0,4% NaCl 1,5% agar	Hodowla szczepów testowych przy określaniu antagonizmu
17.	Brzeczka 5° Blg	-	Aktywacja i namnożenie szczepów testowych przy określaniu antagonizmu.
18.	Brzeczka 5° Blg zestalona agarem (2,0%)	-	Hodowla szczepów testowych przy określaniu antagonizmu.

Materiałami wykorzystanymi do określenia adhezji badanych szczepów do podłoży biotycznych były śluz, żelatyna, kolagen, a abiotycznych szkło i polistyren.

Przeżywalność w warunkach pasażu jelitowego

Ocenę przeżywalności wyizolowanych szczepów w warunkach pasażu jelitowego zrealizowano w naśladujących je warunkach. Badane szczepy hodowano w 25 ml płynnego podłoża MRS, do momentu uzyskanie przez komórki późnej fazy wzrostu logarytmicznego lub wczesnej stacjonarnej fazy wzrostu tj. około 10^9 jtk/ml. Następnie biomasa została oddzielona od podłoża poprzez wirowanie (9000 rpm, 15 min) oraz przemyta dwukrotnie roztworem PBS. Otrzymaną biomasę zawieszono w 25 ml rozdrobnionych warzyw (odpowiednio dla każdego ze szczepów: z buraków) i doprowadzono do pH=4,6 używając 1M HCl. Do zawiesiny komórek dodano 5 ml sterylnego roztworu podstawowego A, po czym pobrano próbę do wysiewu w celu ustalenia początkowej ilości komórek. Następnie do zawiesiny dodano 3 ml roztworu podstawowego A (o pH=5,0) zawierającego pepsynę i lizozym, po czym ponownie pobrano próbę do wysiewu. Końcowe stężenie pepsyny w zawieszynie komórek w rozdrobnionych warzywach wynosiło 0,3%, a lizozymu – 0,01%. Warunki analogiczne do tych panujących w żołądku, czyli niskie pH soku żołądkowego uzyskano dodając 1M HCl do zawiesiny. Ustalono trzy różne wartości pH: pH=2,0; pH=3,0 oraz pH=4,0. Po zakwaszeniu inkubowano zawiesiny przez 20 minut w 37°C, po czym pobrano z każdej zawiesiny próbę do wysiewu. Pozostałą zawiesinę zneutralizowano do pH=6,5, które odpowiada pH panującemu w dwunastnicy używając 1M NaHCO₃. Do badanej zawiesiny dodano roztworu podstawowego B (o pH=8,0) z solami żółci i pankreatyną, o końcowych ich stężeniach wynoszących odpowiednio 0,45% i 0,1%. Zawiesinę inkubowano przez 120 minut, po czym pobrano próbę do wysiewu. Przed każdym z wysiewów pobrane próby neutralizowano 1M NaOH.

Przeżywalność komórek poddanych działaniu pasażu jelitowego obliczono ze wzoru:

$$\text{Przeżywalność} = \frac{N_k}{N} \times 100\%$$

gdzie:

N_k – log jtk/ml próby kontrolnej,

N – log jtk/ml próby po symulacji

Ocenę przeżywalności zrealizowano w warunkach odwzorowujących warunki pasażu jelitowego (poddanie ich działaniu lizozymu, pepsyny, soli żółci, pankreatyny i niskiego pH). Przeżywalność szczepów BPC1 oraz BPC2 sprawdzono w 6-ciu występujących po sobie etapach. Wyniki przeżywalności w Tabeli 8, a ich dynamikę wzrostu na Fig. 2–3.

Tabela 8. Przeżywalność szczepów BPC1 oraz BPC2 w warunkach pasażu jelitowego

Etap	Czynniki działające		Szczep <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>			
			BPC1 K*	BPC1	BPC2 K*	BPC2
			Log ilość bakterii [jtk/ml] (DS)**			
I	roztwór podstawowy A		8,98 (0,03)	8,53 (0,05)	8,76 (0,01)	8,40 (0,02)
II	roztwór pepsyny i lizozymu		8,72 (0,05)	8,40 (0,13)	8,80 (0,02)	8,33 (0,02)
III	roztwór pepsyny i lizozymu (po 20 min. inkubacji)		8,78 (0,05)	8,36 (0,03)	8,78 (0,04)	8,42 (0,13)
IV	niskie pH (po 30 min. inkubacji)	pH 2,0		6,31 (0,01)		8,13 (0,02)
		pH 3,0	8,70 (0,02)	8,24 (0,01)	8,86 (0,01)	8,57 (0,02)
		pH 4,0		8,78 (0,08)		8,78 (0,01)
V	roztwór z solami żółci i pankreatyną	pH 2,0		4,90 (0,01)		6,32 (0,21)
		pH 3,0	8,71 (0,06)	7,79 (0,03)	8,88 (0,06)	8,28 (0,05)
		pH 4,0		8,58 (0,10)		8,61 (0,01)
VI	roztwór z solami żółci i pankreatyną (po 120 min. inkubacji)	pH 2,0		6,19 (0,01)		6,27 (0,06)
		pH 3,0	9,03 (0,04)	8,26 (0,15)	8,90 (0,05)	8,35 (0,01)
		pH 4,0		9,06 (0,06)		8,94 (0,09)

K* – próby kontrolne wykonane dla każdego ze szczepów; DS** – odchylenie standardowe; Wyniki istotne statystycznie pogrubiono (p= 0,05).

Przeżywalność szczepów izolowanych z fermentowanych buraków po przejściu przez symulowany pasaż jelitowy wynosiła 100% w porównaniu z próbą kontrolną. Największy spadek liczebności żywych komórek zaobserwowano w V etapie doświadczenia podczas którego przeżywalność zmalała do 56,3% dla szczepu BPC1, 71,2% dla BPC2 przy pH=2,0. Na zmniejszenie ilości komórek bakterii szczepów izolowanych z kiszonych buraków największy wpływ miało działanie niskiego pH.

Badanie adherencji szczepów BPC1 i BPC2 do powierzchni biotycznych i abiotycznych

Adherencję szczepów według wynalazku przetestowano analizując ich przyleganie do żelatyny, śluzu, kolagenu oraz polistyrenu i szkła.

Badanie adherencji komórek bakterii do żelatyny

W 24-dółkowej płytce umieszczono po 1 ml sterylnej 1% żelatyny w PBS, po czym inkubowano płytkę przez 60 minut w 37°C. Po inkubacji zebrano nadmiar żelatyny i inkubowano w 4°C przez 24 godziny. Po wyjęciu z lodówki dodano po 1 ml bakterii odpowiedniego szczepu (z wcześniej zwirowanej 24-godzinnej hodowli), w 3 powtórzeniach dla każdego szczepu, w taki sposób aby pokryć całe dno dołka. Próbę kontrolną wykonano dodając roztworu PBS zamiast bakterii. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w 4°C, niezadherowane komórki odessano, a zadherowane utrwalono w temperaturze 60°C przez 20 minut. Po inkubacji dodano do każdego dołka 0,1% fiolet krystaliczny w ilości 300 µl/dołek i barwiono przez 15 minut w 4°C. Nadmiar fioletu zebrano. Następnie przemyto płytkę dwukrotnie wodą i dodano 1 ml buforu cytrynianowego o stężeniu 20 mM/L i pH=4,3. Płytkę inkubowano wytrząsając przy 150 rpm przez 45 minut w temperaturze pokojowej w celu wymycia fioletu krystalicznego z komórek. Zmierzone absorbancję każdej próby przy długości fali 570 nm, stosując jako próbę ślepą wodę destylowaną. Kontrolą negatywną była wybarwiona żelatyna bez bakterii. Próbę kontrolną wykonano dodając roztworu PBS zamiast bakterii.

Badanie adherencji komórek bakterii do śluzu

W 24-dółkowej płytce umieszczono po 1 ml sterylnego śluzu, po czym inkubowano płytkę przez 72 godziny w 4°C. Po inkubacji dokładnie usunięto nadmiar niezwiązanego śluzu i utrwalono w 60°C przez 20 minut. Następnie przygotowano bakterie poprzez ich odwirowanie oraz zawieszenie w roztworze PBS oraz ustalono absorbancję do wartości $1,0 \pm 0,1$ (przy długości fali 630 nm). Do każdego dołka dodano po 1 ml bakterii (przy czym dla każdego szczepu zrobiono po 3 powtórzenia). Płytkę inkubowano przez 2 godziny w 37°C, następnie niezadherowane komórki odessano, dołki przemyto delikatnie roztworem PBS, zadherowane bakterie utrwalono w temperaturze 60°C przez 20 minut. Po inkubacji dodano do każdego dołka 0,1% fiolet krystaliczny w ilości 250 µl/dołek i barwiono przez 15 minut w 4°C. Nadmiar fioletu zebrano. Następnie przemyto płytkę dwukrotnie wodą i dodano 1 ml buforu cytrynianowego o stężeniu 20mM/L i pH=4,3. Płytkę inkubowano wytrząsając przy 150 rpm przez 45 minut w temperaturze pokojowej w celu wymycia fioletu krystalicznego z komórek. Zmierzone absorbancję każdej próby przy długości fali 570 nm, stosując jako próbę ślepą wodę destylowaną. Kontrolą negatywną była wybarwiona żelatyna bez bakterii. Próbę kontrolną wykonano dodając roztworu PBS zamiast bakterii.

Badanie adherencji komórek bakterii do kolagenu

W 96-dółkowej płytce pokrytej kolagenem (BD) nałożono po 200 µl bakterii zawieszonych w PBS o absorbancji $1,0 \pm 0,1$ (przy długości fali 630 nm). Próby wykonano w 8 powtórzeniach dla każdego szczepu, a próbę kontrolną stanowił sam roztwór PBS. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w 30°C, po czym niezadherowane komórki odessano, a dołki przemyto wodą. Zadherowane komórki utrwalono przez 15 minut z dodatkiem 50 µl 80% etanolu. Etanol odessano. Po inkubacji dodano do każdego dołka 0,1% fiolet krystaliczny w ilości 100 µl na dołek i barwiono przez 15 minut. Nadmiar fioletu ziano, a płytkę przemyto wodą. Następnie dodano po 200 µl 96% etanolu i ekstrahowano w czasie 45 minut przy 120 rpm. Zmierzone absorbancję każdej próby przy użyciu czytnika mikroplatek Berthold Technologies przy długości fali 490 nm. Próbę kontrolną wykonano dodając roztworu PBS zamiast bakterii.

Badanie adherencji komórek bakterii do polistyrenu/szkła

Do 96-dółkowej (polistyren) lub 6-dółkowej (szkło) płytki nałożono po 100 µl (polistyren) lub 3 ml (szkło) bakterii zawieszonych w PBS o absorbancji $1,0 \pm 0,1$ (przy długości fali 630 nm). Próby wykonano w 8 (polistyren) lub 3 (szkło) powtórzeniach dla każdego szczepu, a próbę kontrolną stanowił sam roztwór PBS. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w 30°C, po czym niezadherowany nadmiar odessano, a dołki przemyto wodą. Zadherowane komórki utrwalono przez 15 minut z dodatkiem 100 µl (polistyren) lub 3 ml (szkło) 80% etanolu. Etanol ziano. Po inkubacji dodano do każdego dołka 0,1% fiolet krystaliczny w ilości 100 µl (polistyren) lub 3 ml (szkło) na dołek i barwiono przez 15 minut. Nadmiar fioletu ziano, a płytkę przemyto wodą.

Następnie dodano po 100 µl (polistyren) lub 3 ml (szkło) 96% etanolu i ekstrahowano w czasie 45 minut przy 120 rpm. Zmierzono absorbancję każdej próby przy długości fali 630 nm, stosując jako próbę ślepa wodę destylowaną. Próbę kontrolną wykonano dodając roztworu PBS zamiast bakterii.

Dla każdego z wykonywanych doświadczeń obliczono współczynnik adherencji według następującego wzoru:

$$Ad = \frac{A_{próby}}{A_{kontroli}};$$

gdzie:

Ad – współczynnik adherencji;

A – absorbancja próby.

Uzyskany wynik został oceniony zgodnie z klasyfikacją adhezji, którą przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Klasyfikacja współczynników adherencji

Współczynnik adherencji	Klasyfikacja
$Ad \leq 1$	Brak adherencji
$2 \geq Ad > 1$	Słaba adherencja
$3 \geq Ad > 2$	Średnia adherencja
$Ad > 3$	Silna adherencja

Stopień adherencji szczepów BPC1 oraz BPC2 do wybranych materiałów przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Stopień adherencji szczepów BPC1 oraz BPC2 do wybranych powierzchni

Szczep	Współczynnik adherencji				
	Powierzchnia abiotyczna		Powierzchnia biotyczna		
	Szkło	Polistyren	Kolagen	Śluz	Żelatyna
BPC1	6,3	1,8	1,5	1,0	3,5
BPC2	1,7	1,9	1,6	0,8	4,8
Brak adherencji					
Słaba adherencja					
Średnia adherencja					
Silna adherencja					

Adherencja to cecha, która umożliwia bakteriom przeżycie oraz namnożenie się w przewodzie pokarmowym. Zdolność ta, gwarantująca dłuższy czas przebycia pożądanych bakterii w układzie pokarmowym, stała się bardzo ważnym kryterium podczas selekcji szczepów o cechach probiotycznych. Wśród powierzchni abiotycznych użytych w doświadczeniach większe współczynniki adherencji otrzymano dla szkła. Dla szczepów wyizolowanych z kiszzonek można wyróżnić silną adherencję dla BPC1 – współczynnik adherencji – 6,3. Szczep BPC2 wykazał słabe przyleganie do szkła 1,7. Adherencja szczepów wyizolowanych z kiszonych buraków do polistyrenu była słaba, współczynniki kształtowały się na poziomie 1,5 (BPC1) i 1,9 (BPC2).

Wśród powierzchni biotycznych najwyższe współczynniki adherencji otrzymano w stosunku do żelatyny. Komórki szczepów BPC1 i BPC2, wykazywały silną adherencję do żelatyny i współczynniki kształtowały się odpowiednio 3,5 i 4,8. Przyleganie do kolagenu dla badanych szczepów było słabe i wartości adherencji wynosiły 1,5 (BPC1) i 1,6 (BPC2). Nie stwierdzono znaczącej adherencji badanych szczepów do śluzu. Stopień adherencji różnił się pomiędzy badanymi powierzchniami i szczepami oraz w ich obrębie.

Otrzymane wyniki pokazały, że badane szczepy w mniejszym lub większym stopniu są adherentne do większości testowanych powierzchni. Należy zatem uznać, że przesłanka adherentności została spełniona.

Badanie zdolności antagonistycznych szczepów BPC1 oraz BPC2 względem szczepów wzorcowych

W badaniach uzdolnień antagonistycznych wyizolowanych szczepów BPC1 oraz BPC2 wykorzystana została metoda słupkowa, która pozwala na równoległy wzrost szczepów badanych oraz testowych. Metoda słupkowa umożliwia określić średnice stref zahamowania wzrostu danych szczepów testowych.

Podczas badania antagonizmu szczepów wyizolowanych z kiszonych warzyw wykorzystano 9 szczepów bakterii Gram – dodatnich, 13 szczepów bakterii Gram – ujemnych oraz po 4 szczepy pleśni i drożdży. Z przefiltrowanego bakteriami mlekowymi podłoża MRS inkubowanego przez 24 godziny w 30°C wycięto po 3 słupki o średnicy 10 mm i umieszczono je na płytkach z murawą (pożywka brzęczkowa lub bulionowa z wcześniej zaszczipionym szczepem wskaźnikowym (tj. BPC1 lub BPC2) w ilości $10^5 - 10^6$ jtk/ml).

Płytki inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 30°C, następnie odczytywano strefy przejaśnienia murawy wokół słupków. Wyniki stref zahamowania wzrostu podano jako średnia ze średnic zahamowania wzrostu wraz z odchyleniem standardowym. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabelach 11–14.

Tabela 11. Uzdolnienia antagonistyczne wyizolowanych szczepów BPC1 oraz BPC2 w stosunku do Gram-dodatniej bakteryjnej mikroflory patogennej

Patogen	Średnica zahamowania wzrostu [mm] (SD)	
	Szczep	
	BPC1	BPC2
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	21 (1,00)	14 (0,58)
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	19 (1,15)	14 (0,50)
<i>Staphylococcus aureus</i> 27734	17 (0,58)	21 (0,58)
<i>Staphylococcus aureus</i> 27794	21 (1,00)	21 (0,58)
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>Bacillus cereus</i> 11778	0 (0,00)	20 (1,53)
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	21 (1,73)	0 (0,00)
<i>Listeria monocytogenes</i> 18195	17 (0,58)	18 (0,00)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> J.W. 1533	40* (0,00)	40* (0,00)

*Strefa zahamowania wzrostu patogenu bardzo duża, patogen wyrósł tylko na obrzeżach płytki w postaci pojedynczych kolonii; Pogrubienie oznacza wyniki istotne statystycznie

Tabela 12. Uzdolnienia antagonistyczne wyizolowanych szczepów BPC1 oraz BPC2 w stosunku do Gram-ujemnej bakteryjnej mikroflory patogennej

Patogen	Średnica zahamowania wzrostu [mm] (SD)	
	Szczep	
	BPC1	BPC2
<i>Klebsiella aerogenes</i> 13048	0 (0,00)	16 (0,58)
<i>Salmonella typhimurium</i> 13311	33 (1,73)	30 (1,53)
<i>Salmonella typhimurium</i> 2182 TA	27 (2,00)	30 (1,15)
<i>Salmonella typhimurium</i> 2180 PCM	21 (1,53)	20 (0,58)
<i>Salmonella typhimurium</i> 14033	15 (1,53)	20 (1,00)
<i>Salmonella enterica</i> 7001	16 (0,58)	18 (0,58)
<i>Enterobacter cloacae</i> 13047	0 (0,00)	18 (0,58)
<i>Escherichia coli</i> 10536	0 (0,00)	16 (1,53)
<i>Escherichia coli</i> 8738	14 (1,00)	18 (1,53)
<i>Escherichia coli</i> 8739	0 (0,00)	14 (0,00)
<i>Campylobacter jejuni</i> 11351	15 (0,58)	20 (0,58)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 15442	5 (8,08)	23 (1,53)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24755	5 (8,66)	19 (1,53)

Pogrubienie oznacza wyniki istotne statystycznie

Tabela 13. Uzdolnienia antagonistyczne wyizolowanych szczepów BPC1 oraz BPC2 w stosunku do pleśni

Nazwa patogenu	Średnica zahamowania wzrostu [mm] (SD)	
	Szczep	
	BPC1	BPC2
<i>Penicillium notatum</i> E40 Ł0533	26 (1,53)	31 (1,73)
<i>Penicillium expansum</i> E42 Ł00536	28 (2,00)	34 (0,58)
<i>Aspergillus fumigatus</i> E34 Ł0426	27 (3,06)	27 (3,06)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	20 (2,08)	20 (0,58)

Tabela 14. Uzdolnienia antagonistyczne wyizolowanych szczepów w stosunku do drożdży

Nazwa patogenu	Średnica zahamowania wzrostu [mm] (SD)	
	Szczep	
	BC1	BC2
<i>Candida pelliculoza</i>	20 (1,53)	18 (0,58)
<i>Cyberlindnera jadinii</i> LOCK 0021	20 (0,58)	20 (1,53)
<i>Rhodotorula glutinis</i> R13 Ł0056	37 (0,58)	30 (2,00)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> R12 Ł0054	20 (1,53)	22 (2,52)

Spośród użytych do doświadczenia patogennych szczepów bakterii Gram – dodatnich największą wrażliwością na obecność komórek *Lactiplantibacillus plantarum* BPC1 i BPC2 wykazał się szczep *Staphylococcus epidermidis* J.W. 1533, gdzie średnica zahamowania wzrostu była bardzo duża i wynosiła 40 mm, a patogen wyrósł tylko na obrzeżach płytki. Wszystkie szczepy *Staphylococcus aureus* były wrażliwe na działanie szczepów BPC1 i BPC2 a średnice zahamowania ich wzrostu wynosiły 14–29 mm. Najmniej wrażliwy na inhibicję wzrostu spośród szczepów testowy okazał się szczep *Listeria monocytogenes* 19115, gdzie brak zahamowania wzrostu zanotowano dla szczepu: BC2. Wzrost szczepu *Enterococcus faecalis* 29212 nie był hamowany przez badane drobnoustroje.

Szczepami testowymi bakterii Gram – ujemnych, dla których zanotowano największą inhibicję wzrostu wynoszącą odpowiednio 33 mm (BPC1) i 30 mm (BPC2) jest *Salmonella typhimurium* 13311 oraz 27mm (BPC1) i 30 mm (BPC2) jest *Salmonella typhimurium* 2182 TA. Brak zahamowania wzrostu w obecności szczepu BC1 wykazały bakterie *Escherichia coli* 10536, *Escherichia coli* 8739 i *Enterobacter cloacae* 13047.

Inhibicja wzrostu pleśni oraz drożdży zachodziła równie skutecznie jak patogenów bakteryjnych. W żadnej z prób nie zaobserwowano braku zahamowania wzrostu. Najbardziej wrażliwy okazał się szczep *Penicillium expansum* E42 Ł00536, gdzie średnice zahamowania wyniosły odpowiednio 28 mm (BPC1) i 35 mm (BPC2), a najmniejszą wrażliwość zanotowano dla *Aspergillus niger* ATCC 16404 – 20 mm. Wśród drożdży to *Rhodotorula glutinis* R13 Ł0056 okazały się najbardziej wrażliwe, średnica zahamowania wzrostu wyniosła odpowiednio 37 mm (BPC1) i 30 mm (BPC2), a najmniej – *Candida pelliculoza* – 17 mm (BPC2) i 20 mm (BPC1).

Uzyskane wyniki potwierdzają, że szczepy BPC1 oraz BPC2 wykazują aktywność antagoniścyczną do patogenów jelitowych odpowiedzialnych za choroby u ludzi i zwierząt.

Oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki szczepów BPC1 oraz BPC2

Do określenia oporności szczepów BPC1 oraz BPC2 na antybiotyki zastosowano metodę dyfuzyjno-krażkowej, w której na płytkę agarową nanosi się zawiesinę badanego szczepu bakterii (tj. BPC1 albo BPC2) w stężeniu 0,5 MacFarlanda i nakłada się krążki bibułowe nasycone badanym antybiotykiem. Całość inkubowano w 30°C przez 18 godzin. Następnie dokonywano odczytu strefy zahamowania wzrostu wokół krążka. Wyniki przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Ocena oporności szczepów BPC1 oraz BPC2 na antybiotyki i chemioterapeutyki

Nazwa badanego antybiotyku	stężenie [μg]	średnice zahamowania wzrostu [mm]	
		BC1	BC2
Kolistyna	10	14	19
Kolistyna	25	13	35
Kolistyna	50	12	10
Kanamycyna	5	12	10
Gentamycyna	120	14	9
Gentamycyna	200	18	15
Sreptomycyna	25	11	0
Cefoperazon	75	10	10
Ampicylina	25	8	14
Linezolid	10	10	0
Linezolid	30	0	13
Cefuroksym	30	13	27
Amoksycylina	2	9	20
Amoksycylina	10	15	23
Norfloksacyna	5	8	6
Norfloksacyna	10	12	6
Cefotaksym	5	14	12
Cefotaksym	30	15	8
Cyprofloksacyna	1	9	8
Cyprofloksacyna	5	8	0
Erytromycyna	30	19	15
Nitrofurantoina	100	18	15
Nitrofurantoina	200	12	30
Nitrofurantoina	300	16	12
Azytromycyna	15	13	14

Przeprowadzona analiza wykazała, że Szczepy BPC1 i BPC2 wykazują oporność w stosunku do następujących antybiotyków i chemioterapeutyków o działaniu przeciwbakteryjnym: kolistyny, kanamycyny, gentamycyny, streptomycyny, cefoperazonu, ampicyliny, linezolidu, cefuroksymu, amoksycyliny, norfloksacyny, cyprofloksacyny, cefotaksymu, erytromycyny, nitrofurantoiny, azitromycyny.

Wykaz sekwencji nukleotydowych regionu DNA kodującego gen 16S rRNA szczepu BPC1 oraz BPC2 które określają ich przynależność gatunkową:

Sekwencja nukleotydowa genu 16S rRNA szczepu BPC1

CRGCATGSGGGKCTATAATGCAGTCGACGARCTCYGGTATTGATTGGTGGCTTGCATCAWGATTTACRITTTGAGTGAGTGG
 CGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAAACAGATGCTAATACCGCATAACA
 ACTTGGACCGCAGGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAKCTAKATGG
 TGGGGTAACGGCTCACCATGGSAAATGATACGTASCCAACCTGAGAGGGTAATCSGCCMCWTTGGGACTGAGACACGGCCC
 AAACTCCTACGGGAGGCAGCWKTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGASCAACGCCSCGTGAGTGAAKAA
 GGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTGTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTACGGTATTGACGGTATTTAACCA
 GAAAGCCACRGCTAACTACGTGCCASCAGCCGCGTAATACRTASGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATGSGCGTAAAG
 CGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCRGCTCAACCCGRAGAAGTGCATCGGAAAACCTGGAAAACCTGA
 STGCAGAAGAKGACAGTGGAACTCCATGTGTAKCGRTGAAATGCGTAKATATATGGAAKAACACCASTGGCGAACCGGGC
 TGCTGTGCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAAGYATGGGTAGCAAAACASGATTAKATACCCCTGGTAGTCCATACCGTAR
 ACGATSAACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCWKTGCTRCAGCTWACKCATTAAAGCAYTCCRCSTGTGKGAGTA
 CGRCCGTC AAGGMTGAAACTCAAATGAATTTGACGGSGGACCMGCWACAAGCAGATGGAKCATGTGGTTTTAATTTGAA
 GCTACCGCTARGAAGTACTAGTCTTGACATTACTKATGCAATCTARMAGAATAAGACGATTCCTTCGGGGAMATGRGA
 TWACTGGTGGATGMCATGAATTGTTCKTCARCTCGAGATCCTGKAMATKCTTGGGATCAAGTCTCGCAACGAACGACAA
 TCGTTACTTATCRAGTAGRCAAKCATTACGTCGACTCTTGATGGAAAACCTGGCCGGTGAACAAAAC

Sekwencja nukleotydowa genu 16S rRNA szczepu BPC2

CCTCAGTWGCGGTTCTGYAATGGGKTCKAACRAGYTCTGCCWATTGATTGTGGCTGGCATCAWGATTTACGTTTGGRTG
 GGTGGYGAAGTGGTGGSCAACACAACGKGAACCTGCCCCRAGSTGAGGGATAACACCTGGAAATTCATGCTAATACCGC
 ATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAGGCTGGCTTCAGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGCTCTATGACTA
 TATGGTGGGGCAACGGCGCACCTGGGWATGATRGGTARCGAACCTGAGACGGCATCCCCCTTTTGGGAGTGAGACAC
 CGGCCAWACTCCTACAGGGGGCARCTTWAKGGAATCTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTG
 ACTAASGGTTTCGGCTGACAACACTCTGTGTTACCTGTAACATATTCCTCAATAACTGTTCCCKGATTGACAGATTTTA
 ACCAKAAAGCCACACCTAACTACGTGCTTCCCGCCGCTKCAATACAAACCACATGCTCCACCGTCTKGGATTTATTGCC
 GTAAATTCCTTTGAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTCCCRCTTCAATGCTWCKGAGATRTGTGCGSAMCTGGGAA
 ACATACCTGCCAACAAATTACARTGCAACTCCWTGTGTATGGACTAAMTGGGTATCTATATGTGATAGCTACACTTRCKTA
 CGAGSCTGTCTGGTCTGTACCTGACRCASAGGCTCCWAAGYMWCKGKAGYWMTTMCGWATATATACSCWTTMRYCSMTA
 CAGAAGAMGATSAACGGTMMTCGTTTGAGGGYTTCTKTCCCCTTTTGGGATGCACTWTCTTMTTWTGAAAYTCARCGYGT
 CASWTGACTTAARGMWSAACTGCAMTSACTTGACCGGRCTCRCTACAAGACGATSGATCGTSWGGTWTYATATTCAA
 CAGCTRTGCRGMACCGTTACYAGGYCGTGGACTTACTRKKTCAAATACTRWCARAWTWCMGTASAATYASCTWTCTS
 TGCAACATGGATACATCGTTGTAGCAAYRGATTGTYTTACGAGYCGAGATCGTWCATGCATTSRCTCAGTCTGCWCGA
 TACGACATCCKTAATTATGAGGTTAGCATTMTACKCTGCATYCTGTAGACTTGGCGGGTACATACGTMCGATGTGGC
 AATTAGCTCTCT

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep bakterii mlekowych *Lactiplantibacillus plantarum* BPC1 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod numerem B/00373.
2. Szczep bakterii mlekowych *Lactiplantibacillus plantarum* BPC2 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod numerem B/00374.
3. Kompozycja nowych szczepów z rodzaju *Lactiplantibacillus*, **znamienna tym**, że zawiera szczep *Lactiplantibacillus plantarum* BPC1 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod numerem B/00373 oraz *Lactiplantibacillus plantarum* BPC2 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod numerem B/00374 w proporcji 1:1.
4. Zastosowanie kompozycji określonej w zastrz. 3 do fermentacji produktów roślinnych.
5. Zastosowanie według zastrz. 4, **znamiennie tym**, że produkty roślinne stanowią buraki.

Rysunki

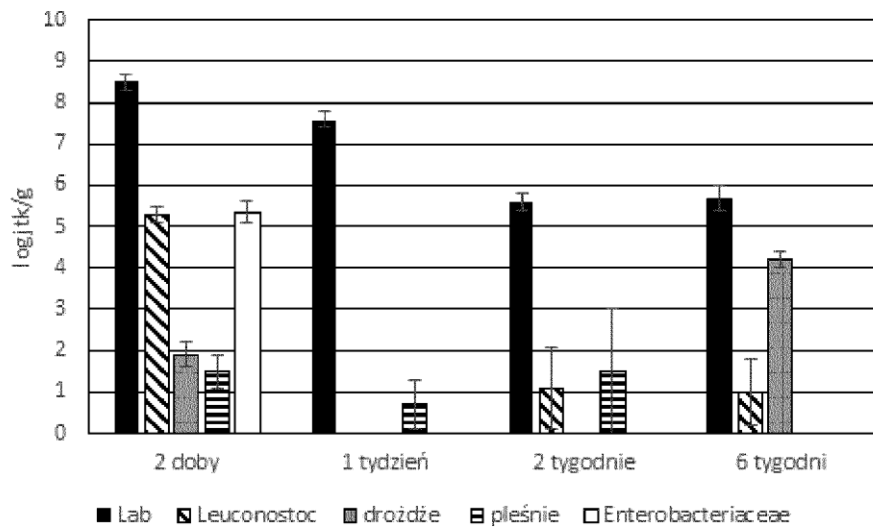


Fig. 1

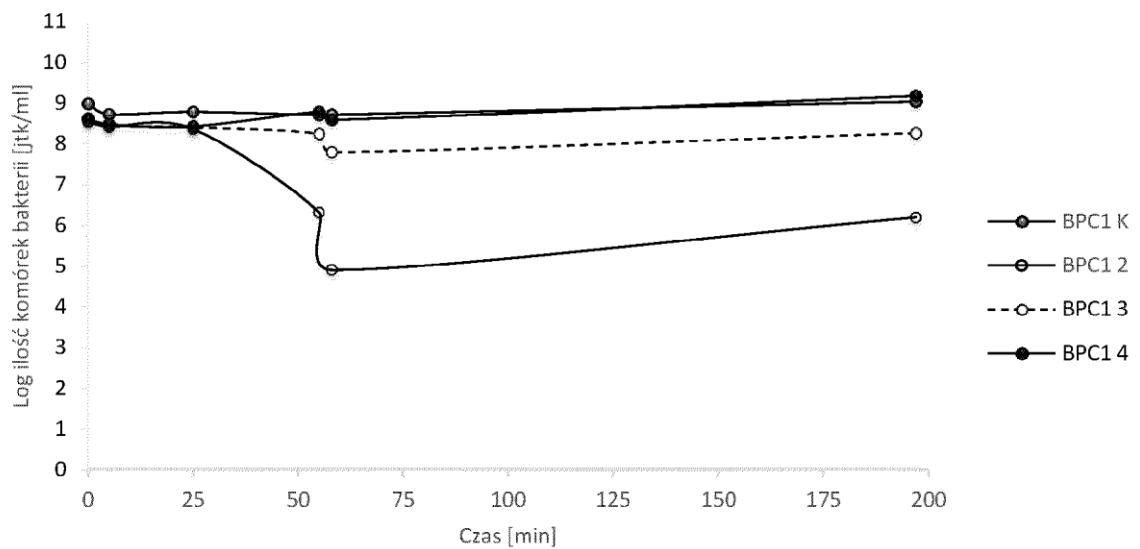


Fig. 2

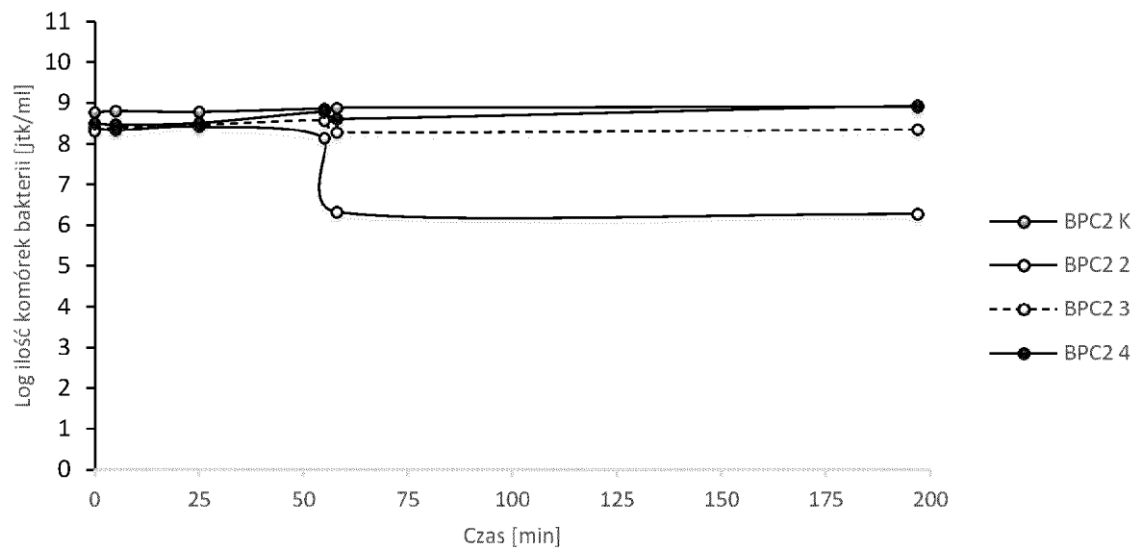


Fig. 3