

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238589**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430619**

(22) Data zgłoszenia: **17.07.2019**

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

(54)

Szczep bakterii mlekowych Lactobacillus rhamnosus

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

25.01.2021 BUP 02/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

13.09.2021 WUP 24/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

KATARZYNA ŚLIŻEWSKA, Łódź, PL

ELŻBIETA KLEWICKA, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marcin Wróblewski

PL 238589 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus rhamnosus* ŁOCK 1146 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów, w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu pod numerem B/00217, o właściwościach probiotycznych. Dotychczas znane są szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus*, jak *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* Lc705, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 8530, *Lactobacillus rhamnosus* CASL, a także szczepy *Lactobacillus rhamnosus* BioPL1 z opisu patentowego PL 226294 oraz *Lactobacillus rhamnosus* ŁOCK 1087 ze zgłoszenia patentowego P.422602.

Wiadomo jest, iż probiotyki zapewniają równowagę mikrobioty jelitowej i wywierają korzystny efekt na zdrowie ludzi i zwierząt. Określenie probiotyk jest zastrzeżone dla preparatów lub produktów, które spełniają następujące kryteria: zawierają żywe komórki w odpowiedniej ilości, poprawiają stan zdrowia gospodarza, korzystny efekt wywierają w przewodzie pokarmowym (podawane jako dodatki do żywności lub pasz). Skuteczność korzystnego oddziaływania probiotycznych szczepów mikroorganizmów, w tym głównie bakterii fermentacji mlekowej (LAB) na organizm ludzi i zwierząt jest uwarunkowana wieloma czynnikami, dlatego ważna jest właściwa selekcja i dobór szczepów oraz systematyczne dostarczanie organizmowi dużej liczby żywych komórek tych mikroorganizmów. Zgodnie z propozycjami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) szczepy probiotyczne w procesie selekcji muszą spełniać zarówno kryteria bezpieczeństwa, funkcjonalności, jak i przydatności technologicznej. Bezpieczeństwo szczepu jest zdefiniowane poprzez jego pochodzenie oraz profil oporności na antybiotyki. Aspekty funkcjonalne określają ich zdolność przeżycia w przewodzie pokarmowym (m.in. odporność na niskie pH i sole żółci). Właściwości technologiczne obejmują natomiast zdolność przeżycia probiotyków i zachowania swoich uzdolnień podczas przechowywania i dystrybucji. Produkty probiotyczne są znane już od dawna, ale obecnie, z powodu zwiększonej świadomości żywieniowej społeczeństw, stają się bardzo popularne. Na zwiększenie popytu mają również wpływ choroby cywilizacyjne związane z niewłaściwym żywieniem, stresujący tryb życia i polepszacze stosowane do żywności. Produkcja żywności probiotycznej, dodatków paszowych oraz produktów farmaceutycznych wymaga jednak pozyskiwaniem nowych szczepów oraz doboru szczepów o odpowiednich właściwościach.

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii mlekowych z gatunku *Lactobacillus rhamnosus*, który oznaczono symbolem ŁOCK 1146 i który został zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu pod numerem B/00217.

Szczep bakterii ŁOCK 1146 wyizolowano z kału dorosłego człowieka.

Szczep ŁOCK 1146 jest to Gram-dodatnia pałeczka, nieruchliwa, nie przetrwalnikująca. Jest szczepem o właściwościach probiotycznych, stanowiącym homolog bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA przedstawionej na końcu opisu.

W celu określenia przynależności gatunkowej nowego szczepu ŁOCK 1146 zsekwencjonowano region DNA kodujący gen 16S rRNA o długości 1432. Otrzymaną sekwencję nukleotydową genu 16S rRNA porównano za pomocą programu BLASTN 2.6.0+ z sekwencjami dostępnymi w bazie National Center of Biotechnology Information (NCBI) oraz programu CLC Main Workbench 8. Na podstawie porównania sekwencji nukleotydowych genów 16S rRNA bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* KY348290.1 stwierdzono podobieństwo nowego szczepu bakterii do gatunku *Lactobacillus rhamnosus* z prawdopodobieństwem 99,16%.

Nowy szczep ŁOCK 1146 hoduje się na podłożu Rogosa przeznaczonym do hodowli bakterii z rodzaju *Lactobacillus* sp., przejrzystym, o barwie żółto-brązowej, o składzie w g/l: pepton kazeinowy – 10,0, ekstrakt drożdżowy – 5,0, D(+)glukoza – 20,0, fosforan potasu – 6,0, cytrynian amonu – 2,0, Tween 80 – 1,0, octan sodu – 15,0, siarczan magnezu – 0,575, siarczan żelaza II – 0,034, siarczan manganu – 0,12, agar – 15,0, o pH 5–6, w temperaturze 15–45°C, korzystnie 37°C w czasie 48 godzin. Na podłożu Rogosa szczep rośnie w postaci biało-kremowych, okrągłych kolonii, o gładkiej powierzchni i regularnych brzegach, o średnicy około 2–3 mm.

Szczep ŁOCK 1146 hoduje się także w podłożu płynnym MRS, stanowiącym modyfikację podłoża Rogosa, zawierającym jako źródło glukozę, o składzie w g/l: ekstrakt drożdżowy – 4,0, ekstrakt mięsny

– 10,0, pepton z kazeiny – 10,0, D(+)glukoza – 20,0, Tween 80 – 1,0, wodorocytrynian amonu – 2,0, fosforan dwupotasowy – 2,0, octan sodu – 5,0, siarczan magnezu 7-wodny – 0,20, siarczan magnezu 4-wodny – 0,05, o pH 5–6, w temperaturze 15–45°C, korzystnie 37°C w czasie 48 godzin. W podłożu tym szczep rośnie tworząc jednorodne zmętnienie pożywki.

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

Cechy morfologiczne szczepu ŁOCK 1146

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

Cechy fizjologiczne i biochemiczne szczepu ŁOCK 1146

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

Badanie metabolizmu glukozy w warunkach tlenowych i beztlenowych na pożywce Hugh-Lefsona w wysokich słupach wykazało, że szczep ŁOCK 1146 jest zdolny do rozkładu glukozy zarówno w obecności tlenu, jak i w warunkach beztlenowych, czyli na drodze fermentacji.

Test API 50 CHL wykazał, że szczep ŁOCK 1146 jest zdolny do fermentacji następujących sacharydów i ich pochodnych: rybozy, galaktozy, glukozy, fruktozy, mannozy, sorbozy, ramnozy, inozytolu, mannitolu, sorbitolu, N-acetyloglukozaminy, Metylo- α ,D-glukopiranozydu, amygdaliny, arbutyny, esculiny, salicyny, celobiozy, maltozy, laktozy, sacharozy, trehalozy, melecytozy, gencjobiozy, D-turanozy, tagatozy, glukonianu.

Szczep ŁOCK 1146 charakteryzuje się metabolizmem względnie heterofermentatywnym. Laktozę fermentuje z wytworzeniem kwasu mlekowego w ilości 3,5 g/l, przy czym udział kwasu L(+) mlekowego wynosi 97%, kwasu octowego (1,5 g/l), aldehydu octowego (1,0 mg/l) i etanolu (5,0 mg/l).

Test API ZYM wykazał, że szczep ŁOCK 1146 wykazuje aktywność następujących enzymów: arylamidazy leucyny, arylamidazy waliny, arylamidazy cysteiny, fusohydrolazy naftylo-AS-BI.

Szczep ŁOCK 1146 nie wytwarza siarkowodoru, ani amoniaku z argininy, nie wykazuje zdolności rozkładu H₂O₂.

Cechy probiotyczne szczepu ŁOCK 1146

Szczep ŁOCK 1146 spełnia kryteria stawiane bakteriom probiotycznym, co stwierdzono w wyniku badań *in vitro* wykonanych według procedur zalecanych przez FAO/WHO.

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

Szczep ŁOCK 1146 wykazuje również wysoką odporność na sole żółci w stężeniach 1% i 2%.

Szczep ŁOCK 1146 wykazuje oporność w stosunku do antybiotyków i chemioterapeutyków o działaniu przeciwbakteryjnym tj.: penicylina, kanamycyna, wankomycyna, amoksycylina, doksycyklina, streptomycyna, erytromycyna, tetracyklina, cefalotyna, ceftazydym, aztreonam, amikacyna, klotrimazol.

Wykazuje aktywność antagonistyczną w stosunku do patogenów przenoszonych drogą pokarmową tj. *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*.

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

Szczep ŁOCK 1146 charakteryzuje się dobrym przyleganiem do komórek nabłonka jelitowego Caco-2, a więc wykazuje właściwości adhezyjne.

Wykazuje zdolności detoksyfikacyjne mykotoksyn (aflatoksyny B₁, ochratoksyny A, fumonizyny, toksyny T-2, zearalenonu, deoksyniwalenolu), które najczęściej mogą stanowić zanieczyszczenie żywności i pasz.

Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1146

Właściwości biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1146, ze względu na możliwość zastosowania w żywności i w paszach określono zarówno w mleku, jak i w mieszanke paszowej.

W mleku o 3,2% zawartości tłuszczu szczep ŁOCK 1146 fazę stacjonarną osiągnął po 19 godzinach hodowli, zaś plon komórek wynosił 2,10x10⁹ jtk/ml. Czas trwania fazy adaptacyjnej bakterii wyniósł 2 godziny. Właściwa szybkość wzrostu szczepu wynosiła 0,42 h⁻¹, a produktywność hodowli była równa 0,45x10⁸.

W mieszance paszowej (zmielone ziarna: pszenicy 40%, jęczmienia 30%, kukurydzy 20% i żyta 10%) szczep ŁOCK 1146 fazę stacjonarną osiągnął po 18 godzinach hodowli, zaś plon komórek wynosił $2,35 \times 10^9$ jtk/ml. Czas trwania fazy adaptacyjnej bakterii wyniósł 2 godziny. Właściwa szybkość wzrostu szczepu wynosiła $0,17 \text{ h}^{-1}$, a produktywność hodowli była równa $0,50 \times 10^8$.

Szczep ŁOCK 1146 znajduje zastosowanie jako dodatek do żywności i pasz.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

Przykład I

Szczep ŁOCK 1146 hodowano w podłożu płynnym MRS (firmy Merck), o składzie w g/l: ekstrakt drożdżowy – 4,0, ekstrakt mięsny – 10,0, pepton z kazeiny – 10,0, D(+)glukoza – 20,0, Tween 80 – 1,0, wodorocytrynian amonu – 2,0, fosforan dwupotasowy – 2,0, octan sodu – 5,0, siarczan magnezu 7-wodny – 0,20, siarczan magnezu 4-wodny – 0,05, o pH 5–6, w obecności CO_2 wprowadzonego w ilości 5% (v/v), w temperaturze 37°C .

Po 48 godzinach hodowli wyhodowane komórki oddzielono od podłoża na wstrząsarce uzyskując gęstość $2,5 \times 10^9$ komórek/ml.

Przykład II

Szczep ŁOCK 1146 hodowano w podłożu płynnym Rogosa (firmy Difco) o składzie w g/l: pepton kazeinowy – 10,0, ekstrakt drożdżowy – 5,0, D(+)glukoza – 20,0, fosforan potasu – 6,0, cytrynian amonu – 2,0, Tween 80 – 1,0, octan sodu – 15,0, siarczan magnezu – 0,575, siarczan żelaza II – 0,034, siarczan manganu – 0,12, agar – 15,0, o pH 5–6, w obecności CO_2 wprowadzonego w ilości 5% (v/v), w temperaturze 37°C .

Po 48 godzinach hodowli wyhodowane komórki oddzielono od podłoża na wstrząsarce uzyskując gęstość $1,5 \times 10^9$ komórek/ml.

Przykład III

Bakterie otrzymane jak w przykładzie I umieszczono w środowisku o pH 2,0 i 3,0. W środowisku o pH 2,0 po 180 minutach przeżyło $3,5 \times 10^8$ jtk/ml przy wyjściowej ich ilości $5,0 \times 10^8$ jtk/ml. W środowisku o pH 3,0 po 180 minutach przeżyło $2,5 \times 10^8$ jtk/ml przy wyjściowej ich ilości $4,0 \times 10^8$ jtk/ml.

Przykład IV

Bakterie otrzymane jak w przykładzie I poddano działaniu żółci o stężeniach 1% i 2% w czasie do 4 godzin. Po 4 godzinach inkubacji przy stężeniu żółci 2% przeżywalność komórek wynosiła 92%, a przy stężeniu żółci 1% przeżyło 95% komórek bakterii.

Przykład V

Liofilizat bakterii otrzymanych jak w przykładzie I przechowywano w temperaturze $4\text{--}5^\circ\text{C}$ oraz w temperaturze pokojowej 25°C w ciągu 4 miesięcy. Po tym czasie nastąpiło obniżenie liczby żywych komórek o 5% dla temperatury chłodniczej i o 14% dla temperatury pokojowej. Temperatura chłodnicza zapewniła większą stabilność i trwałość.

Wykaz sekwencji

CTGATTTATTGAAAGGTGCTTGCAATTCCTTGATTTAGATTTTGAACGAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAA
 CAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGG
 CGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
 CGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATT
 GGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA
 CAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGG
 TCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGT
 GACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG
 TTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAAC
 TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT
 GCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAT
 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTTGGAAAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCC
 GCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAACATGTGGGTTTAATTCG
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATC
 AGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGT
 GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGC
 CAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
 ATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCC
 ATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG
 CCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCGGAAAGCCGGTGGCGTAAACCTT
 TAGGGAGCGAGCCGTC

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

Zastrzeżenie patentowe

1. Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus rhamnosus* ŁOCK 1146 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu pod numerem B/00217, o właściwościach probiotycznych.