

Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus pentosus*

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

Preparaty probiotyczne podawane zwierzętom hodowlanym w paszy lub zaaplikowane oralnie, wpływają korzystnie na ich wzrost, poprzez stymulujące oddziaływanie na przewód pokarmowy i procesy w nim zachodzące. Odpowiednio dobrane bakterie probiotyczne determinują przyswajanie paszy, pełniąc jednocześnie rolę regulatora równowagi mikroorganizmów przewodu pokarmowego zwierząt. Efekty działania preparatów probiotycznych zbliżone są do efektów uzyskanych w wyniku zastosowania antybiotyków paszowych, bowiem jedne i drugie redukują liczbę bakterii patogennych, jednak sposób ich działania jest różny. Probiotyki nie powodują żadnych skutków ubocznych i nie implikują odkładania się szkodliwych substancji obcych, stąd nie mają okresu karencji i nie ma niebezpieczeństwa ich przedawkowania. Z punktu widzenia konsumenta i producenta żywności, ważne jest również, że stosowanie probiotyków dzięki możliwości obniżania, a nawet całkowitej eliminacji konieczności stosowania antybiotyków, jest sposobem otrzymywania bezpiecznej żywności.

Dotychczas znane są szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus pentosus*, jak *Lactobacillus pentosus* LMG 10755T, *Lactobacillus pentosus* LMG 18401, *Lactobacillus pentosus* AJ292254, *Lactobacillus pentosus* ITA23, *Lactobacillus pentosus* LPS16, *Lactobacillus pentosus* NCDO 363, *Lactobacillus pentosus* ATCC® 8041™, z opisu zgłoszenia patentowego P 407121, szczep *Lactobacillus pentosus* ŁOCK 0976.

Przedmiotem **wynalazku** jest nowy szczep bakterii mlekowych z gatunku *Lactobacillus pentosus*, który oznaczono symbolem ŁOCK 1094 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/00124.

Szczep ŁOCK 1094 wyizolowano z pomiotu kurcząt brojlerów. Szczep ŁOCK 1094 jest to Gram-dodatnia pałeczka, nieruchliwa, nie przetrwalnikująca. Jest szczepem o właściwościach probiotycznych, stanowiącym homolog

bakterii z gatunku *Lactobacillus pentosus* o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA przedstawionej na końcu opisu.

W celu określenia przynależności gatunkowej nowego szczepu ŁOCK 1094 zsekwencjonowano region DNA kodujący gen 16S rRNA o długości 1415 pz. Otrzyma-
5 ną sekwencję nukleotydową genu 16S rRNA porównano za pomocą programu BLASTN 2.6.0+ z sekwencjami dostępnymi w bazie National Center of Biotechnology Information (NCBI) oraz programie DNA Baser v4.36.0. Na podstawie porównania sekwencji nukleotydowych genów 16S rRNA bakterii z gatunku *Lactobacillus pentosus* JCM 1558 stwierdzono podobieństwo nowego szczepu bakterii do gatunku
10 *Lactobacillus pentosus* z prawdopodobieństwem 99,87%.

Nowy szczep ŁOCK 1094 hoduje się na podłożu Rogosa przeznaczonym do wykrywania 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 15,0, siarczan magnezu – 0,575, siarczan żelaza II – 0,034, siarczan manganu – 0,12, agar – 15,0, o pH 5-6, korzystnie 5,5, w temperaturze 15-45°C, korzystnie 37°C w czasie 48 godzin. Na podłożu Rogosa szczep rośnie w postaci białokremowych, okrągłych kolonii, o gładkiej powierzchni i regularnych brzegach, o średnicy około 1-3 mm.

20 Szczep ŁOCK 1094 hoduje się także w podłożu płynnym MRS, stanowiącym modyfikację podłoża Rogosa, o składzie w g/l: ekstrakt drożdżowy – 4,0, ekstrakt mięsny – 10,0, pepton z kazeiny – 10,0, D(+)glukoza – 20,0, Tween 80 – 1,0, wodorocytrynian amonu – 2,0, fosforan dwupotasowy – 2,0, octan sodu – 5,0, siarczan magnezu 7-wodny – 0,20, siarczan magnezu 4-wodny – 0,05, o pH 5-6, korzystnie 5,5, w tem-
25 peraturze 15-45°C, korzystnie 37°C w czasie 48 godzin. W podłożu tym szczep rośnie tworząc jednorodne zmętnienie pożywki.

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

Cechy morfologiczne szczepu ŁOCK 1094

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

Cechy fizjologiczne i biochemiczne nowego szczepu ŁOCK 1094

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

5 Badanie metabolizmu glukozy w warunkach tlenowych i beztlenowych na pożywce Hugh-Leifsona w wysokich słupach wykazało, że szczep ŁOCK 1094 jest zdolny do rozkładu glukozy zarówno w obecności tlenu, jak i w warunkach beztlenowych, czyli na drodze fermentacji.

Test API 50 CHL wykazał, iż szczep ŁOCK 1094 jest zdolny jest do fermentacji następujących sacharydów i ich pochodnych: glicerolu, arabinozy, rybozy, ksylozy, 10 galaktozy, glukozy, fruktozy, mannozy, mannitolu, sorbitolu, N-acetyloglukozaminy, amygdaliny, arbutyny, esculiny, salicyny, celobiozy, maltozy, laktozy, melibiozy, sacharozy, trehalozy, inuliny, melecytozy, rafinozy, gencjobiozy, D-turanozy, glukonianu.

Szczep ŁOCK 1094 charakteryzuje się metabolizmem względnie heterofermentatywnym. 15 Glukozę fermentuje z wytworzeniem kwasu mlekowego w ilości 10,43 $\mu\text{mol/ml}$, kwasu octowego (3,77 $\mu\text{mol/ml}$), kwasu masłowego (0,49 $\mu\text{mol/ml}$), aldehydu octowego (0,09 $\mu\text{mol/ml}$) i etanolu (0,14 $\mu\text{mol/ml}$).

Test API ZYM wykazał, że szczep ŁOCK 1094 wykazuje aktywność następujących 20 enzymów: fosfatazy alkalicznej, esterazy, α -galaktozydazy, β -galaktozydazy, α -glukozydazy, β -glukuronidazy, kwaśnej fosfatazy, fosfoamidazy, aryamidazy leucyny, aryamidazy waliny, N-acetyloglukozaminidazy, α -mannozydazy, α -fukozydazy. Ponadto stwierdzono, że szczep ŁOCK 1094 nie wytwarza siarkowodoru, ani amoniaku z argininy, nie wykazuje zdolności rozkładu H_2O_2 .

Zdolność do wykorzystywania prebiotyków szczepu ŁOCK 1094

25 Szczep ŁOCK 1094 jest zdolny do wzrostu w podłożu zawierającym jako jedyne źródło węgla prebiotyki, jak skrobia, β -glukan, maltodekstryna, inulina, pektyna, jednak wzrost jest zróżnicowany i zależy od rodzaju i stężenia sacharydu. Najlepszym źródłem węgla jest inulina i pektyna. Porównując natomiast wzrost szczepu ŁOCK 1094 w obecności prebiotyków i w obecności glukozy (próba odniesienia) 30 stwierdzono, że w przypadku wszystkich przebadanych prebiotyków wzrost był lepszy, co obrazuje wykres 1 na rysunku.

Również w wyniku fermentacji inuliny i pektyny szczep ŁOCK 1094 wytwarza najwyższe ilości kwasu mlekowego, przy najwyższym udziale kwasu L(+) mlekowego wynoszącym 87%. Oprócz kwasu mlekowego produktami fermentacji prebiotyków (skrobi, β -glukanu, maltodekstryny, inuliny i pektyny) są kwas octowy, kwas ma
5 słowy, aldehyd octowy i etanol.

Cechy probiotyczne szczepu ŁOCK 1094

Szczep ŁOCK 1094 spełnia kryteria stawiane bakteriom probiotycznym, co stwierdzono w wyniku badań *in vitro* wykonanych według procedur zalecanych przez
FAO/WHO.

10 Szczep ŁOCK 1094 wykazuje wysoką odporność na niskie pH (kwasowość soku żołądkowego) w zakresie pH od 2,0 do 3,0.

Szczep ŁOCK 1094 wykazuje również wysoką odporność na sole żółci w stężeniach 1% i 2% w czasie do 4 godzin.

15 Szczep ŁOCK 1094 wykazuje oporność w stosunku do antybiotyków najczęściej stosowanych u zwierząt hodowlanych, jak penicylina, kanamycyna, amoksycylina, doksycyklina, erytromycyna, tetracyklina.

Szczep ŁOCK 1094 wykazuje również oporność w stosunku do kokcydiostatyków, jak diclazuril, decoquinat, narazyna-nikrabazyn.

20 Nowy szczep wykazuje aktywność antagonistyczną w stosunku do patogenów jelitowych zwierząt i odpowiedzialnych za zoonozy ludzi, takich jak *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes*.

Szczep ŁOCK 1094 posiada niską aktywność fekalną. Spośród trzech enzymów: β -glukozydazy, β -glukuronidazy i ureazy aktywna jest tylko β -glukuronidaza.

25 Szczep ŁOCK 1094 wykazuje zdolności detoksyfikacyjne mykotoksyn, jak aflatoksyna B₁, ochratoksyna A, fumonizyna, toksyna T-2, zearalenon, deoksyniwalenol, które najczęściej mogą stanowić zanieczyszczenie zbóż i pasz dla zwierząt.

Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1094

30 Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1094 określono w trzech pożywkach fermentacyjnych (mieszkankach paszowych (P1, P2 i P3) o następującym składzie zmielonych ziaren: pasza P1 - 50% pszenicy, 30% jęczmienia i 20% kukurydzy, pasza P2 - 40% pszenicy, 30% jęczmienia, 20% kukurydzy i 10% żyta, pasza P3 - 40%

pszenicy, 30% jęczmienia, 20% kukurydzy i 10% soi. Kompozycję pożywek fermentacyjnych ustalono na bazie ziaren stosowanych w żywieniu zwierząt monogastycznych. Mieszanki paszowe roztworzono w wodzie w proporcjach: 1:1,0; 1:1,5; 1:2,0. Pożywki fermentacyjne zaszczepiono zawiesiną bakterii w ilości 10^6 jtk/ml. Dynamikę wzrostu w pożywkach fermentacyjnych (jtk/g paszy) oznaczono w 4, 8, 12, 16, 24 i 30 godzinie hodowli, a próbą odniesienia była hodowla w pożywce MRS (jtk/ml pożywki). Dynamikę wzrostu szczepu przedstawiono w postaci wykresu 2 na rysunku, zaś plon biomasy oraz produktywność hodowli w poniższej tabelicy.

Tablica.

Szczep	Plon komórek N [jtk/g; jtk/ml]			Produktywność P [jtk/kg×h; jtk/l×h]			Właściwa szybkość wzrostu μ [h ⁻¹]			Faza adaptacyjna [h]		
	Pożywka fermentacyjna											
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
<i>Lb. pentosus</i> ŁOCK 1094	6,33 $\times 10^8$	9,60 $\times 10^9$	9,48 $\times 10^8$	2,11 $\times 10^{10}$	3,20 $\times 10^{11}$	3,16 $\times 10^{10}$	0,16	0,23	0,18	7,27	4,55	2,81
Pożywka kontrolna MRS												
<i>Lb. pentosus</i> ŁOCK 1094	4,75 $\times 10^9$			1,58 $\times 10^{10}$			0,22			1,57		

Okazało się, że dynamika wzrostu oraz plon biomasy są uzależnione od składu pożywki fermentacyjnej i najwyższe wartości, w odniesieniu do podłoża kontrolnego MRS, otrzymuje się dla hodowli w pożywce fermentacyjnej P2. Plon komórek w tej pożywce wynosi $9,60 \times 10^9$ jtk/g, a produktywność szczepu wzrasta do poziomu $3,20 \times 10^{11}$ jtk/kg×h. Stwierdzono ponadto, że optymalną pożywką dla wzrostu szczepu ŁOCK 1094 jest pożywka o stosunku zmielonych ziaren (mąki) do wody 1:1,5. W tych warunkach bakteria osiąga najwyższy przyrost biomasy, również produktywność jest wyższa w porównaniu do proporcji mąki do wody 1:1,0 oraz 1:2,0. Szczep ŁOCK 1094 wykazuje także trwałość przechowalniczą w postaci liofilizatu w warunkach chłodniczych (4-5°C) oraz w temperaturze pokojowej (25°C) w trakcie 4 miesięcy przechowywania.

Szczep ŁOCK 1094 znajduje zastosowanie jako dodatek do pasz dla zwierząt monogastycznych w profilaktyce występowania chorób bakteryjnych i zatruc wywołanych mykotoksynami oraz poprawiający bezpieczeństwo chowu zwierząt.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

5 Przykład I.

Szczep ŁOCK 1094 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
10 - 15,0, o pH 5,5, w obecności CO₂ wprowadzonego w ilości 5% (v/v), w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych.

Po 48 godzinach hodowli wyhodowane komórki oddzielono od podłoża na wstrząsarce uzyskując gęstość $4,71 \times 10^9$ komórek/ml.

Przykład II.

15 Szczep ŁOCK 1094 hodowano w podłożu płynnym MRS (firmy Merck), o składzie w g/l: ekstrakt drożdżowy - 4,0, ekstrakt mięsny - 10,0, pepton z kazeiny - 10,0, D(+)glukoza - 20,0, Tween 80 - 1,0, wodorocytrynian amonu - 2,0, fosforan dwupotasowy - 2,0, octan sodu - 5,0, siarczan magnezu 7-wodny - 0,20, siarczan magnezu 4-wodny - 0,05, o pH 5,5, w obecności CO₂ wprowadzonego w ilości 5%
20 (v/v), w temperaturze 37°C w warunkach względnie beztlenowych.

Po 48 godzinach hodowli wyhodowane komórki oddzielono od podłoża na wstrząsarce uzyskując gęstość $4,75 \times 10^9$ komórek/ml.

Przykład III.

Bakterie otrzymane jak w przykładzie I umieszczono w środowisku o pH 2
25 i 3. W pH 3,0 przeżywalność komórek po 60 minutach wynosiła 97%, a po 240 minutach 94%. Natomiast w pH 2,0 po 60 minutach przeżyło 95% komórek, a po 240 minutach 90%.

Przykład IV.

Bakterie otrzymane jak w przykładzie I poddano działaniu żółci o stężeniach 1%

i 2% w czasie do 4 godzin. Po 4 godzinach inkubacji w obecności zólci o stężeniu 2% przeżywalność komórek wynosiła 91%, a przy stężeniu zólci 1% przeżyło 93% komórek bakterii.

Przykład V.

- 5 Liofilizat bakterii otrzymanych jak w przykładzie I przechowywano w temperaturze 4-5°C oraz w temperaturze pokojowej 25°C w ciągu 4 miesięcy. Temperatura chłodnicza zapewniła większą stabilność i trwałość. Przechowywanie szczepu ŁOCK 1094 przez 4 miesiące spowodowało obniżenie liczby żywych komórek o 7% dla temperatury chłodniczej i o 14% dla temperatury pokojowej.

Wykaz sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA szczepu bakterii *Lactobacillus pentosus* ŁOCK 1094, która określa jego przynależność gatunkową:

```
TCGACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGA-  
ACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACA-  
GATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTAT-  
CACTTTTGGATGGTCCCGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAAT-  
GATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA-  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCA-  
ACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCT-  
GAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC-  
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATT-  
GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAA-  
GAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTC-  
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAA-  
GGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGA-  
TACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTT-  
CAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACT-  
CAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGA-  
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGA-  
CATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT-  
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTT-  
GGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT-  
CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGA-  
ACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA-  
ACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAAT-  
ACGTTCCCGGGCCTTTGGAACCCCGCCCNCCACACCTGGAAAGTTTGGAAACCCCAA-  
GGCGGGGGGGAAACC
```

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

RZECZNIK PATENTOWY

mgr inż. Ewa Kaczur-Kaczyńska