

## Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus reuteri*

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus reuteri*, 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 są znane szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus reuteri*, jak *Lactobacillus reuteri* INLA 4, *Lactobacillus reuteri* ATCC55730, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus reuteri* M KKP 2048.

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii mlekowych z gatunku *Lactobacillus reuteri*, który oznaczono symbolem ŁOCK 1092 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/00123.

Szczep ŁOCK 1092 wyizolowano z treści jelitowej prosiąt. Szczep ŁOCK 1092 jest to Gram-dodatnia pałeczka, nieruchliwa, nie przetrwalnikująca. Jest szczepem o właściwościach probiotycznych, stanowiącym homolog bakterii z gatunku *Lactobacillus reuteri* o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA przedstawionej na końcu opisu.

W celu określenia przynależności gatunkowej nowego szczepu *Lactobacillus reuteri* ŁOCK 1092 zsekwencjonowano region DNA kodujący gen 16S rRNA o długości 1379 pz. Otrzymaną sekwencję nukleotydową genu 16S rRNA porównano za pomocą programu BLASTN 2.6.0+ z sekwencjami dostępnymi w bazie National Center of  
5 Biotechnology Information (NCBI) oraz programie DNA Baser v4.36.0. Na podstawie porównania sekwencji nukleotydowych genów 16S rRNA bakterii z gatunku *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 stwierdzono podobieństwo nowego szczepu bakterii do gatunku *Lactobacillus reuteri* z prawdopodobieństwem 99,71%.

Nowy szczep ŁOCK 1092 hoduje się na podłożu Rogosa stanowiącym wybiórcze  
10 medium przeznaczone do hodowli bakterii z rodzaju *Lactobacillus* sp., przejrzystym, o barwie żółto-brązowej, o składzie w g/l: pepton kazeinowy - 10,0, ekstrakt drożdżowy - 5,0, D(+)glukoza - 20,0, fosforan potasu - 6,0, cytrynian amonu - 2,0, Tween 80 - 1,0, octan sodu - 15,0, siarczan magnezu - 0,575, siarczan żelaza II - 0,034, siarczan manganu - 0,12, agar - 15,0, o pH 5-6, korzystnie 5,5, w temperaturze 15-45°C, korzystnie 37°C w czasie 48 godzin. W podłożu tym szczep rośnie  
15 w postaci biało-kremowych, okrągłych kolonii, o gładkiej powierzchni i regularnych brzegach, o średnicy około 1-2 mm.

Szczep ŁOCK 1091 hoduje się także na podłożu płynnym MRS, stanowiącym modyfikację podłoża Rogosa, o składzie w g/l: ekstrakt drożdżowy - 4,0, ekstrakt mięsny  
20 - 10,0, pepton z kazeiny - 10,0, D(+)glukoza - 20,0, Tween 80 - 1,0, wodorocytrynian amonu - 2,0, fosforan dwupotasowy - 2,0, octan sodu - 5,0, siarczan magnezu 7-wodny - 0,20, siarczan magnezu 4-wodny - 0,05, o pH 5-6, korzystnie 5,5, w temperaturze 15-45°C, korzystnie 37°C w czasie 48 godzin. W podłożu tym szczep rośnie tworząc jednorodne zmętnienie pożywki.

25 Do wzrostu szczep preferuje środowisko wzbogacone w 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Rośnie jednak zarówno w warunkach tlenowych, jak i względnie beztlenowych.

#### Cechy morfologiczne szczepu ŁOCK 1092

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

#### Cechy fizjologiczne i biochemiczne szczepu ŁOCK 1092

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

Badanie metabolizmu glukozy w warunkach tlenowych i beztlenowych na pożywce Hugh-Leifsona w wysokich słupach wykazało, że szczep ŁOCK 1092 jest zdolny do rozkładu glukozy zarówno w obecności tlenu, jak i w warunkach beztlenowych, czyli na drodze fermentacji.

- 5 Zgodnie z testem API 50 CHL szczep ŁOCK 1092 jest zdolny do fermentacji sacharydów i ich pochodnych, jak ryboza, ksyloza, galaktoza, glukoza, maltoza, laktoza, melibioza, sacharoza, rafinoza.

Szczep ŁOCK 1092 charakteryzuje się metabolizmem względnie heterofermentatywnym. Glukozę fermentuje z wytworzeniem kwasu mlekowego w ilości 10,79  
10  $\mu\text{mol/ml}$ , kwasu octowego ( $4,04 \mu\text{mol/ml}$ ), kwasu masłowego ( $0,47 \mu\text{mol/ml}$ ), aldehydu octowego ( $0,08 \mu\text{mol/ml}$ ) i etanolu ( $0,15 \mu\text{mol/ml}$ ).

Test API ZYM wykazał, iż szczep ŁOCK 1092 wykazuje aktywność następujących enzymów: fosfatazy alkalicznej, esterazy,  $\alpha$ -galaktozydazy,  $\beta$ -galaktozydazy,  $\alpha$ -glukozydazy,  $\beta$ -glukozydazy, kwaśnej fosfatazy, fosfoamidazy, aryamidazy leucyny,  
15 aryamidazy waliny, aryamidazy cystyny.

Ponadto stwierdzono, że szczep ŁOCK 1092 nie wytwarza siarkowodoru, ani amoniaku z argininy, nie wykazuje zdolności rozkładu  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### Zdolność do wykorzystywania prebiotyków szczepu ŁOCK 1092

Szczep ŁOCK 1092 jest zdolny do wzrostu w podłożu zawierającym jako jedyne  
20 źródło węgla prebiotyki, jak skrobia,  $\beta$ -glukan, maltodekstryna, inulina, pektyna, jednak wzrost jest zróżnicowany i zależy od rodzaju i stężenia sacharydu. Najlepszym źródłem węgla jest inulina w stężeniu 2%. Porównując natomiast wzrost szczepu ŁOCK 1092 w obecności prebiotyków ze wzrostem w obecności glukozy (próba odniesienia) stwierdzono, że w przypadku wszystkich przebadanych prebio-  
25 tyków wzrost jest lepszy, co obrazuje wykres 1 przedstawiony na rysunku.

Również w wyniku fermentacji inuliny szczep ŁOCK 1092 wytwarza najwyższe ilości kwasu mlekowego, przy najwyższym udziale kwasu L(+) mlekowego wynoszącym 88%. Oprócz kwasu mlekowego produktami fermentacji prebiotyków (skrobi,  $\beta$ -glukanu, maltodekstryny, inuliny i pektyny) są kwas octowy, kwas masłowy,  
30 aldehyd octowy i etanol.

### Cechy probiotyczne szczepu szczepu ŁOCK 1092

Szczep ŁOCK 1092 spełnia kryteria stawiane bakteriom probiotycznym, co stwierdzono w wyniku badań *in vitro* wykonanych według procedur zalecanych przez FAO/WHO.

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

Szczep ŁOCK 1092 wykazuje również wysoką odporność na sole żółci w stężeniach 1% i 2% w czasie do 4 godzin.

- 10 Szczep ŁOCK 1092 wykazuje oporność w stosunku do antybiotyków najczęściej stosowanych u zwierząt hodowlanych, jak penicylina, kanamycyna, amoksycylina, doksycyklina, erytromycyna, tetracyklina.

Szczep ten wykazuje również oporność w stosunku do kokecydiostatyków, takich jak diclazuril, decoquinat, narazyna-nikrabazyn.

- 15 Nadto 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 1092 posiada niewielką aktywność fekalną. Spośród trzech enzymów:  $\beta$ -glukozydazy,  $\beta$ -glukuronidazy i ureazy aktywna jest tylko  $\beta$ -glukozydaza.

- 20 Szczep wykazuje także zdolności detoksyfikacyjne mykotoksyn, jak aflatoksyny B<sub>1</sub>, ochratoksyny A, fumonizyny, toksyny T-2, zearalenonu, deoksyniwalenolu, które najczęściej mogą stanowić zanieczyszczenie zbóż i pasz dla zwierząt.

### Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1092

- 25 Cechy biotechnologiczne szczepu ŁOCK 1092 określono w trzech pożywkach fermentacyjnych (mieszkach 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 monogastrycznych.
- 30 Mieszanki paszowe roztworzono w wodzie w proporcjach: 1:1,0; 1:1,5; 1:2,0. Pożywki fermentacyjne zaszczepiono zawiesiną bakterii w ilości 10<sup>6</sup> 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 przedstawiono w postaci wykresu 2 na rysunku, zaś plon biomasy oraz produktywność hodowli w poniższej tablicy.

Tablica.

Szczep	Plon komórek N [jtk/g; jtk/ml]			Produktywność P [jtk/kg×h; jtk/l×h]			Właściwa szybkość wzrostu $\mu$ [h <sup>-1</sup> ]			Faza adaptacyjna [h]		
	Pożywka fermentacyjna											
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
<i>Lb. reuteri</i> ŁOCK 1092	1,10 ×10 <sup>9</sup>	3,13 ×10 <sup>10</sup>	4,96 ×10 <sup>8</sup>	3,65 ×10 <sup>10</sup>	1,04 ×10 <sup>12</sup>	1,65 ×10 <sup>10</sup>	0,15	0,16	0,21	8,42	5,80	4,18
Pożywka kontrolna MRS												
<i>Lb. reuteri</i> ŁOCK 1092	1,95×10 <sup>9</sup>			6,48×10 <sup>10</sup>			0,09			0,95		

- Okazało się, że dynamika wzrostu oraz plon biomasy są uzależnione od składu pożywki fermentacyjnej i najwyższe wartości, w odniesieniu do podłoża kontrolnego MRS, otrzymano dla hodowli w pożywce fermentacyjnej P2. Plon komórek w tej pożywce wynosił  $3,13 \times 10^{10}$  jtk/g, a produktywność szczepu wzrosła do poziomu  $1,04 \times 10^{12}$  jtk/kg×h. Stwierdzono ponadto, że optymalną pożywką dla wzrostu szczepu ŁOCK 1092 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 1092 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 1092 znajduje zastosowanie jako dodatek do pasz dla zwierząt monogastrycznych w profilaktyce występowania chorób bakteryjnych i zatruc wywołanych mykotoksynami oraz poprawiający bezpieczeństwo chowu zwierząt.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

Przykład I.

- Szczep ŁOCK 1092 hodowano w podłożu płynnym Rogosa (firmy Difco) o składzie w g/l: pepton kazeinowy - 10,0, ekstrakt drożdżowy - 5,0, D(+)glukoza - 20,0,

fosforan potasu – 6,0, cytrynian amonu – 2,0, Tween 80 – 1,0, octan sodu – 15,0, siarczan magnezu – 0,575, siarczan żelaza II – 0,034, siarczan manganu – 0,12, agar – 15,0, o pH 5,5, w obecności CO<sub>2</sub> wprowadzonego w ilości 5% (v/v), w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych.

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

Przykład II.

- Szczep ŁOCK 1092 hodowano w podłożu płynnym MRS (firmy Merck), o składzie w g/l: ekstrakt drożdżowy – 4,0, ekstrakt mięsny – 10,0, pepton z kazeiny –  
10 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 CO<sub>2</sub> wprowadzonego w ilości 5% (v/v), w temperaturze 37°C w warunkach względnie beztlenowych.

- Po 48 godzinach hodowli wyhodowane komórki oddzielono od podłoża na wstrząsarce uzyskując gęstość  $1,95 \times 10^9$  komórek/ml.

Przykład III.

- Bakterie otrzymane jak w przykładzie I umieszczono w środowisku o pH 2 i 3. W pH 3,0 przeżywalność komórek po 60 minutach wynosi 95%, a po 240 minutach 90%. Natomiast w pH 2,0 po 60 minutach przeżywa 93% komórek, a po 240  
20 minutach 88%.

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 2% żółci przeżywalność komórek wynosi 92%, a przy stężeniu żółci 1% przeżywa 98% komórek  
25 bakterii.

Przykład V.

- Liofilizat bakterii otrzymanych jak w przykładzie I przechowywano w temperaturze 4-5°C oraz w temperaturze pokojowej 25°C w ciągu 4 miesięcy. Temperatura chłodnicza zapewniła większą stabilność i trwałość. Przechowywanie szczepu ŁOCK  
30 1092 przez 4 miesiące spowodowało obniżenie liczby żywych komórek o 8% dla temperatury chłodniczej i o 15% dla temperatury pokojowej.

Wykaz sekwencji nukleotydu regionu DNA kodującego gen 16S rRNA szczepu bakterii *Lactobacillus reuteri* ŁOCK 1092, która określa jego przynależność gatunkową:

TGATTGTATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTA-  
ACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATA-  
ACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGAC-  
CTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTT-  
GAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAC TGAGACACGGTCCATACTCCTACGGGA-  
GGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAA-  
GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTT-  
CACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT-  
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTA-  
GGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTT-  
GAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAC TCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAA-  
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGA-  
AAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTA-  
GGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGCCGGAGCTAACGCAT-  
TAAGCACTCCGCC TGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT-  
GACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTAC-  
CAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTCCCTTCGGGGACGCAATGACA-  
GGTGGTGCATGGTTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA-  
ACGAGCGCAACCCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGT-  
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA-  
CACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAAT-  
CTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAAT-  
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC-  
CGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTA

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

RZECZNIK PATENTOWY

  
mgr inż. Ewa Kaczur-Kaczyńska