

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244159 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **428215**

(22) Data zgłoszenia: **2018.12.17**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2020.06.29 BUP 14/2020**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.12.11 WUP 50/2023**

(51) MKP:

C12N 1/04 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

ROBERT CZAJKOWSKI, Gdańsk, PL

DOROTA KRZYŻANOWSKA, Gdynia, PL

TOMASZ MACIĄG, Bydgoszcz, PL

SYLWIA JAFRA, Gdańsk, PL

JOANNA SIWIŃSKA, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Justyna Pawłowska-Bajerska,
Gdynia, PL**

(54) Tytuł:

Odczynnik do ochrony bakterii podczas liofilizacji i zastosowanie odczynnika do ochrony bakteryjnych szczepów probiotycznych podczas liofilizacji

PL 244159 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest odczynnik do ochrony mikroorganizmów – bakterii – podczas liofilizacji i jego zastosowanie, mający wykorzystanie w szczególności przy produkcji probiotyków.

Liofilizacja to proces polegający na odparowaniu rozpuszczalnika z zamrożonych substancji – suszenie sublimacyjne. Liofilizacja jest często stosowaną metodą do prezerwacji bakterii na potrzeby długotrwałego zachowania ich żywotności w komercyjnych preparatach probiotycznych, a także na cele ich przechowywania jako szczepów o zdefiniowanych cechach i właściwościach w kolekcjach mikroorganizmów.

Istotnym do rozwiązania problemem tego procesu jest ograniczenie spadku żywotności bakterii zarówno podczas wymrażania preparatu, jak i podczas zmian kształtu komórek bakteryjnych pod wpływem utraty wody. W kolekcjach mikroorganizmów, takich jak międzynarodowa kolekcja ATCC (American Type Culture Collection) z siedzibą w Stanach Zjednoczonych, do zabezpieczania komórek bakterii w procesie liofilizacji wykorzystywany jest odczynnik zawierający w ilości (na każde 100 mL objętości odczynnika): 0,75 g bulionu tryptonowo-sojowego (ang. trypticase soy broth, TSB), 10 g sacharozy, 5 g albuminy surowicy bydlęcej (serum bydlęcego) (ang. bovine serum albumine, BSA) opisywany dalej jako „Reagent 18”. Jest on skuteczny, jednak w jego składzie znajduje się kosztowna i pochodząca od zwierząt albumina surowicy bydlęcej (serum bydlęcego).

Z opisu patentowego EP2167639 znane jest wykorzystanie do pożywek bakteryjnych peptonu roślinnego, w tym peptonu pszenicznego. Pepton pszeniczny w opisywanym rozwiązaniu stanowi źródło białkowego azotu nieodzwierzęcego, nie stanowi zaś środka ochrony mikroorganizmów przed warunkami środowiska w tym w procesie liofilizacji.

Wynalazek dotyczy opracowania skutecznego środka ochrony mikroorganizmów zapewniającego wysoką przeżywalność bakterii w trakcie liofilizacji.

Odczynnik do ochrony mikroorganizmów podczas liofilizacji, charakteryzuje się według wynalazku tym, że zawiera bulion tryptonowo-sojowy (TSB), sacharozę oraz pepton pszeniczny. Istotą jest, że odczynnik zawiera od 0,5 do 1% wagowo/objętościowych (w/v) bulionu tryptonowo-sojowego (TSB), od 20 do 40% w/v sacharozy, medium oraz od 0,1 do 1,1% w/v pepton pszeniczny.

Korzystnie, zawiera od 0,1–0,5% wagowych peptonu pszenicznego.

Korzystnie, zawiera od 0,2–0,3% wagowych peptonu pszenicznego.

Korzystnie, medium stanowi woda.

Wynalazek dotyczy również zastosowania wyżej opisanego odczynnika do ochrony bakteryjnych szczepów probiotycznych podczas liofilizacji.

W odczynniku według wynalazku, opisywanego jako „Reagent PS”, zastosowano pepton pszeniczny w ilości od 0,1 do 1,1% w/v, zwłaszcza od 0,127 do 1,02% w/v. Opracowano również najkorzystniejszy zakres tego składnika. Dzięki takiej ilości odczynnik charakteryzuje wysoka skuteczność ochronna. Wykazano w tym zakresie pozytywny wpływ na przeżywalność mikroorganizmów. Wynalazek zapewnia obniżenie kosztu produkcji, a jednocześnie zapewnia wysoką skuteczność liofilizacji.

Wynalazek opisano w przykładach wykonania, a jego skuteczność przedstawiono dodatkowo na fig. 1 i fig. 2, przedstawiające wykresy typu ramka wąsy przeżywalności mikroorganizmów opisane bliżej w przykładzie 5.

Przykład 1

Sposób otrzymywania odczynnika

Odczynnik do liofilizacji (Reagent PS) o opracowanym składzie na każde 100 mL objętości odczynnika: 0,75 g TSB, 10 g sacharozy i 0,255 g peptonu pszenicznego jest przygotowywany przez rozpuszczenie w wodzie demineralizowanej wszystkich składników ww. i jałowieniu tak przygotowanego roztworu w temperaturze 121°C przy 0,7 Atm, przez 15 minut. Po jałowieniu i schłodzeniu do temperatury pokojowej odczynnik jest gotowy do użycia.

Przykład 2

Odczynnik otrzymano jak opisano w przykładzie 1, z tym że użyto 0,127 g peptonu.

Przykład 3

Odczynnik otrzymano jak opisano w przykładzie 1, z tym że użyto 0,510 g peptonu.

Przykład 4

Odczynnik otrzymano jak opisano w przykładzie 1, z tym że użyto 1,020 g peptonu.

Przykład 5

Badanie skuteczności odczynnika o różnym stężeniu peptonu.

Skuteczność odczynników otrzymanych jak opisano w powyższych przykładach 1–4 „Reagent PS” przetestowano poprzez porównanie przeżywalności 4 szczepów mikroorganizmów liofilizowanych z wykorzystaniem, jako krioprotektanta, odczynnika „Reagent PS”, odczynnika „Reagent 18”, rekomendowanego przez ATCC, oraz wody (kontrola, bez substancji ochronnej). Wersje odczynników oznaczono na podstawie stężenia peptonu pszenicznego PS4 (1,020 g / 100 ml); PS2 (0,510 g / 100 ml); PS1 (0,255 g / 100 ml); PS1/2 (0,127 g / 100 ml). Wśród szczepów znajdowały się bakterie o potencjale w biologicznej ochronie roślin przed patogenami takie jak: *Serratia plymuthica* A294, *Serratia rubidea* H440, *Pseudomonas fluorescens* CHAO, oraz szczep probiotyczny stosowany doustnie u ludzi *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Bakterie hodowano przez noc (16 h) w pożywkach płynnych. W przypadku bakterii probiotycznych była to pożywka De Man, Rogosa i Sharpe (MRS), w pozostałych przypadkach wykorzystano Bultion Tryptonowo-Sojowy (TSB). Hodowlę prowadzono w temperaturze 28 lub 37°C w zależności od wymagań wzrostowych poszczególnych szczepów. Bakterie osadzono przez wirowanie (6500 rcf, 5 min) i zawieszono w ww. odczynnikach do liofilizacji lub wodzie. Miano bakterii w zawiesinach przedliofilizacyjnych określono (w jednostkach tworzących kolonie na mililitr, jtk/mL) metodą seryjnych rozcieńczeń i ich wysiewania na odpowiednie podłoża wzrostowe zestawione agarem. Zawiesiny zamrożono przez noc w -80°C, a następnie liofilizowano w -50°C przez 24 h. Otrzymane liofilizaty rozpuszczono w jałowej wodzie destylowanej w objętości równej wyjściowej objętości zawiesiny i określono, z wykorzystaniem metody opisanej powyżej, liczbę żywych komórek w każdej z prób. Miano żywych komórek w liofilizatach porównano z początkowym mianem bakterii w zawiesinach przedliofilizacyjnych celem określenia odsetka przeżywających komórek. Dla testowanych 4 szczepów nie wykryto istotnych różnic w przeżywalności liofilizacji w odczynnikach przygotowanych według przykładu 1–4 oraz liofilizowanych w odczynniku R18. Przeżywalność była istotnie wyższa od przeżywalności liofilizacji w wodzie (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 15,341$, $df = 6$, $p = 0,01776$; różnice pomiędzy grupami sprawdzono za pomocą testu Dunna). Wyniki przeżywalności przedstawiono na fig. 1, gdzie porównano następujące próbki:

PS4 – liofilizacja w „Reagent PS” przygotowanym według przykładu 4,
PS2 – liofilizacja w „Reagent PS” przygotowanym według przykładu 3,
PS1 – liofilizacja w „Reagent PS” przygotowanym według przykładu 1,
PS 1/2 – liofilizacja w „Reagent PS” przygotowanym według przykładu 2,
R18 – liofilizacja w „Reagent 18”.
H2O – liofilizacja w wodzie.

Przeżywalność liofilizacji wybranych szczepów wyznaczono obliczając stosunek liczby jtk w liofilizacie do jtk wyjściowej zawiesiny bakterii. Przeżywalność liofilizacji w wodzie była istotnie niższa niż w odczynniku „Reagent 18” ($p = 0,00095$). Nie ma istotnych różnic w przeżywalności pomiędzy odczynnikiem „Reagent 18”, a odczynnikami „Reagent PS” w żadnej z testowanych wersji: PS4 (1,02 g peptonu / 100 mL), PS2 (0,510 g peptonu / 100 mL), PS1 (0,255 g peptonu / 100 mL), oraz PS1/2 (0,127 g peptonu / 100 mL). Na wykresie typu ramka wąsy ramkami oznaczono przestrzeń Q2–Q3, pogrubioną linią oznaczono medianę, wąsy oznaczają odchylenia standardowe, a kropki wartości odstające. Gwiazdkami oznaczono wyniki różniące się istotnie od odczynnika „Reagent 18” („*” $p < 0,05$). W przypadku niektórych szczepów przeżywalność nieznacznie przekraczała 100%, co wynika z błędu metody (konieczność pobrania próby z gęstej zawiesiny bakterii). Porównania wpływu odczynnika na przeżywalność dokonano na podstawie zgrupowanych wyników dla czterech badanych szczepów (*Serratia plymuthica* A294, *Serratia rubidea* H440, *Pseudomonas fluorescens* CHAO, *Lactobacillus rhamnosus* GG).

Badanie skuteczności odczynnika o stężeniu peptonu równym 0,255 g peptonu pszenicznego / 100 mL.

Skuteczność odczynnika otrzymanego jak opisano w przykładzie 1 „Reagent PS” przetestowano poprzez porównanie przeżywalności 16 szczepów mikroorganizmów liofilizowanych z wykorzystaniem, jako krioprotektanta, odczynnika „Reagent PS”, odczynnika „Reagent 18”, rekomendowanego przez ATCC, oraz wody (kontrola, bez substancji ochronnej). Wśród szczepów znajdowały się bakterie modelowe takie jak *Escherichia coli* DH5 α , szczepy o potencjale w biologicznej ochronie roślin przed patogenami takie jak *Serratia plymuthica* A294, *Enterobacter amnigenus* A167, *Rahnella aquatilis* H145, *Serratia rubidea* H440, *Serratia rubidea* H469, *Pseudomonas fluorescens* CHAO, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Ochrobactrum* sp. A44, *Bacillus subtilis* 168, *Pseudomonas donghuensis* P482 oraz szczepy probiotyczne stosowane doustnie u ludzi takie jak: *Saccharomyces boulardi*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus* 573.

Przeżywalność liofilizacji określono jak opisano w badaniu skuteczności odczynnika o różnym stężeniu peptonu.

Dla 13 z 16 testowanych szczepów skuteczność odczynnika PS i „Reagent 18” była zbliżona, tj. zapewniała od 38% do 100% przeżywalności dla „Reagent PS” i od 40% do 100% dla „Reagent 18”. Jednocześnie była to przeżywalność o 3,5 do 4 razy wyższa w stosunku do szczepów liofilizowanych w wodzie (kontrola) (Tabela 1). Dla dwóch z 16 szczepów: *Escherichia coli* DH5α i *Ochrobactrum* sp. A44, przeżywalność była wysoka w wodzie destylowanej i wynosiła 76% oraz 37% (Tabela 1). Liofilizacja tych bakterii najprawdopodobniej nie wymaga zastosowania odczynnika poprawiającego przeżywalność. Natomiast przeżywalność ostatniego z 16 szczepów, *Saccharomyces boulardi*, była niska nawet w przypadku zastosowania odczynników krioprezerwacyjnych –najwyższą przeżywalność uzyskano w wyniku zastosowania odczynnika „Reagent 18” i wynosiła ona tylko 2,38% (Tabela 1). W tym wypadku, aby uzyskać wyższą przeżywalność, należałoby prawdopodobnie zastosować odczynnik do liofilizacji o indywidualnie dobranym składzie.

W wielu przypadkach potwierdzono skuteczność ochronną środka według wynalazku.

Tabela 1. Przeżywalność procesu liofilizacji przez testowane szczepy bakteryjne przy zastosowaniu dwóch różnych odczynników krioprezerwacyjnych oraz wody (kontrola). Przeżywalność określono zgodnie ze wzorem: $\text{przeżywalność} = (\text{jtk/mL w liofilizatach} \times 100\% / \text{jtk/mL w zawiesinach przedliofilizacyjnych})$. Jeśli podano, informacja w nawiasie w rubryce „Szczep” dotyczy nazwy komercyjnego preparatu, z którego pochodził dany mikroorganizm.

Lp.	Szczep	Przeżywalność liofilizacji (%)		
		H ₂ O	Reagent PS	Reagent 18
1	<i>Serratia plymuthica</i> A294	8,14%	111,65%	61,23%
2	<i>Enterobacter amnigenus</i> A167	5,23%	50,16%	65,09%
3	<i>Rahnella aquatilis</i> H145	10,10%	57,00%	65,37%
4	<i>Serratia rubidaea</i> H440	9,34%	112,03%	58,06%
5	<i>Serratia rubidaea</i> H469	2,06%	61,44%	115,13%
6	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	1,18%	59,90%	55,21%
7	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	0,38%	61,86%	146,29%
8	<i>Ochrobactrum</i> sp. A44	37,43%	59,36%	88,96%
9	<i>Bacillus subtilis</i> 168	4,80%	75,49%	83,61%
10	<i>Pseudomonas donghuensis</i> P482	0,05%	37,92%	40,99%
11	<i>Escherichia coli</i> DH5α	76,06%	12,93%	16,28%
12	<i>Saccharomyces boulardi</i> (ENTEROL 250)	0,04%	0,95%	2,38%
13	<i>Bacillus coagulans</i> (Colinox)	4,49%	56,76%	44,80%
14	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (Dicoflor 50)	3,00%	111,25%	64,62%
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	5,00%	100,00%	72,22%
16	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 573 (Lactovaginal)	0,53%	110,71%	60,00%

W celu sprawdzenia czy istnieją istotne różnice w skuteczności odczynnika „Reagent 18” i nowo opracowanego odczynnika „Reagent PS”, porównano przeżywalność 16 szczepów liofilizowanych

w 2 różnych odczynnikach oraz w wodzie za pomocą testu statystycznego dla 3 prób niezależnych. Na podstawie wykonanych obliczeń stwierdzono, że przeżywalność liofilizacji w wodzie jest najniższa i różni się istotnie statystycznie (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 21,297$; $df = 2$, $p = 2,374e-05$) od przeżywalności w odczynniku „Reagent 18” (Dunn test $p = 0,00018$) jak i odczynniku „reagent PS” ($p = 0,00018$). Zgrupowane wyniki dla wszystkich 16 badanych szczepów przedstawiono na fig. 2.

Przeżywalność liofilizacji wybranych szczepów wyznaczono obliczając stosunek liczby jtk w liofilizacie do jtk wyjściowej zawiesiny bakterii. Przeżywalność liofilizacji w wodzie była istotnie niższa niż w odczynniku według wynalazku. Na tym etapie nie wykazano istotnych różnic w przeżywalności pomiędzy odczynnikiem „Reagent 18”, a odczynnikiem „Reagent PS”, co potwierdza istotną skuteczność środka według wynalazku, gdyż środek oznaczony jak „Reagent 18” jest uznawany za bardzo skuteczny. W wykresie typu ramka-wąsy pokazanym na fig. 2 oznaczono przestrzeń Q2–Q3, pogrubioną linią oznaczono medianę, wąsy oznaczają odchylenia standardowe, a kropki wartości odstające. Gwiazdkami oznaczono wyniki różniące się istotnie statystycznie (*** $p < 0,001$). Na wykresie H2O oznacza liofilizację w wodzie, a PS – liofilizację w „Reagent PS”, zaś R18 oznacza liofilizację w „Reagent 18”. W przypadku niektórych szczepów przeżywalność nieznacznie przekracza 100%, co wynika z błędu metody (konieczność pobrania próby z gęstej zawiesiny bakterii).

Zastrzeżenia patentowe

1. Odczynnik do ochrony bakterii podczas liofilizacji, **znamienny tym**, że zawiera od 0,5 do 1% wagowo/objętościowych (w/v) bulionu tryptonowo-sojowego (TSB), od 20 do 40% w/v sacharozy, medium oraz od 0,1 do 1,1% w/v pepton pszeniczny.
2. Odczynnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera od 0,1–0,5% wagowych peptonu pszenicznego.
3. Odczynnik według zastrz. 2, **znamienny tym**, że zawiera od 0,2–0,3% wagowych peptonu pszenicznego.
4. Odczynnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że medium stanowi woda.
5. Zastosowanie odczynnika scharakteryzowanego w którymkolwiek z zastrz. 1–4 do ochrony bakteryjnych szczepów probiotycznych podczas liofilizacji.

Rysunki

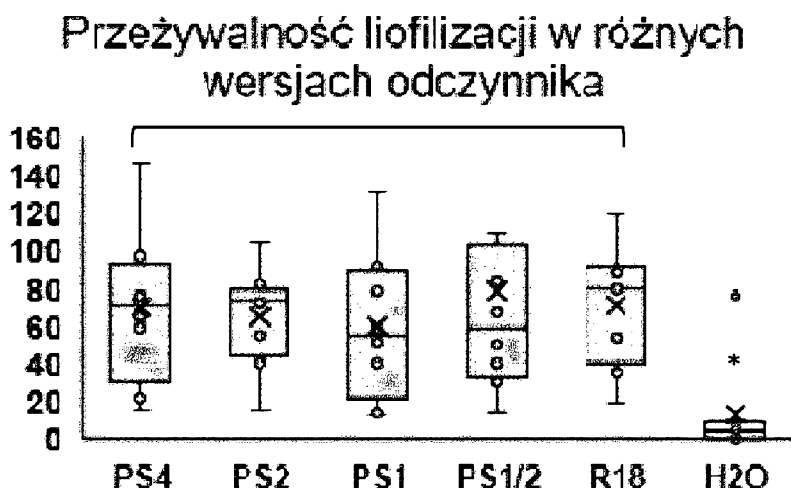


Fig. 1

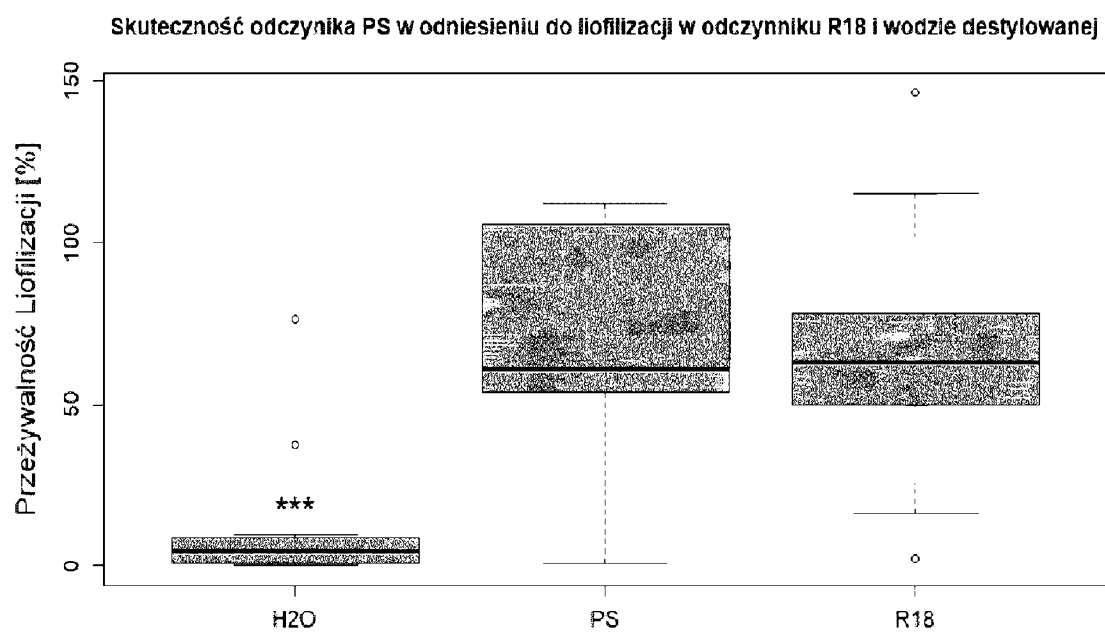


Fig. 2