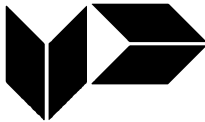


(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245526 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442281**

(22) Data zgłoszenia: **2022.09.14**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.03.18 BUP 12/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.08.19 WUP 34/2024**

(51) MKP:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

A23G 1/42 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**PROLAB SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ SPÓŁKA
KOMANDYTOWA, Kraków, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**PIOTR HECZKO, Kraków, PL
MAGDALENA STRUS, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Maciej Magoński, Kraków, PL

(54) Tytuł:

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 i jego zastosowanie

PL 245526 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep PL8 i jego zastosowanie do wytwarzania produktów spożywczych.

Jedną z najliczniejszych grup bakterii zasiedlających ludzki organizm są bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Szczególnie wśród nich wyróżniają się bakterie należące do gatunku *Lactobacillus plantarum*. Patogenne dla człowieka bakterie powodują szereg zakażeń przewodu pokarmowego. Standardowe leczenie zakażeń jest coraz trudniejsze ze względu na oporność na leki antybiotykowe. Poszukując alternatywnych form leczenia wspomagających antybiotykoterapię, rozważa się stosowanie preparatów zawierających bakterie probiotyczne, wśród których znaczącą rolę odgrywają bakterie z gatunku *Lactobacillus plantarum*. Istotny wpływ na zdrowie człowieka mają produkty spożywcze uzupełnione o bioaktywne składniki takie jak witaminy, minerały i probiotyki.

Znany jest z chińskiego opisu patentowego CN107058159A *Lactobacillus plantarum* JMCC0017 o dobrej przeżywalności w napoju mlecznym. *Lactobacillus plantarum* to probiotyk wyselekcjonowany z tradycyjnych fermentowanych produktów mlecznych w Xinjiang w Chinach. Szczep jest przechowywany we wspólnym centrum ochrony szczepów drobnoustrojów przy Chińskim Komitecie ds. Kolekcji Kultur pod numerem CGMCC NO.12323. *Lactobacillus plantarum* JMCC0017 charakteryzuje się odpornością na zmiany temperatury, posiada wysoką aktywność i słabą kwasowość, jest wolny od specjalnego smaku roślinnego i ma dobrą tolerancję na kwasy i sole żółciowe oraz odporność na utlenianie.

Znany jest z opisu patentowego WO202215248A1 sposób otrzymywania napoju na bazie herbaty zawierającego probiotyki korzystnie z gatunku *Lactobacillus plantarum*. Sposób polega na przygotowaniu mieszaniny naparu herbaty z cukrem, który zaszczebia się probiotykiem a następnie prowadzi się fermentację w temperaturze od 15 do 45 stopni C.

Znane są z opisu patentowego WO202202097A1 nowe szczepy probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* o działaniu immunomodulacyjnym, które używa się do wytwarzania kompozycji probiotycznej. Kompozycja probiotyczna zawiera korzystnie *Lactobacillus plantarum* RGM 2608 i jest użyteczna do leczenia patologii związanych z zaburzeniami układu odpornościowego i/lub żołądkowo-jelitowego.

Znany jest z polskiego opisu patentowego Pat.216950 „Wafłowy wyrób cukierniczy w postaci wafli przekładanych masą, o cechach funkcjonalnych” produkt spożywczy zawierający żywe szczepy bakterii *Lactobacillus casei* korzystnie w formie liofilizatu. Żywe szczepy bakterii wprowadza się do masy w czasie jej rozdrabniania w temperaturze nie powodującej inaktywacji bakterii mlekowych.

Znane są z opisu patentowego EP 1996696 „Termostabilny szczep *Lactobacillus*” szczepy z rodzaju *Lactobacillus* wybrane z gatunku *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus rhamnosus*. Wymienione szczepy zostały zdeponowane w niemieckiej kolekcji mikroorganizmów. Szczepy te są w stanie przetrwać temperatury powyżej 80 stopni C przez ponad 25 minut. Szczepy zostały zastosowane do wytwarzania produktów spożywczych.

Znany jest z opisu patentowego US Patent 10058577 produkt spożywczy zawierający zdeponowany szczep *Lactobacillus plantarum* zachowujący żywotność w temperaturach od 25 do 250 stopni C. Szczep bakterii w postaci wysuszonego proszku, kapsułki lub pastylki jest mieszany lub łączony ze składnikiem spożywczym podczas przygotowania produktu spożywczego.

Celem wynalazku było wyselekcjonowanie z kolekcji szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* nowego szczepu, który oprócz cech charakterystycznych dla tego gatunku będzie skuteczny wobec patogennych bakterii.

Istotą wynalazku jest szczep *Lactobacillus plantarum* oznaczony symbolem PL8 zdeponowany, zgodnie z traktatem budapeszteńskim o międzynarodowym uznawaniu depozytu drobnoustrojów dla celów postępowania patentowego, w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu w dniu 03 lutego 2022 roku pod numerem B/00372 posiadający sekwencję genomową przedstawioną w załączniku nr 1.

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/000372 ma geny *trxB*, *trxD*, *mrsB*, *purK* kodujące właściwości antyoksydacyjne zgodnie z analizą sekwencji genomowej przedstawionej w załączniku nr 2.

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 ma geny *hisE*, *hisD* odpowiedzialne za wiązanie metali zgodnie z analizą sekwencji genomowej przedstawionej w załączniku nr 2.

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 ma geny *eno*, *ppl* umożliwiające wiązanie do powierzchni komórek zgodnie z analizą sekwencji genomowej przedstawionej w załączniku nr 2.

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 ma geny *ruvA*, *ruvB*, *uvrC*, *lexA*, *clpC*, *clpB_1*, *clpB_2*, *grpE* odpowiedzialne za odporność na stres w tym wysoką temperaturę zgodnie z analizą sekwencji genomowej przedstawionej w zał. nr 2.

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 ma geny kodujące syntezę witamin: ryboflawiny (*ribD_1*, *ribD_2*, *ribE*, *ribF_1*, *ribF_2*, *ribT*), pirodyksyny (*serC*), tiaminy (*thiM*, *thiD*, *thil*) oraz karotenoidów i kwasu foliowego (*folB*, *folK*, *folP*) zgodnie z analizą sekwencji genomowej przedstawionej w załączniku nr 2.

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 do zastosowania do wytwarzania środków spożywczych, których proces technologiczny odbywa się w temperaturze do 45 stopni Celsjusza.

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 do zastosowania w produktach spożywczych takich jak wyroby czekoladowe.

Pochodzenie szczepu

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 został wyizolowany z przewodu pokarmowego zdrowego dziecka. Materiał po pobraniu został w Laboratorium Mikrobiologicznym firmy Prolab opracowany a wyizolowane szczepy bakterii scharakteryzowane w oparciu o metody genotypowe oraz fenotypowi. Jednym z uzyskanych na tej drodze szczepów był szczep *Lactobacillus plantarum* PL8.

Niniejszy wynalazek przedstawiono na rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia wynik testu API 50 CH dla szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8.

Fig. 2 przedstawia zdjęcie produktów reakcji PCR w kierunku *Lactobacillus plantarum*; ścieżki: 1 (*L. plantarum* PL8); 2 (kontrola negatywna – ultraczysta woda); 3 (kontrola pozytywna – *L. plantarum* ATCC 8014); M (marker wielkości).

Fig. 3 przedstawia oporność szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 na sole żółci w stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 g/l.

Fig. 4 przedstawia wykazanie, za pomocą metody słupkowej, antagonistycznego działania szczepu *L. plantarum* PL8 na wzrost czynników etiologicznych powodujących próchnicę oraz zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego.

Fig. 5. przedstawia adherencję szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8, do ludzkiej linii nabłonka jelitowego Caco-2.

Fig. 6 przedstawia porównanie przeżywalności szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 w podłożach przemysłowych.

Fig. 7 przedstawia porównanie wartości pH hodowli szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 w różnych podłożach przemysłowych.

I. Fenotypowa identyfikacja szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 z wykorzystaniem zestawu API@50 CH firmy bioMerieux

Identyfikację fenotypową przeprowadzono za pomocą zestawu API 50 CH zgodnie z zaleceniami producenta. Jest to wystandaryzowany zestaw zawierający 50 testów biochemicznych do badania sposobu metabolizmu węglowodanów przez drobnoustroje. API 50 CH firmy bioMerieux wykorzystuje się do identyfikacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus* spp. i rodzajów spokrewnionych w połączeniu z API 50 CHL Medium (bioMerieux; USA).

Wynik testu API 50 CH dla badanego szczepu z rodzaju *Lactobacillus* spp. przedstawia Tab. 1 i Fig. 1.

Tab. 1. Wynik testu API 50 CH dla szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8.

| Probówka | TEST | Wynik |
|----------|-----------------------------------|------------|
| | | Szczep PL8 |
| 0 | KONTROLA | - |
| 1 | Glicerol | - |
| 2 | Erytrol | - |
| 3 | D-arabinoza | - |
| 4 | L-arabinoza | - |
| 5 | D-ryboza | + |
| 6 | D-ksyloza | - |
| 7 | L-ksyloza | - |
| 8 | D-adonitol | - |
| 9 | Metylo- β D-ksylopiranozyd | - |
| 10 | D-galaktoza | + |
| 11 | D-glukoza | + |
| 12 | D-fruktoza | + |
| 13 | D-mannoza | + |
| 14 | L-sorboza | - |
| 15 | L-ramnoza | - |
| 16 | Dulcytol | - |
| 17 | Inozytol | - |
| 18 | D-mannitol | + |
| 19 | D-sorbitol | + |
| 20 | Metylo- α D-mannopiranozyd | - |
| 21 | Metylo- α D-glukopiranozyd | - |
| 22 | N-acetylo-glukozamina | + |
| 23 | Amigdalina | + |
| 24 | Arbutyna | + |
| 25 | Eskulina | + |
| | Cytrynian żelaza | |
| 26 | Salicyna | + |
| 27 | D-celobioza | + |
| 28 | D-maltoza | + |
| 29 | D-laktoza (wołowa) | + |
| 30 | D-melibioza | + |
| 31 | D-sacharoza | + |
| 32 | D-trehaloza | + |
| 33 | Inulina | - |
| 34 | D-melezytoza | - |
| 35 | D-rafinoza | + |
| 36 | Skrobia | - |
| 37 | Glikogen | - |
| 38 | Ksylitol | - |
| 39 | Genejobioza | + |
| 40 | D-turanoza | + |
| 41 | D-liksoza | - |
| 42 | D-tagatoza | - |
| 43 | D-fukoza | - |
| 44 | L-fukoza | - |
| 45 | D-arabitol | - |
| 46 | L-arabitol | - |
| 47 | Glukonian potasu | - |
| 48 | 2-ketoglukonian potasu | - |
| 49 | 5-ketoglukonian potasu | - |

Na podstawie otrzymanego profilu biochemicznego program apiWeb zidentyfikował szczep PL8 jako *Lactobacillus plantarum* (% ID=98,7 – dobra identyfikacja).

II. Identyfikacja szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 z wykorzystaniem metody PCR (ang. Polymerase Chain Reaction)

II. 1. Izolacja genomowego DNA bakterii:

Do izolacji genomowego DNA zastosowano zestaw DNA GeneMATRIX Basic DNA Purification Kit (EURx) wykorzystujący zdolność wiązania się DNA do ziół krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Procedura izolacji DNA przebiegała w następujący sposób:

1. 24-godzinną hodowlę komórek bakteryjnych prowadzoną w płynnym podłożu MRS (Oxoid) odwirowywano w objętości 1 ml (2 min., 12 000 rpm).
2. Supernatant usuwano, a osad dokładnie zawieszano w 250 µl buforu do zawieszania Cell R (w zestawie) z dodatkiem 200 µl niebieskiego buforu lizującego Lysis Blue (w zestawie), aż do uzyskania jednolitej, niebieskiej zawiesiny.
3. Do zawiesiny komórek dodawano 350 µl buforu neutralizującego Neutral B (w zestawie). Dokładnie i powoli mieszano zawartość probówek przez kilkukrotne odwracanie, aż do całkowitego zaniku niebieskiej barwy zawiesiny.
4. Po zakończeniu lizy mieszaninę odwirowywano (7 min., 12 000 rpm), a przesącz nakładano na minikolumnę ze specjalnym złożem krzemionkowym i ponownie wirowano (1 min., 12 000 rpm).
5. Złoże dwukrotnie przepłukiwano: najpierw 500 µl buforu płuczącego Wash UX1, a następnie 650 µL buforu płuczącego Wash UX2 (w zestawie).
6. Oczyszczone DNA eluowano ze złoża za pomocą 50 µl buforu Elution (w zestawie), ogrzanego do temperatury 80°C.
7. Wyizolowane DNA przechowywano w probówce typu Eppendorf w temperaturze 4°C do czasu dalszych analiz.

II. 2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR):

W Tabeli 2 przedstawiono sekwencje użytych starterów oraz wielkość poszczególnych amplikonów.

Tab. 2. Sekwencje starterów i wielkość amplikonów poszukiwanego gatunku bakterii.

| Starter | Sekwencja 5'→3' | Gatunek | Wielkość amplikonu |
|---------|-----------------------------|-------------|--------------------|
| Lfpr | GCC GCC TAA GGT GGG ACA GAT | L.plantarum | 283 pz |
| PlanII | TTA CCT AAC GGT AAA TGC GA | | |

Program amplifikacji dla gatunki *Lactobacillus plantarum* prowadzony był w termocyklerze S 1000 (BioRad) i przedstawiał się następująco:

- | | | |
|-----------|--------|-------|
| 1. 92°C - | 2 min | } 30x |
| 2. 95°C - | 30 sek | |
| 3. 55°C - | 30 sek | |
| 4. 72°C - | 30 sek | |
| 5. 72°C - | 1 min | |

Amplifikację prowadzono zgodnie z metodą Walter i wsp. (Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatossava T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Appl Environ Microbiol. 2000;66(1):297–303). Z publikacji tej pochodzą również użyte sekwencje starterów.

Po skończonej reakcji PCR produkty amplifikacji były analizowane w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Próbki nakładano do kieszonek żelu w objętości 7 µl z dodatkiem 3 µl buforu obciążającego. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE o stężeniu 0,5x, przez 1,5 godziny, pod napięciem 80V, w aparacie do elektroforezy (BioRad).

Obraz żelu oglądano przy użyciu systemu GelDoc XR + (BioRad), w skład którego wchodził transiluminator UV, kamera zbierająca obraz oraz program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu Image Lab (BioRad).

Obecność produktu PCR o odpowiedniej ilości par zasad uznawany była za pozytywny wynik reakcji. Na każdym żelu umieszczano ponadto kontrolę negatywną, którą stanowiła woda destylowana dodawana do buforu reakcyjnego zamiast genomowego DNA bakterii oraz kontrolę pozytywną, jaką był produkt amplifikacji otrzymany z użyciem DNA szczepu wzorcowego oraz marker wielkości prążków (GeneRuler 100bp, Axygen).

III. Identyfikacja szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 z wykorzystaniem sekwencjonowania 16S rRNA.

Materiał badawczy stanowiła próbka DNA, którą oceniono pod kątem jakościowym z wykorzystaniem analizy spektrofotometrycznej. Następnie przeprowadzono reakcję PCR w obecności literaturowych oligonukleotydów uniwersalnych, umożliwiających identyfikację gatunkową szczepu bakterii. Amplikony DNA uzyskane w reakcji PCR rozdzielono za pomocą elektroforezy agarozowej w obecności barwników oraz wzorca wielkości DNA. Wyniki wizualizowano za pomocą archiwizatora. Amplikony poddano sekwencjonowaniu DNA, uzyskane sekwencje przeanalizowano in silico z wykorzystaniem narzędzi NCBI Blast. Poprawność odczytanych sekwencji zweryfikowano na podstawie inspekcji wizualnej oraz analizy zasobów bazy danych NCBI Genbank.

Tab.3. Tabelaryczne zestawienie sekwencji DNA uzyskanych dla badanego szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 z użyciem literaturowych oligonukleotydów, umożliwiających identyfikację gatunkową szczepu bakterii.

| Nazwa szczepu | PL8 |
|--------------------------------|--|
| Sekwencja DNA 5'-3' startery 1 | TTAGGCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTT GGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGT ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATC CGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTG CAGCCTACAATCCGAAGTGAAGAATGGCTTTAAGAGATT AGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCA TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT GATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCG GCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACT GATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACC TGTATCCATGTCCCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGA TTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT AGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGG GCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGT ACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCA CTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTCATCG TTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGT ACCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG ACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTAC GCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTC TGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGT TGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCC |

| | |
|---|--|
| | <p>TGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTG CCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGC CGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGT TACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACG AGCCGAAACCCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCAT CAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC TCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTG GCCGATTACCTCTCAGGTCCGCTACGTATCATTGCCAT GGTGAGCCGTTACCYCACCATCTAGCTAATACGCCGCG GGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAR CTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCA TCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTT CCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGT AAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTT C</p> |
| <p>Sekwencja DNA 5'-3' startery 2</p> | <p>GGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA GAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAG AACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATT TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATG TGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAA ACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGA ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGA AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGG ATTAGAT A</p> |

Na podstawie otrzymanych sekwencji DNA oraz analizy zasobów bazy danych NCBI Genbank zidentyfikowano szczep PL8 jako *Lactobacillus plantarum*.

Fig. 2 przedstawia zdjęcie produktów reakcji PCR w kierunku *Lactobacillus plantarum*; ścieżki: 1 (*L. plantarum* PL8); 2 (kontrola negatywna – ultraczysta woda); 3 (kontrola pozytywna – *L. plantarum* ATCC 8014); M (marker wielkości).

IV. Identyfikacja szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 przy użyciu spektrometrii masowej (MALDI-TOF MS)

Identyfikacja mikroorganizmów metodą MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu odbywa się dzięki unikalnemu profilowi białkowemu drobnoustrojów. 48-godzinna hodowlę szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 na podłożu MRS Agar (Oxoid) poddano analizie przy użyciu spektrometru MALDI Biotyper firmy Bruker. Uzyskane widmo białkowe przekształcono w listę pików, a następnie z wykorzystaniem algorytmu biostatystycznego listę pików porównywano z referencyjnymi listami pików dla organizmów znajdujących się w bazie danych z biblioteką wzorców. W kolejnym kroku wygenerowano logarytm uzyskanego wyniku ($\log(\text{score})$) mieszczący się w przedziale 0,00–3,00. Im większy logarytm uzyskanego wyniku ($\log(\text{score})$), tym większy stopień podobieństwa pomiędzy wzorcem nieznaną listą pików, a listą pików znajdującą się w bazie danych z biblioteką wzorców. Uzyskany wynik dla szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 przedstawia Tabela 4.

Tab.4. Wynik analizy przeprowadzonej metodą MALDI-TOF MS dla szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8.

| Nazwa szczepu | Identyfikacja | Wskaźnik identyfikacji |
|---------------|--------------------------------|------------------------|
| PL8 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 2.21 |

Interpretacja wartości wskaźnika identyfikacji wg systemu MALDI Biotyper firmy Bruker:

| Zakres | Opis |
|-------------|---|
| ≥ 2,00 | Identyfikacja z wysoką pewnością (High-confidence identification) |
| 1,70 – 1,99 | Identyfikacja z niską pewnością (Low-confidence identification) |
| 0,00 – 1,69 | Brak możliwości identyfikacji (No organism identification possible) |

V. Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8.

W celu zbadania lekooporności szczepu *L. plantarum* PL8 metodą dyfuzyjno-krążkową, zawieszinę hodowli (OD= 0,5 w skali McFarlanda) rozprowadzono na podłożu agarowym MRS (Oxoid) na płytce Petriego. Następnie podłoże z naniesioną zawiesziną pozostawiono w temperaturze pokojowej na 15 minut w celu jej wysuszenia. Po tym czasie na płytkę наносono za pomocą jałowej pęsety krążki nasączone odpowiednimi antybiotykami. Inkubację prowadzono w warunkach beztlenowych, przez 48 h w temp. 37°C. Po inkubacji zmierzono strefy zahamowanego wzrostu szczepu bakteryjnego wokół krążka z antybiotykiem (w mm). Odczytu lekooporności różnicującego szczep *L. plantarum* PL8 na wrażliwy i oporny, dokonano zgodnie z aktualną wersją EUCAST. W doświadczeniu wykorzystano następujące antybiotyki: penicylina, ciprofloksacyna, doksacyklina, oksacylina, kotrymoksazol, erytromycyna, ampicylina, klindamycyna, wankomycyna, gentamycyna, metronidazol (Oxoid).

Tab. 5. Wielkość stref zahamowania wzrostu otrzymanych dla badanego szczepu *L. plantarum* PL8 oraz szczepu wzorcowego *L. plantarum* ATCC 8014.

| Antybiotyk Stężenie | <i>L. plantarum</i> PL8 | <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Penicylina (P) 1 µg | 23 mm | 19 mm |
| Ciprofloksacyna (CIP) 5 µg | 20 mm | 15 mm |
| Doksacyklina (DO) 30 µg | 25 mm | 23 mm |
| Oksacylina (OX) 1 µg | 10 mm | 10 mm |
| Kotrymoksazol (SXT) 25 µg | 23 mm | 23 mm |
| Erytromycyna (E) 15 µg | 26 mm | 26 mm |
| Ampicylina (AMP) 2 µg | 24 mm | 25 mm |
| Klindamycyna (DA) 2 µg | 20 mm | 28 mm |
| Gentamycyna (CN) 30 µg | 25 mm | 25 mm |
| Wankomycyna (VA) 30 µg | 6 mm | 6 mm |
| Metronidazol (MTZ) 5 µg | 6 mm | 6 mm |

VI. Oznaczenie oporności szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 na sztuczny sok żołądkowy.

Celem badania było oznaczenie przeżywalności w sztucznym soku żołądkowym nowego szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8. W celu oznaczenia stopnia oporności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* spp. na pH soku żołądkowego posłużono się metodą Clarka, którą zmodyfikowano w ten sposób, iż zamiast stężonego kwasu solnego zastosowano sztuczny sok żołądkowy o pH równym 1.2 według następującego przepisu: 2.0 g NaCl, 3.2 g pepsyny w 7 ml 36% HCl o pH 1.2 rozpuszczono w 1000 ml wody destylowanej. Jałowy (po przesączeniu) sztuczny sok żołądkowy rozlewano po 1 ml do jałowych probówek, a następnie do każdej z nich kolejno dodawano po 100 µl świeżej (24-godzinnej) hodowli szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 o znanej gęstości. Mieszaninę inkubowano przez 30 min. w 37°C w warunkach ściśle beztlenowych. Po upływie wyznaczonego czasu mieszaninę starannie mieszano i wykonywano posiew dziesiętny w celu określenia otrzymanej gęstości końcowej.

Tab. 6. Przeżywalność szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 w sztucznym soku żołądkowym.

| Nazwa szczepu | Gęstość bakterii probiotycznych podana w j.t.k./ml | |
|------------------------------------|--|---|
| | Czas wyjściowy | Po 30 min. inkubacji w sztucznym soku żołądkowym o pH 1.2 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> PL8 | $3,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^6$ |

VII. Oznaczenie oporności szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 na sole żółci.

Celem badania było oznaczenie oporności na sole żółci nowego szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8. Oporność na sole żółci wyznaczono w oparciu o metodę Dashkevicz'a i Feighner'a (Dashkevicz M.P, Feighner S.D. 1989. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. Applied and Environmental Microbiology. 55(1), 1–16). Metoda ta polegała na dodaniu do agaru MRS lub BL barwnika wskaźnikowego – purpury bromokrezolowej (POCH) w ilości 0,17 g/l oraz soli żółci (OXGAL, Difco), w pięciu kolejnych stężeniach: 1 g/l, 2 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l. Na tak przygotowane stałe podłoża posiewano metodą redukcyjną po 100 µl hodowli szczepu *L. plantarum* PL8, który następnie inkubowano w standardowych warunkach beztlenowych przez 48 godz. Po zakończonej inkubacji kolonie szczepów opornych na dane stężenie soli żółci nabierały koloru jasnożółtego, jak również podłoża wzrostowe zmieniały swoje zabarwienie z fioletowego na żółte. Intensywność wzrostu badanego szczepu i zabarwienia podłoża na kolor żółty oceniono w skali półilościowej od - do +++.

Tab. 7. Oporność szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 na sole żółci w stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 µl.

| Stężenie soli żółci | <i>L. plantarum</i> PL8 |
|---------------------|-------------------------|
| 1 g/l | +++ |
| 2 g/l | +++ |
| 5 g/l | +++ |
| 10 g/l | +++ |
| 20 g/l | ++ |

Fig. 3 przedstawia oporność szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 na sole żółci w stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 g/l.

VIII. Antagonistyczne działanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 wobec bakteryjnych czynników etiologicznych próchnicy oraz zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego z wykorzystaniem metody półilościowej. Antagonizm szczepów probiotycznych wobec innych

bakterii chorobotwórczych jest jednym z dokładniej poznanych i udowodnionych mechanizmów działania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. w przewodzie pokarmowym. Polega on na eliminacji drobnoustrojów chorobotwórczych dzięki wytwarzanym metabolitom, takim jak: kwas mlekowy i octowy pochodzących głównie z fermentacji węglowodanów, syntezie swoistych związków antibakteryjnych czyli substancji podobnych do bakteriocyn: lantibiotyków, laktocyny czy acidofiliny. Substancje podobne do bakteriocyn lub bardziej precyzyjnie lantibiotyki są aktywnymi biologicznie, peptydowymi substancjami działającymi bakteriobójczo na blisko spokrewnione drobnoustroje. Mechanizm ich działania polega na wytworzeniu por w ścianie komórek wrażliwych bakterii, przez które wypływają niskocząsteczkowe substancje, takie jak jony i elektrolity zawarte w cytoplazmie, co w konsekwencji prowadzi do zniszczenia komórki. Szczepy wytwarzające bakteriocyny mają jednocześnie geny zabezpieczające je przed samounicestwieniem.

Metoda półilościowa (słupkowa):

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 posiewano na stałe podłoże MRS Agar (Oxoid). Hodowlę przeprowadzano w warunkach ściśle beztlenowych przez 48 godzin w temp. 37°C. Po uzyskaniu wzrostu, wycinano w podłożu MRS Agar słupki o średnicy 9 mm, które nakładano następnie na płytki zawierające odpowiednie podłoże stałe z naniesionymi uprzednio za pomocą wymazówek zawiesinami szczepów wzorcowych o gęstości OD= 0,5 w skali McFarlanda (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* PCM 2502, *Campylobacter jejuni* PCM 2627). Następnie płytki umieszczano na cztery godziny w lodówce w temp. 4°C, a po upływie tego czasu dalej inkubowano je w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych przez 18 godzin. Po inkubacji mierzono średnice stref zahamowania wzrostu szczepów wskaźnikowych podając wynik w mm.

Tab. 8. Antagonistyczne działanie badanego szczepu wobec wybranych czynników etiologicznych powodujących próchnicę oraz zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego w oparciu o metodę półilościową tzw. Metodę słupkową – strefa zahamowania podana w mm.

| Szczep bakterii | Stopień zahamowania wzrostu czynników etiologicznych pod wpływem działania szczepu probiotycznego [mm] | | | | |
|-------------------------|--|--|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | <i>Streptococcus mutans</i> PCM 2502 | <i>Campylobacter jejuni</i> PCM 2627 |
| <i>L. plantarum</i> PL8 | 22 | 17 | 14 | 14 | 22 |

Fig. 4 przedstawia wykazanie, za pomocą metody słupkowej, antagonistycznego działania szczepu *L. plantarum* PL8 na wzrost czynników etiologicznych powodujących próchnicę oraz zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego.

IX. Oznaczenie właściwości adhezyjnych szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 do ludzkiej linii tkankowej Caco-2.

Adherencja (adhezja, przyleganie) bakterii do komórek ustroju gospodarza stanowi jeden z ważniejszych elementów opisu aktywności powierzchniowej bakterii. Uważana jest za niezbędny, pierwszy etap kolonizacji błon śluzowych, dotyczący zarówno bakterii patogennych, jak i tych stanowiących normalną florę ludzkiego organizmu. Różnego rodzaju procesy technologiczne odbywające się w poszczególnych etapach wytwarzania gotowego produktu mogą wpłynąć na właściwości probiotyczne poszczególnych szczepów będących substancją czynną przyszłego produktu probiotycznego. W celu sprawdzenia, czy szczep probiotyczny *L. plantarum* PL8 posiada pożądane cechy (w tym zdolność do adhezji) wykonano badania właściwości adhezyjnych do ludzkiej linii tkankowej nabłonka jelitowego Caco-2.

W celu zbadania adhezji szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 do tkanki nabłonkowej jelita (Caco-2) prowadzono hodowlę tkanki w atmosferze zawierającej 10% CO₂ oraz w temperaturze 37°C,

w podłożu hodowlanym DMEM (Gibco) z dodatkiem 10% surowicy wołowej (FBS; Sigma-Aldrich). Czas hodowli wyniósł 15 dni. Płyny hodowlane wymieniano regularnie co 48 godzin. Po osiągnięciu zlewnego wzrostu, czyli tzw. „monolayeru”, komórki pasażowano stosując 0,25% Trypsynę (Sigma-Aldrich), a następnie przesiewano je na płytki 24-dołkowe (TPP) doprowadzając do gęstości 5×10^5 na dołek. Hodowlę tkankową linii Caco-2 prowadzono dalej na powierzchni jałowych szkiełek podstawowych umieszczonych na dnie 24-dołkowych płytek przez kolejne 3 dni do osiągnięcia na powierzchni szkiełek podstawowych zlewnego wzrostu. Następnie komórki przepłukiwano PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (Sigma-Aldrich) i dodawano do kolejnych dołków po 100 μl odpowiednio przygotowanego szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8. Szczep *L. plantarum* PL8 hodowano w 10 ml płynnego podłoża MRS (Oxoid) przez 24 godziny w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu, sprawdzano gęstość hodowli za pomocą rozcieńczeń dziesiętnych. Szczep *L. plantarum* PL8 hodowano w 10 ml płynnego podłoża MRS Broth (Oxoid) przez 24 godziny w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu, sprawdzano gęstość hodowli za pomocą rozcieńczeń dziesiętnych. Do każdego dołka zawierającego wyhodowaną tkankę dodawano po 100 μl płynnej hodowli bakterii probiotycznych i uzupełniano 900 μl świeżego podłoża DMEM. Końcowa gęstość populacji badanej bakterii wynosiła w 1 ml około 1×10^8 j.t.k. Następnie komórki linii tkankowych wraz z badanym szczepem inkubowano w temp. 37°C w atmosferze o zwiększonej wilgotności i przy 10% zawartości CO_2 przez okres 2 godzin. Po tym czasie komórki przepłukiwano PBS w celu usunięcia nie przywartych bakterii, a następnie całość utrwalano 3,7% paraformaldehydem w temperaturze 4°C przez okres 3 godzin. Następnie szkiełka płukano PBS i przeprowadzono ich barwienie metodą Grama. Preparat był oceniany w mikroskopie świetlnym pod powiększeniem 1000x. Komórki badanego szczepu *L. plantarum* PL8, które zaadherowały do linii tkankowej były zliczane w 5 polach widzenia preparatu, a następnie wyliczono wynik średni, któremu przyporządkowano odpowiedni stopień adherencji zgodnie z zakresem podanym w literaturze (Tuomola E.M., Salminen S.J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int J Food Microbiol.* 41, 45–51):

- +++ bardzo wysoki stopień adherencji (powyżej 80 komórek bakteryjnych w polu widzenia)
- ++ wysoki stopień adherencji (od 60 do 80 komórek bakteryjnych w polu widzenia)
- + średni stopień adherencji (od 40 do 60 komórek bakteryjnych w polu widzenia)
- słaby stopień adherencji (poniżej 40 komórek bakteryjnych w polu widzenia).

Tab.9. Wyniki adherencji szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 do ludzkiej linii tkankowej Caco-2.

| Nazwa szczepu | Stopień adherencji | Średnia liczba komórek bakteryjnych w polu widzenia |
|------------------------|--------------------|---|
| <i>L.plantarum</i> PL8 | +++ | 105 |

Fig. 5 przedstawia adherencję szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8, do ludzkiej linii nabłonka jelitowego Caco-2.

XI. Sekwencjonowanie NGS (next generation sequencing) genomu szczepu bakterii *Lactobacillus plantarum* PL8.

Z uwagi na duże podobieństwo pomiędzy szczepami bakterii probiotycznych pochodzenia ludzkiego metodą, która pozwala na ich zróżnicowanie jest sekwencjonowanie pełnego genomu metodą NGS (next generation sequencing).

Metoda ta opiera się o równoległe, masowe sekwencjonowanie od kilku tysięcy do kilkuset milionów różnych matryc tzw. bibliotek. Tym samym charakteryzuje ją bardzo wysoka przepustowość oraz analiza ogromnej ilości danych w stosunkowo krótkim czasie.

W celu przeprowadzenia sekwencjonowania NGS genomu szczepu bakterii *Lactobacillus plantarum* PL8 wykonano izolację genomowego DNA z wykorzystaniem komercyjnego zestawu opartego o lizę mechaniczną i enzymatyczną. Analizę molekularną wykonano z zastosowaniem technologii całogenomowego sekwencjonowania nanoporowego (Oxford Nanopore Technology).

Dane z sekwencjonowania zostały przefiltrowane pod kątem jakości otrzymanych odczytów wg kryteriów:

- średnia jakość odczytów ≥ 8 phred score
- średnia jakość fragmentów odczytu o rozmiarze okna 500 bp ≥ 5 phred score
- długość odczytów $\geq 4,800$ bp.

Statystyki danych po filtrowaniu przedstawia Tabela 10.

Tab. 10. Statystyki otrzymanych danych z sekwencjonowania po filtrowaniu.

| Nazwa szczepu | Liczba odczytów | Całkowita liczba zasad | Średnia długość odczytów | Średnia jakość odczytów [phred score] | Długość odczytana N50 |
|---------------|-----------------|------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| PL8 | 11,611 | 123,307,024 | 10,620 bp | 12.1 | 12,026 bp |

Dla próbki przeprowadzono składanie odczytów de novo za pomocą narzędzi Unicycler, Racon oraz Medaka. Uzyskano następujące główne złożenia genomowe (Tabela 11).

Tab. 11. Zestawienie głównych założeń genomowych, utworzonych za pomocą programów Unicycler, Racon i Medaka.

| Nazwa szczepu | Długość kontigu | Średni stopień pokrycia | Cyrkularny |
|---------------|-----------------|-------------------------|------------|
| PL8 | 3016023 bp | 28,4x | tak |

Identyfikacja taksonomiczna pojedynczych odczytów algorytmem Centrifuge wykazała następującą klasyfikację szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 do rodzaju oraz gatunku: *L. plantarum* 77,5%, *Lactobacillus* 93,6%.

Identyfikacja taksonomiczna otrzymanych założeń genomowych algorytmem Blast wykazała podobieństwo do *L. plantarum* na poziomie: 86% pokrycia, 97,04% identyczności.

Oprócz założeń genomowych otrzymano również krótsze kontigi. W Tabeli 12 przedstawiono dodatkowe kontigi powstałe po analizie programem Flye i polishingu Racon i Medaka.

Tab. 12. Zestawienie otrzymanych krótszych kontigów za pomocą programu Flye i polishingu Racon i Medaka. Kontigi z numerem 1 są głównymi kontigami chromosomowymi i zostały uwzględnione w Tabeli 11.

| Nazwa szczepu | Kontig | Długość kontigu | Średni stopień pokrycia | Cyrkularny |
|---------------|--------|-----------------|-------------------------|------------|
| PL8 | 2 | 15864 bp | 873,3x | tak |
| | 3 | 38377 bp | 151,8x | tak |
| | 4 | 57106 bp | 98,2x | tak |
| | 5 | 62653 bp | 110,2x | tak |
| | 6 | 7069 bp | 85,3x | tak |
| | 7 | 51414 bp | 23,5x | tak |
| | 8 | 30476 bp | 150,7x | tak |

Sekwencję genomową szczepu *L. plantarum* PL8 prezentuje Załącznik 1 w postaci elektronicznej.

Na podstawie poznanych sekwencji genomu szczepu *L. plantarum* PL8 przeprowadzono analizę genomu za pomocą programu PROKKA (załącznik nr 2) w celu wyszukania genów kodujących szczególnie ważne funkcje z punktu widzenia jego przydatności jako szczepu probiotycznego dobrze przystosowanego do namnażania w warunkach przemysłowych. Analiza wykazała niezwykle plastyczność i zdolności adaptacyjne szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8. W genomie tego szczepu są szczepy kodujące oporność na roztwory o wysokiej osmolarności. Jednak najważniejsza z punktu widzenia funkcjonalności tego szczepu jest obecność wielokrotnych kopii genów kodujących syntezę witamin: ryboflawiny, tiaminy, kobalaminy, pantotenianu, oraz karotenoidów i kwasu foliowego. *L. plantarum* PL8 posiada ponadto geny kodujące właściwości antyoksydacyjne, w postaci enzymu oksydoreduktazy i inne umożliwiające usuwanie jonów nadtlenkowych (trxB, mrsB, purK). Szczep PL8 posiada także geny odpowiedzialne za wiązanie metali, zarówno żelaza, jak i magnezu (hisE, hisD). Niezwykle istotne są geny obecne w genomie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 umożliwiające wiązanie do powierzchni komórek: produkcję egzopolisacharydów i wiązanie fibronektyny (eno, ppl).

X. Zastosowanie wynalazku.

Badania nad przeżywalnością szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 w warunkach przemysłowych.

W celu określenia przeżywalności szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 w warunkach przemysłowych, porównano wzrost badanego szczepu na podłożach produkcyjnych względem wzrostu na standardowym podłożu laboratoryjnym dedykowanym dla bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.* tj. MRS Broth firmy Oxoid (podłoże kontrolne).

Zastosowano następujące warunki hodowli szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8, odzwierciedlające parametry stosowane w wielu procesach przemysłowych przy produkcji żywności:

- temperatura: 45°C,
- pH: 5,1,
- wilgotność: 100%
- warunki: tlenowe.

W celu przeprowadzenia badań szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zawieszano w następujących płynnych podłożach wzrostowych:

- podłoże kontrolne (MRS Broth),
- podłoże przemysłowe z kazeiną,
- podłoże przemysłowe z glicyną i treoniną,
- podłoże przemysłowe z lizyną,
- podłoże przemysłowe z peptonem roślinnym.

W tym celu pobierano jedno oczko ezy 24-godzinnej hodowli szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 na płytkach stałych i zawieszano w 10 ml danego podłoża płynnego. Hodowlę prowadzono przez 48 godzin w temperaturze 45°C, w warunkach tlenowych, wilgotności 100% oraz pH: 5,1. Liczebność bakterii w poszczególnych podłożach przemysłowych sprawdzano za pomocą metody rozcieńczeń dziesiętnych w następujących punktach czasowych: na początku hodowli (0h) oraz po upływie 12, 24, 36 oraz 48 godzin inkubacji. Liczbę wyrosłych na podłożach stałych kolonii zliczano, a wyniki podawano w jednostkach tworzących kolonie w przeliczeniu na 1 ml (j.t.k./ml). W tych samych punktach czasowych przeprowadzano również pomiar pH hodowli. Uzyskane wyniki prezentują Tabele 13–14 oraz Ryciny 6–7.

Tab. 13. Porównanie przeżywalności szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 w podłożach przemysłowych.

| Szczep bakterii | Rodzaj podłoża | Liczebność bakterii [j.t.k./ml] | | | | |
|----------------------------------|--|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 0h | 12h | 24h | 36h | 48h |
| <i>L.plantarum</i> <i>PL8</i> | Podłoże kontrolne | $4,8 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^9$ | $2,5 \times 10^9$ | $1,2 \times 10^9$ | $4,0 \times 10^8$ |
| | Podłoże przemysłowe z kazeiną | $9,0 \times 10^7$ | $6,0 \times 10^9$ | $5,0 \times 10^9$ | $3,0 \times 10^9$ | $6,0 \times 10^8$ |
| | Podłoże przemysłowe z glicyną i treoniną | $6,3 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^9$ | $1,5 \times 10^9$ | $1,0 \times 10^8$ |
| | Podłoże przemysłowe z lizyną | $5,3 \times 10^7$ | $3,2 \times 10^8$ | $1,5 \times 10^9$ | $8,8 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^8$ |
| | Podłoże przemysłowe z peptonem roślinnym | $6,8 \times 10^7$ | $1,2 \times 10^8$ | $1,8 \times 10^9$ | $2,3 \times 10^9$ | $5,0 \times 10^8$ |

Porównanie przeżywalności szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 w podłożach przemysłowych przedstawiono na Fig. 6.

Tab.14. Porównanie wartości pH hodowli szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 w różnych podłożach przemysłowych.

| Szczep bakterii | Rodzaj podłoża | Wartość pH | | | | |
|---------------------------|--|------------|------|------|------|------|
| | | 0h | 12h | 24h | 26h | 48h |
| <i>L.plantarum</i> PL8 | Podłoże kontrolne | 5,90 | 5,21 | 3,56 | 3,36 | 3,31 |
| | Podłoże przemysłowe z kazeiną | 5,91 | 5,15 | 3,53 | 3,51 | 3,41 |
| | Podłoże przemysłowe z glicyną i treoniną | 5,98 | 5,22 | 3,43 | 3,38 | 3,33 |
| | Podłoże przemysłowe z lizyną | 6,03 | 5,15 | 3,39 | 3,35 | 3,31 |
| | Podłoże przemysłowe z peptonem roślinnym | 5,70 | 4,98 | 3,29 | 3,33 | 3,30 |

Porównanie wartości pH hodowli szczepu *Lactobacillus plantarum* PL8 w różnych podłożach przemysłowych przedstawiono na Fig. 7.

Przeprowadzone badania wykazały, że szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zachowuje analogiczną żywotność w badanych podłożach przemysłowych, co w podłożu kontrolnym. Dodatkowo szczep ten doskonale znosi warunki przemysłowe hodowli tj. niskie pH, podwyższoną temperaturę i wilgotność oraz warunki tlenowe co świadczy o jego świetnym przystosowaniu do parametrów wykorzystywanych chociażby w produkcji żywności i wysokim potencjale zastosowania w tym sektorze przemysłowym.

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 różni się od pozostałych szczepów probiotycznych tym, że równocześnie:

- jako jeden z pierwszych szczepów pochodzenia ludzkiego, wyizolowanych w Polsce, posiada w pełni poznaną sekwencję genomową wyznaczoną przy pomocy NGS (next generation sequencing) – w chwili obecnej najnowocześniejszej technologii sekwencjonowania,
- został wyizolowany z przewodu pokarmowego zdrowego dziecka stąd wykazuje wysoki stopień adherencji do ludzkiej linii tkankowej nabłonka jelitowego (Caco-2) dzięki czemu może blokować adherencję innych bakterii i grzybów chorobotwórczych,

- wykazuje dużą oporność na niskie pH i działanie sztucznego soku żołądkowego. Szczep ten po upływie 30 min. zredukował swoją populację średnio o 1 log, co może świadczyć o jego doskonałym przystosowaniu do niesprzyjających warunków panującym w trakcie pasażu przez żołądek i dwunastnicę, co jest warunkiem niezbędnym dla probiotyków działających w ludzkim przewodzie pokarmowym.
- wykazuje wysoką skuteczność wobec patogennych bakterii (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter fetus*) będących najczęstszymi czynnikami etiologicznymi zakażeń bakteryjnych przewodu pokarmowego, a zatem może być wykorzystany jako składnik czynny suplementów diety przeznaczonych do zapobiegania takim zakażeniom i do poprawiania składu zaburzonej mikrobioty jelitowej poprzez hamowanie populacji tych patogennych bakterii dla człowieka i zwiększanie populacji bakterii stanowiących podstawowe składniki prawidłowej mikrobioty jelita.
- wykazuje wysoką skuteczność wobec patogennych bakterii z gatunku *Streptococcus mutans* będących najpoważniejszą przyczyną próchnicy zębów, a zatem może być wykorzystywany jako składnik produktów zapobiegających próchnicy poprzez zwiększenie udziału bakterii antagonistycznych wobec *Streptococcus mutans* w mikrobiocie jamy ustnej w postaci różnych preparatów do żucia i ssania.
- wykazuje wysoką przeżywalność w warunkach produkcyjnych (m.in. podwyższonej temperaturze czy wilgotności) stąd może zostać wykorzystany jako probiotyczny składnik funkcjonalny w różnych środkach spożywczych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep *Lactobacillus plantarum* oznaczony symbolem PL8 zdeponowany, zgodnie z traktatem budapeszteńskim o międzynarodowym uznawaniu depozytu drobnoustrojów dla celów postępowania patentowego, w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu w dniu 03 lutego 2022 roku pod numerem B/00372 posiadający sekwencję genomową przedstawioną w załączniku nr 1.
2. Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jest zdolny przetrwać w temperaturze do 45 stopni C.
3. Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 według zastrz. 1 **znamienny tym**, że ma geny *trxB*, *trxD*, *mrsB*, *purK* kodujące właściwości antyoksydacyjne zgodnie z analizą sekwencji genomowej przedstawionej w załączniku nr 2.
4. Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 według zastrz. 1 **znamienny tym**, że ma geny *hisE*, *hisD* odpowiedzialne za wiązanie metali zgodnie z analizą sekwencji genomowej przedstawionej w załączniku nr 2.
5. Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 według zastrz. 1 **znamienny tym**, że ma geny *eno*, *ppl* umożliwiające wiązanie do powierzchni komórek zgodnie z analizą sekwencji genomowej przedstawionej w załączniku nr 2.
6. Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 według zastrz. 1 **znamienny tym**, że ma geny *ruvA*, *ruvB*, *uvrC*, *lexA*, *clpC*, *clpB_1*, *clpB_2*, *grpE* odpowiedzialne za odporność na stres w tym wysoką temperaturę zgodnie z analizą sekwencji genomowej przedstawionej w załączniku nr 2.
7. Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 według zastrz. 1 **znamienny tym**, że ma geny kodujące syntezę witamin: ryboflawiny (*ribD_1*, *ribD_2*, *ribE*, *ribF_1*, *ribF_2*, *ribT*), pirodyksyny (*serC*), darniny (*thiM*, *thiD*, *thiI*) oraz karotenoidów i kwasu foliowego (*folB*, *folK*, *folP*) zgodnie z analizą sekwencji genomowej przedstawionej w załączniku nr 2.
8. Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 do zastosowania do wytwarzania środków spożywczych, których proces technologiczny odbywa się w temperaturze do 45 stopni Celsjusza.
9. Szczep *Lactobacillus plantarum* PL8 zdeponowany pod numerem B/00372 do zastosowania według zastrz. 8 **znamienny tym**, że produktami spożywczymi są wyroby czekoladowe.

Rysunki

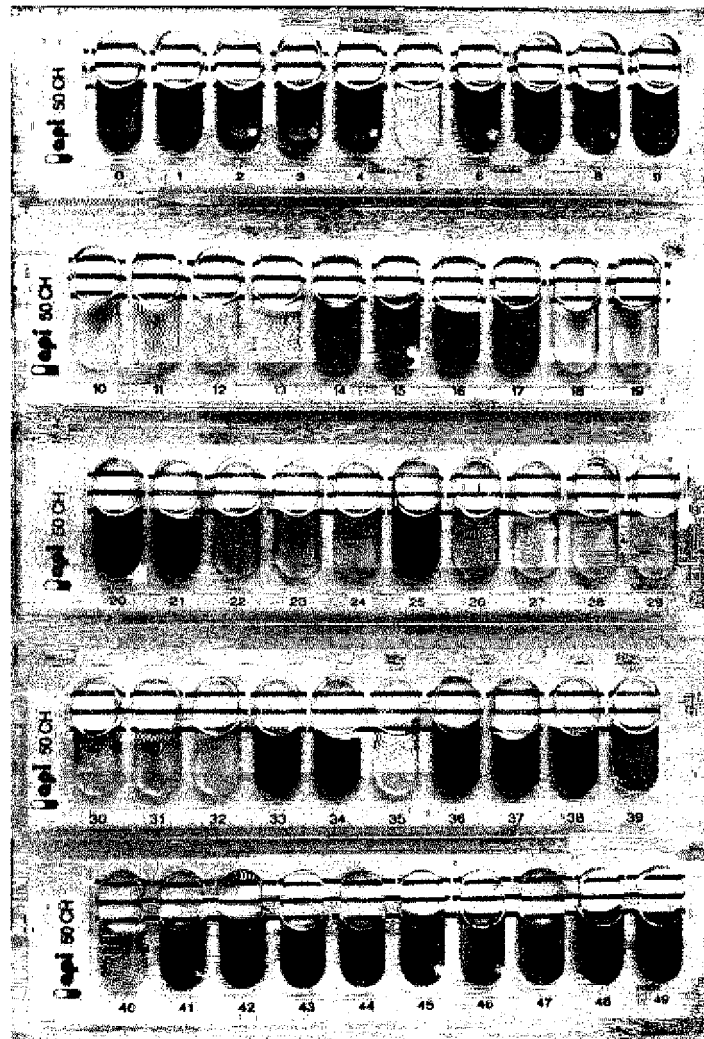


Fig.1.

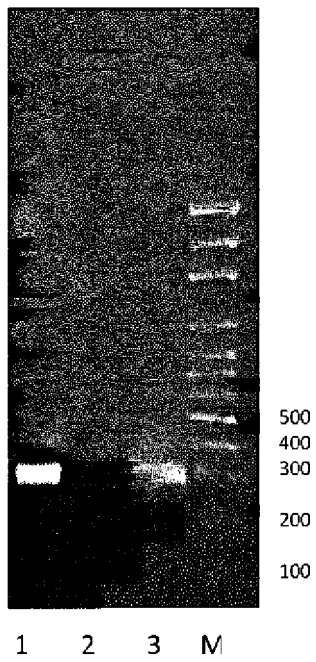


Fig. 2.

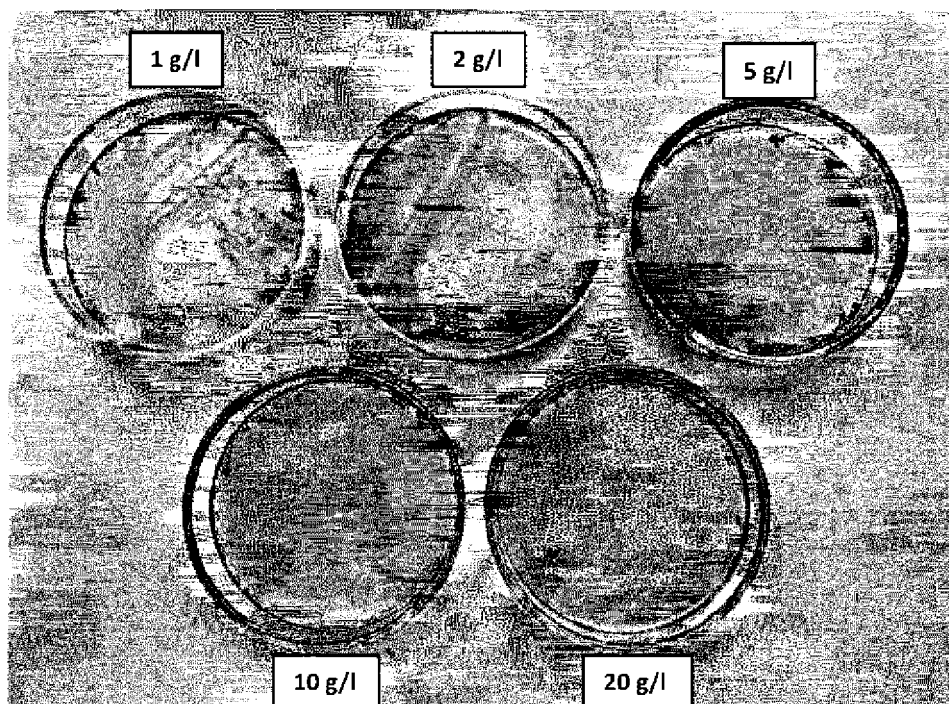


Fig. 3.

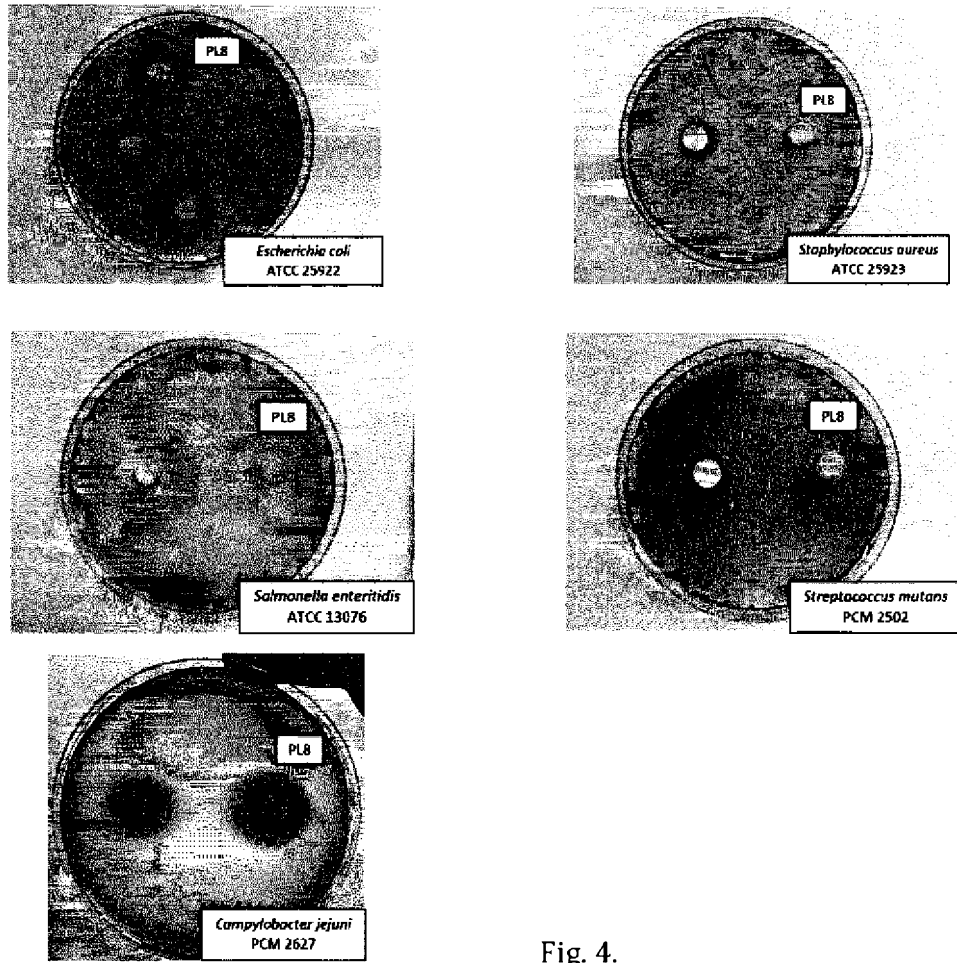


Fig. 4.

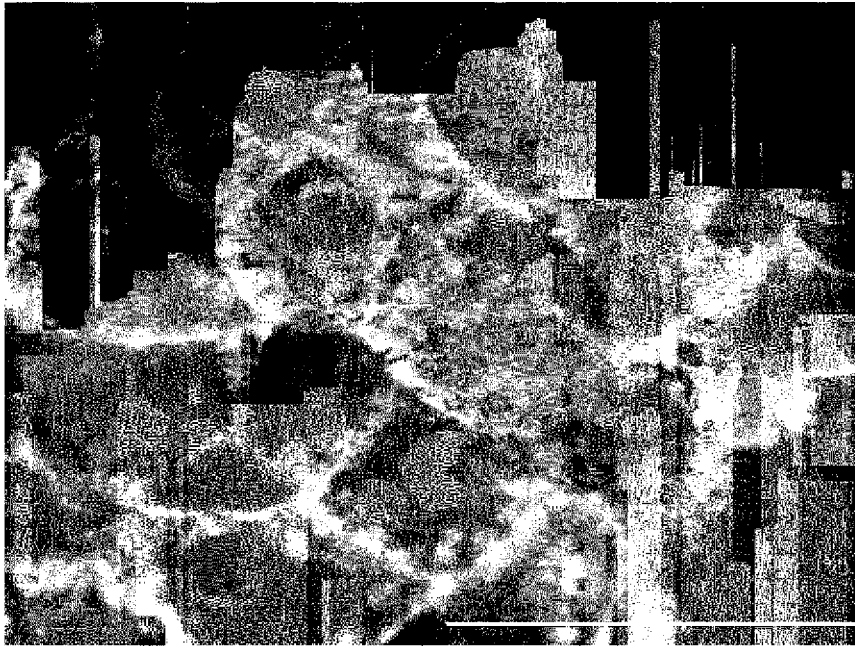


Fig.5.

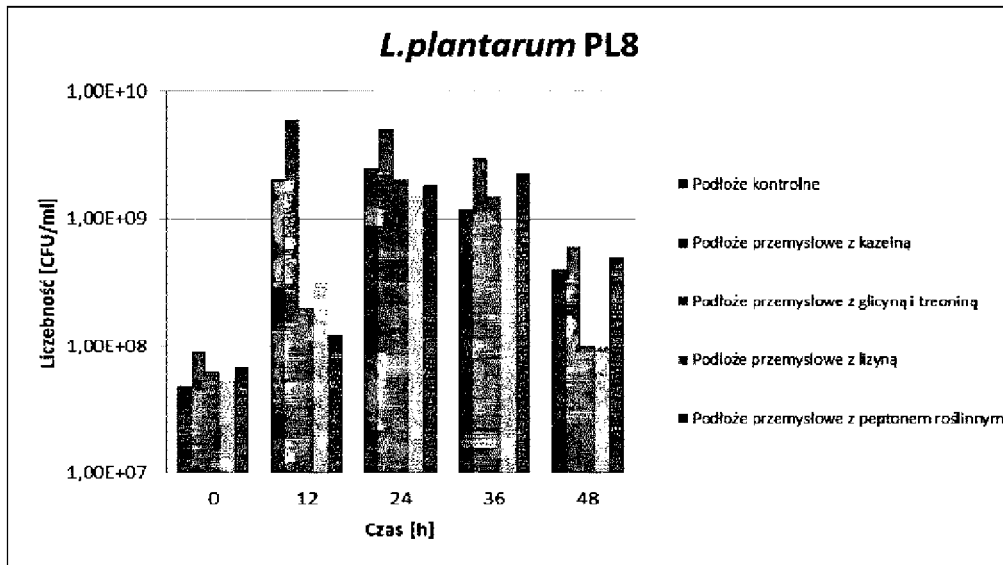


Fig.6.

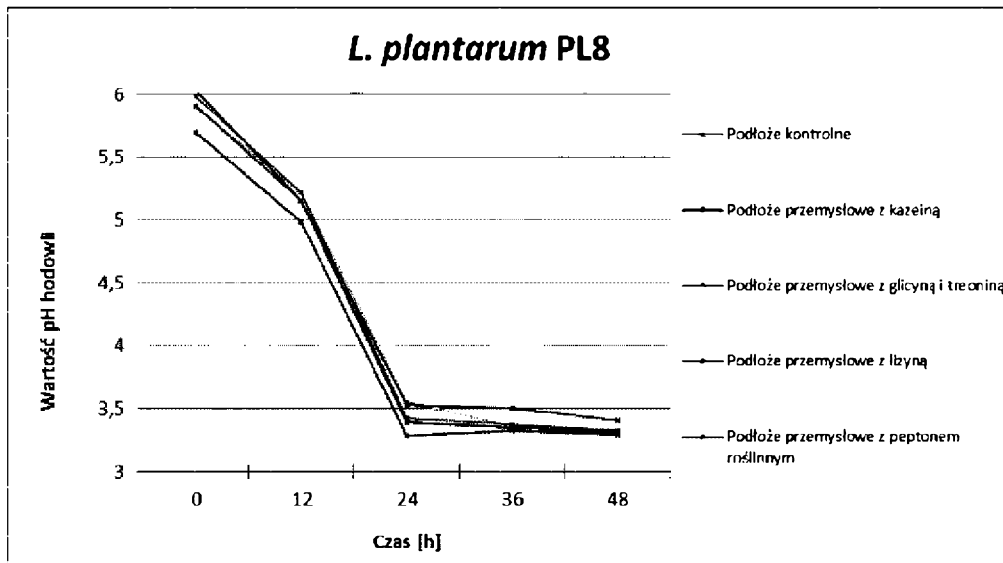


Fig. 7.