

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10)

**PL 443929 A1**

(12)

## Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **443929**

(22) Data zgłoszenia: **2023.02.28**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.09.02 BUP 36/2024**

(51) MKP:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

**A61K 35/744** (2015.01)

**A61K 31/721** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C12P 19/08** (2006.01)

**A21D 8/04** (2006.01)

**A21D 13/06** (2017.01)

(71) Zgłaszający:

**INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(-y):

**MAGDALENA KOWALCZYK, Warszawa, PL  
TAWAKALT AYODELE, Warszawa, PL  
JAKUB BORECZEK, Warszawa, PL  
JOANNA RADZIWIŁŁ-BIENKOWSKA,  
Warszawa, PL  
PRZEMYSŁAW SAŁAŃSKI, Dębinki, PL  
MAŁGORZATA ŁOBOCKA, Warszawa, PL  
OLHA KOSTIUCHENKO, Warszawa, PL  
JACEK BARDOWSKI, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Grzelak, Warszawa, PL**

(54) Tytuł:

**Nowy szczep bakterii Weissella cibaria, kompozycja go zawierająca, kompozycja farmaceutyczna do zastosowania, suplement diety, preparat probiotyczny, bakteryjna kultura starterowa do wyrobu pieczywa, zakwas, pieczywo, sposób wytwarzania pieczywa, sposób mikrobiologicznego wytwarzania dekstranu, preparat bakteryjny oraz zastosowania wykorzystujące ten szczep**

(57) Skróć opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest nowy szczep bakterii Weissella cibaria zdeponowany jako KKP 2094p, kompozycja go zawierająca, kompozycja farmaceutyczna do zastosowania jako lek, suplement diety, preparat probiotyczny, bakteryjna kultura starterowa do wyrobu pieczywa, zakwas, pieczywo, sposób wytwarzania pieczywa, sposób mikrobiologicznego wytwarzania dekstranu, preparat bakteryjny oraz zastosowania wykorzystujące ten szczep szczególnie do zapobiegania i/lub leczenia, korzystnie leczenia nowotworu jelita, korzystnie nowotworu jelita grubego.

**Nowy szczep bakterii *Weissella cibaria*, kompozycja go zawierająca, kompozycja farmaceutyczna do zastosowania, suplement diety, preparat probiotyczny, bakteryjna kultura starterowa do wyrobu pieczywa, zakwas, pieczywo, sposób wytwarzania pieczywa, sposób mikrobiologicznego wytwarzania dekstranu, preparat bakteryjny oraz zastosowania wykorzystujące ten szczep**

#### **DZIEDZINA TECHNIKI**

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej *Weissella cibaria*, zdeponowany w dniu 6 lutego 2023 (06.02.2023) jako KKP 2094p w kolekcji KKP tj. w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS-PIB im. prof. Waclawa Dąbrowskiego (Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie, Polska) (IAFB, Culture Collection of Industrial Microorganisms, prof. Waclaw Dąbrowski, IAFB-SRI). Przedmiotem wynalazku jest również kompozycja zawierająca *Weissella cibaria* KKP 2094p, kompozycja farmaceutyczna do zastosowania, suplement diety, preparat probiotyczny, bakteryjna kultura starterowa do wyrobu pieczywa, zakwas, pieczywo, sposób wytwarzania pieczywa, sposób mikrobiologicznego wytwarzania dekstranu, preparat bakteryjny oraz zastosowania wykorzystujące ten szczep szczególnie do zapobiegania i/lub leczenia, korzystnie leczenia nowotworu jelita, korzystnie nowotworu jelita grubego.

Biomasa szczepu *Weissella cibaria* KKP 2094p służy do biotechnologicznego wytwarzania dekstranu, do prowadzenia zakwasów oraz do zastosowania jako probiotyk. Wyselekcjonowany pod kątem optymalnego efektu technologicznego w biotechnologicznej produkcji dekstranu, korzystnych właściwości technologicznych do produkcji zakwasów i pieczywa na zakwasie oraz pod kątem korzystnych właściwości prozdrowotnych do zastosowań probiotycznych i zdolności do przetrwania w warunkach imitujących przewód pokarmowy.

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie bakteryjnego szczepu *Weissella cibaria* KKP 2094p do wytwarzania dekstranu, do konstruowania kultur starterowych do produkcji zakwasów i pieczywa na zakwasie oraz jako szczep probiotyczny o korzystnych właściwościach w środowisku skóry, oraz przewodu pokarmowego. Szczep *Weissella cibaria* KKP 2094p wykazuje wysoką wydajność produkcji dekstranu, aktywności przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe, wysoką oporność na sole żółciowe i niskie pH, można go stosować do biotechnologicznego wytwarzania dekstranu, jako szczep o korzystnych właściwościach technologicznych do produkcji zakwasów i pieczywa na zakwasie oraz jako szczep probiotyczny.

## STAN TECHNIKI

Po raz pierwszy bakterię z rodzaju *Weissella* odkryto w 1993 roku w fermentowanych kiełbasach. Rodzaj ten zalicza się do rodziny *Lactobacillaceae*, która należy do znanej grupy bakterii fermentacji mlekowej [z ang. lactic acid bacteria (LAB)] (Collins i wsp., 1993). *Weissella* spp. są Gram-dodatnie, katalazo-ujemne, ich komórki o morfologii ziarniaków lub pałeczek nie tworzą endospor. Szczepy i gatunki *Weissella* od dawna są izolowane z różnych środowisk i mają różne zastosowania aplikacyjne. Fermentowane produkty spożywcze, takie jak jogurt, zakwas i kimchi, są jednymi ze źródeł, z których można wyizolować bakterie *Weissella* (Mun i Chang, 2020; Valerio i wsp., 2020). Szczepy *Weissella* odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu smaku i tekstury żywności podczas fermentacji.

Większość literatury naukowej dotyczącej *Weissella* spp., w szczególności *Weissella confusa* i *Weissella cibaria* koncentruje się na wytwarzaniu i charakterystyce egzopolisacharydów (EPS) (Hu i Gänzle, 2018). *W. confusa* i *W. cibaria* mogą wytwarzać dekstrany o dużych masach. Te polisacharydy zwiększają elastyczność pieczywa, a ich zastosowanie w wypiekach bezglutenowych wydaje się obiecujące (Wolter i wsp., 2014). W produktach kosmetycznych są stosowane jako środki nawilżające i modyfikatory reologii (Yildiz i Karatas, 2018). Dekstran działa kojąco, poprawia nawilżenie skóry. Jest stabilizatorem emulsji. Zatrzymuje wilgoć na powierzchni skóry i zapobiega wysychaniu kosmetyków.

EPS produkowane przez LAB zyskały popularność na przestrzeni lat ze względu na ich możliwe cechy funkcjonalne i technologiczne (Lynch i wsp., 2018). Wykazano, że *Weissella* i *Leuconostoc* wytwarzają znaczne ilości EPS wśród LAB (Kavitake i wsp., 2016). W szczególności rodzaj *Weissella* jest odpowiedzialny za znaczną produkcję dekstranu (Kim i wsp., 2008). *Weissella hellenica*, *W. confusa* i *W. cibaria* to producenci EPS z rodzaju *Weissella*, który wytwarza wiele EPS o różnej strukturze i składzie chemicznym. Bakterie z rodzaju *Weissella* wykorzystują szlak syntezy polisacharydów pozakomórkowych do produkcji glukanu, dekstranu, lewanu, galaktanu i fruktanu, które są homo lub heteropolisacharydami (Zhou i wsp., 2018). Na produkcję EPS wpływa wiele cukrów, które obejmują monosacharydy, takie jak glukoza, mannoza, galaktoza, fruktoza i oligosacharydy: laktoza; sacharoza, rafinoza. Wyjątkowe cechy technologiczne EPS LAB sprawiają, że zajmują one istotną pozycję w przemyśle spożywczym jako skuteczne emulgatory, zagęszczacze, stabilizatory lub polepszacze tekstury (Han i wsp., 2016; Zhang i wsp., 2018). Buksa i wsp. wykazali ostatnio, że 1,5% udział dekstranu ogranicza tworzenie się skrobi odpornej w pastach skrobiowych podczas przechowywania. Prace te dostarczają nowych informacji na temat utrudniania tworzenia odpornej skrobi dzięki zastosowaniu EPS, które można wydajnie wytwarzać w zakwasie, poprawiając w ten sposób właściwości chleba na zakwasie (Buksa i wsp. 2021).

EPS mają również niesamowite właściwości biologiczne poprzez działanie prebiotyczne, przeciwtleniające, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe i immunomodulujące (Badel i wsp., 2011; Saadat i wsp., 2019; Xu i wsp., 2017). Aby zostać sklasyfikowanym jako prebiotyk, substancje nie podlegające trawieniu, w tym m.in. EPS muszą bardziej stymulować wzrost bakterii probiotycznych niż

bakterii obecnych w jelicie. Wykazano, że dekstran wytwarzany przez *W. cibaria* stymuluje wzrost *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *B. animalis*, *B. bifidum* i *B. infantis* bardziej niż *E. coli* i *E. aerogenes* (Baruah i wsp., 2016). Ta aktywność potwierdziła klasyfikację dekstranu jako związku prebiotycznego.

Dane literaturowe dotyczące różnych szczepów bakterii mlekowych wskazują, iż ilość produkowanych EPS jest zwykle wyższa niż 1 g/l (Torino i wsp., 2015; Vasanthakumari i wsp., 2015) a w przypadku kilku szczepów osiąga wartość około 10 g/l (Zeidan i wsp., 2017). Najwyższą wydajność produkcji dekstranu odnotowano jako 24,8 g/l dla szczepu *W. cibaria* 27 wyizolowanego z kimchi (Kavitake i wsp., 2020). Przeprowadzona ostatnio analiza EPS wytwarzanych przez wybrane cztery szczepy *Weissella confusa/cibaria* wykazała różnice w wydajności produkcji EPS w granicach od 3.2 g/l do 47.1 g/l i pozwoliła na określenie rodzaju produkowanego EPS jako dekstran (Buksa i wsp. 2021).

Dostępność nowych szczepów LAB o właściwościach pro-technologicznych ma wielkie znaczenie dla przemysłu. Dlatego badacze koncentrują się na poszukiwaniu dzikich szczepów ze źródeł naturalnych do projektowania nowych, interesujących przemysłowo starterów, kultur pomocniczych lub bio-ochronnych, a także probiotyków. Niedawne postępy w badaniach nad mikrobiomem, przyczyniły się do wzrostu zainteresowania i uświetniły drogę do badania mechanizmów działania probiotyków (Tao i wsp., 2017). Oprócz bakterii z dawnego rodzaju *Lactobacillus* znanych jest wiele innych niepatogennych szczepów LAB o renomowanym statusie GRAS (z ang. Generally Recognized as Safe), dostarczonym przez FDA w USA lub statusie QPS (z ang. Qualified Presumption of Safety) w Europie, które mogą być brane pod uwagę przy wyborze nowych szczepów probiotycznych. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że wybrane szczepy *Weissella* sp., które odgrywają ważną rolę w wielu procesach fermentacji przemysłowej i spożywczej, przedstawiają aktywność probiotyczną. Wiadomo, że bakterie z rodzaju *Weissella* zamieszkują jelita kręgowców, m.in. ludzi (Lee i wsp., 2012). Dotychczas stwierdzono, że bakterie te wpływają na przepuszczalność jelit (Prado i wsp., 2020), zmniejszają depresję (Sandes i wsp., 2020), regenerują komórki nabłonka jelit (Prado i wsp., 2020), wpływają na metabolizm (Elshagabee i wsp. ., 2020) i mogą zabijać szkodliwe bakterie (Dey i Kang, 2020). Ponadto wiadomo również, że niektóre szczepy *Weissella* sp. mają korzystny wpływ na zdrowie człowieka, m.in. na utrzymanie zdrowej jamy ustnej (Kang i wsp. 2019), leczenie atopowego zapalenia skóry i niektórych nowotworów (Teixeira i wsp., 2021), wykazują działanie antytoksyczne, przeciwnowotworowe czy immunomodulujące (Yu i wsp., 2019a; 2019b; Le i wsp. 2020), ale do tej pory jest to grupa LAB, która nie znalazła się na liście gatunków o statusie QPS opublikowanej przez EFSA (Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności). Zastosowanie tych bakterii jako probiotyków wymaga przeprowadzenia analiz bezpieczeństwa (EFSA, 2018). Jest to powodem dotychczas ograniczonego wykorzystania tej grupy LAB jako komercyjne kultury starterowe w przemyśle spożywczym czy jako szczepy probiotyczne.

Aby mikroorganizmy mogły być stosowane jako probiotyki muszą one być niepatogenne i niewirulentne i nie mogą posiadać genów oporności na antybiotyki, w szczególności na ruchomych elementach

genetycznych. Oprócz tego mikroorganizmy te powinny charakteryzować się cechami funkcjonalnymi wpływającymi korzystnie na zdrowie gospodarza. Zdolność do życia i przetrwania w warunkach przewodu pokarmowego, szczególnie przy wysokich stężeniach soli żółciowych i niskim pH, a także adhezja do śluzu, macierzy zewnątrzkomórkowej lub komórek nabłonka jelita to najważniejsze cechy probiotyków wspierające ich działanie, (Lee i wsp., 2015). *W. cibaria* może wytwarzać kilka substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Udokumentowano, że szczep probiotyczny do stosowania w jamie ustnej (*W. cibaria* CMU) wykazywał działanie przeciwbakteryjne przeciwko patogennym bakteriom *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, oraz *Fusobacterium nucleatum*, związane ze zdolnością do wytwarzania kwasów organicznych, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kwasów oleinowych i białek, takich jak N-acetylmuraminaza (Lim i wsp., 2018). W innych badaniach, ten sam szczep (*W. cibaria* CMU) jak również szczep *W. cibaria* CMS1 wykazały działanie przeciwdrobnoustrojowe oraz hamujące tworzenie biofilmu przez szczepy bakterii chorobotwórczych powodujących zakażenia górnych dróg oddechowych takich jak: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* (Yeu i wsp., 2021). Badania Patrone i wsp. (2021) wykazały, że supernatanty z hodowli szczepów *W. cibaria* SP7 i SP19 hamowały wzrost *Escherichia coli* ATCC 25,922 i *Salmonella enterica* UC3605 co było związane z niskim pH. Szczepy *W. cibaria* nie tylko wykazują działanie antagonistyczne wobec bakterii chorobotwórczych, ale również mogą wykazywać zwiększoną zdolność do skutecznego obniżania poziomu infekcji grzybiczych (Ndagano i wsp., 2011; Lan i wsp., 2012).

Obecnie problem narastającej antybiotykooporności wśród wielu patogenów bakteryjnych wymaga nowych strategii wykrywania i opracowywania antybiotyków lub innych środków przeciwdrobnoustrojowych stanowiących alternatywę dla antybiotyków konwencjonalnych. Oporny na wiele antybiotyków *S. aureus* jest jedną z najczęstszych przyczyn ciężkich zakażeń szpitalnych, a przewód pokarmowy jest ważnym źródłem jego przenoszenia (Boyce i wsp., 2007; Onanuga i Temedie, 2011). Jednocześnie, gronkowce zostały uznane za patogeny odpowiedzialne za biegunkę związaną ze stosowaniem antybiotyków u ludzi (Boyce i Havill, 2005). Kolonizacja człowieka przez fakultatywne patogeny bakteryjne, takie jak *S. aureus*, stanowi główny czynnik ryzyka infekcji inwazyjnych. W ostatnich latach wzrasta liczba infekcji powodowanych zarówno przez *S. aureus*, jak i *Staphylococcus epidermidis* oraz inne koagulazo-negatywne gronkowce. Bakterie te mogą być przyczyną zapalenia stawów, ścięgien, wsierdza, kości, płuc, układu moczowego, protez stawowych, zastawek serca, kateterów, zatruc pokarmowych i infekcji skóry, takich jak: liszajec zakaźny, zapalenie mieszków włosowych, czyraki, gronkowcowe złuszczone zapalenie stawów (zespół SSSS – staphylococcal scalded skin syndrome), ale mogą także wtórnie infekować zmiany skórne, np. owrzodzenia (Sokołowska-Wojdyło, 2021). W tym kontekście bardzo pożądane jest m.in. opracowanie preparatów bazujących na składnikach naturalnych, które utrzymają stan higieny skóry poprzez zabezpieczenie jej przed kolonizacją przez chorobotwórcze bakterie bez zaburzania składu naturalnej, komensalnej mikrobioty oraz doustnych probiotyków

ograniczających rozwój gronkowców w przewodzie pokarmowym ludzi, a tym samym minimalizujących ryzyko przenoszenia wieloantybiotykoopornych patogenów z jednego z ich głównych rezerwuarów w środowisku.

Z publikacji opisu patentowego PL238153B1 znana jest kultura starterowa zawierająca szczepy *Lactobacillus plantarum* B/00117, *Lactobacillus plantarum* B/00118 i *Lactobacillus brevis* opisana jako Zestaw 11 stosowana do wytworzenia zakwasów z mąki razowej i żytniej oraz wypieku pieczywa z jej wykorzystaniem.

#### **UJAWNIEŃ WYNAŁAZKU**

W świetle opisanego stanu techniki celem niniejszego wynalazku jest przewyższenie wskazanych niedogodności i dostarczenie wyselekcjonowanego nowego szczepu bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Weissella* sp. o wysokiej wydajności produkcji EPS o korzystnych właściwościach technologicznych do produkcji zakwasów i pieczywa, jednocześnie posiadającego dodatkowe korzystne właściwości prozdrowotne do zastosowań probiotycznych i przeciwnowotworowych, zdolność do przetrwania w warunkach imitujących przewód pokarmowy oraz potwierdzone bezpieczeństwo stosowania (dopuszczalny poziom oporności na antybiotyki, brak genów oporności na antybiotyki, brak genów wirulencji).

Wynalazek dotyczy nowego szczepu bakterii *Weissella cibaria*, zdeponowanego w KKP (IAFB - Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS-PIB im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie, Polska) pod nr depozytu KKP 2094p.

Wynalazek również dotyczy kompozycji zawierającej nowy szczep bakterii *Weissella cibaria*, zdeponowany w KKP (IAFB - Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS-PIB im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie, Polska) pod nr depozytu KKP 2094p.

Kompozycja jest korzystnie kompozycją farmaceutyczną zawierającą ponadto dopuszczalny farmaceutycznie nośnik, przy czym korzystnie kompozycja jest w postaci płynnej, stałej, proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego.

Wynalazek ponadto dotyczy kompozycji farmaceutycznej do zastosowania jako lek zawierającej szczep bakterii *Weissella cibaria* według wynalazku i/lub kompozycję według wynalazku oraz dopuszczalny farmaceutycznie nośnik do zastosowania jako lek.

Korzystnie kompozycja farmaceutyczna do zastosowania jako lek jest do zastosowania do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita, korzystnie do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita grubego, najkorzystniej gruczolakoraka jelita grubego.

Wynalazek dotyczy również suplementu diety zawierającego szczep bakterii *Weissella cibaria* według wynalazku i/lub kompozycję według wynalazku, przy czym suplement diety korzystnie jest w postaci płynnej, stałej, proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego.

Wynalazek dotyczy również preparatu probiotycznego zawierającego szczep bakterii *Weissella cibaria* według wynalazku i/lub kompozycję według wynalazku, przy czym preparat probiotyczny korzystnie ponadto zawiera substancje prebiotyczne, korzystnie wybrane z oligosacharydów, polisacharydów, fruktooligosacharydów, laktulozy, inuliny, skrobi odpornej, celulozy, hemicelulozy i pektyn, przy czym preparat korzystnie ponadto zawiera postbiotyki, korzystnie postbiotyki wybrane są z krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, enzymów, lipopolisacharydów, kwasów teichojowych, witamin, kwasu masłowego, octanu, propionianu, dipeptydu muramilu, indlu, kwasu teichowego, laktocepin.

Preparat probiotyczny jest korzystnie w postaci płynnej, stałej, proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego.

Wynalazek dotyczy również bakteryjnej kultury starterowej do wyrobu pieczywa, w której skład wchodzi szczep *Weissella cibaria* według wynalazku.

Wynalazek dotyczy również zakwasu do wyrobu pieczywa, który zawiera bakteryjną kulturę starterową według wynalazku.

Wynalazek dotyczy również sposobu wytwarzania pieczywa, który obejmuje etap dodawania bakteryjnej kultury starterowej według wynalazku i/lub zakwasu według wynalazku.

Wynalazek dotyczy również pieczywa zawierającego bakteryjną kulturę starterową według wynalazku i/lub zakwas według wynalazku lub wytworzonego z ich wykorzystaniem lub ich mieszaniny.

Wynalazek dotyczy również sposobu mikrobiologicznego wytwarzania dekstranu, który obejmuje etap, w którym szczep bakterii *Weissella cibaria* według wynalazku i/lub kompozycję według wynalazku hoduje się na płynnym podłożu bez dekstrozy (bez glukozy) z dodatkiem sacharozy, organicznym źródłem azotu zawierającym aminokwasy i krótkie peptydy, witaminy z grupy B i sole mineralne.

W korzystnym sposobie hodowlę prowadzi się na podłożu MRS (bulion DeMan-Rogosa-Sharpe) lub innym podłożu dla bakterii mlekowych, korzystnie z dodatkiem 5-10%±2 wag. sacharozy.

Wynalazek dotyczy również preparatu bakteryjnego zawierającego szczep bakterii *Weissella cibaria* według wynalazku i/lub kompozycję według wynalazku do zastosowania jako składnik czynny w probiotyku, preparacie terapeutycznym, żywności funkcjonalnej, suplementacji diety, do zastosowania jako składnik aktywny leku przeznaczonego do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita, korzystnie nowotworu jelita grubego.

Wynalazek dotyczy również zastosowania szczepu bakterii *Weissella cibaria* według wynalazku i/lub kompozycji według wynalazku jako dodatku funkcjonalnego w żywności funkcjonalnej, dodatku funkcjonalnego do napoju spożywczego, jako składnika aktywnego preparatu probiotycznego, preparatu bakteryjnego, suplementu diety, kompozycji farmaceutycznej.

Wynalazek dotyczy również zastosowania szczepu bakterii *Weissella cibaria* według wynalazku i/lub kompozycji według wynalazku w przemyśle spożywczym jako emulgator, zagęszczacz, stabilizator lub polepszacz tekstury produktu spożywczego.

Wynalazek dotyczy również zastosowania szczepu bakterii *Weissella cibaria* według wynalazku i/lub kompozycji według wynalazku do mikrobiologicznego wytwarzania egzopolisacharydów (EPS), korzystnie dekstranu.

Wynalazek dotyczy również zastosowania szczepu bakterii *Weissella cibaria* według wynalazku i/lub kompozycji według wynalazku i/lub bakteryjnej kultury starterowej według wynalazku do wytwarzania zakwasu do pieczywa.

Wynalazek dotyczy również zastosowania szczepu bakterii *Weissella cibaria* według wynalazku i/lub kompozycji według wynalazku i/lub zakwasu do wyrobu pieczywa według wynalazku do wytwarzania pieczywa.

Szczep *Weissella cibaria* IBB3394 zdeponowany jako KKP 2094p będący przedmiotem wynalazku wykazuje korzystne właściwości technologiczne i funkcjonalne stanowi przewagę nad obecnie znanymi i wykorzystywanymi szczepami. Szczep ten, podobnie jak wcześniej opisany szczep *Weissella confusa/cibaria* EPS\_3 - IBB3326 (Buksa i wsp. 2021) o dużej wydajności produkcji EPS wyizolowany został z zakwasu piekarskiego i na podstawie uzyskanych przez twórców analogicznych wyników posiada zdolność wytwarzania EPS (dekstranu) na poziomie 50 g/l (dane niepublikowane). Ilość EPS wytwarzanego przez szczep IBB3326 oraz IBB3394, jest wyższa od opisywanych dla innych szczepów bakterii mlekowych z wyjątkiem szczepu *W. confusa* VP30 produkującego dekstran na poziomie 60 g/l (Jin i wsp., 2019). Jednakże należy podkreślić, że wydajność surowego EPS dla szczepu VP30 nie była porównywalna ze względu na znaczną zawartość zanieczyszczeń. Opisane wyżej szczepy *W. cibaria* 27 i *W. confusa* VP30 o wysokiej wydajności produkcji dekstranu zostały wyizolowane odpowiednio z kimchi oraz z kału dziecka i mogą nie być przystosowane do środowiska zakwasów piekarskich, w przypadku którego wykazano wcześniej korzystny wpływ EPS na jakość wytwarzanego z zakwasu pieczywa. Oprócz zdolności do produkcji dekstranu szczep *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) charakteryzuje się również innymi wykazanymi funkcjonalnymi właściwościami (właściwościami probiotycznymi): aktywnością przeciwdrobnoustrojową i przeciwnowotworową, wyjątkową wysoką opornością na sole żółciowe i niskie pH w porównaniu do innych badanych przez twórców szczepów *Weissella confusa/cibaria* wyizolowanych z różnych źródeł oraz obecnością wszystkich genów szlaku produkcji witaminy B12 i K2 jak również genów

szlaku odzyskiwania witaminy B1. Żaden z opisanych w literaturze probiotycznych szczepów *Weissella cibaria*, nie wykazuje aż tak wysokiej wydajności produkcji dekstranu, aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej oraz użytecznych właściwości fizykochemicznych jak wyselekcjonowany szczep *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) według wynalazku. Ponadto, należy podkreślić, iż w przypadku *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) według wynalazku w analizie probiogenomicznej wykazano oporność na antybiotyki na poziomie zgodnym z wartościami rekomendowanymi przez EFSA, jednocześnie potwierdzając brak genów oporności na antybiotyki oraz brak genów wirulencji. Wykazano również brak cytotoksyczności wytwarzanego przez szczep *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) egzopolisacharydu na badane linie komórkowe: ludzkiego nabłonka jelitowego (gruczolakoraka jelita grubego) Caco-2 (ATCC HTB-37) i ludzkich embrionalnych komórek nabłonka nerki HEK293 (ATCC CRL-1573) oraz wykazano właściwości przeciwnowotworowe *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p), szczególnie wobec raka jelita, szczególnie jelita grubego.

Istotą wynalazku jest szczep bakterii fermentacji mlekowej *Weissella cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) o wysokiej wydajności produkcji egzopolisacharydu, aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej, doskonałych właściwościach kwaszących, bardzo dobrej przeżywalności w warunkach imitujących przewód pokarmowy, charakteryzujący się obecnością wszystkich genów wybranych szlaków produkcji lub odzyskiwania witamin, o potwierdzonym bezpieczeństwie.

Szczep *Weissella cibaria* (dla którego w niniejszym opisie stosowane jest oznaczenie własne IBB3394) został zdeponowany w dniu 6 lutego 2023 r. pod nr depozytu: KKP 2094p jako depozyt dla celów patentowych w KKP (Culture Collection of Industrial Microorganisms, prof. Waław Dąbrowski IAFB-SRI) tj. w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS-PIB im. prof. Waław Dąbrowskiego (Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waław Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie).

Nowy, nieznan i nieopisany wcześniej szczep bakterii fermentacji mlekowej *W. cibaria* KKP 2094p według wynalazku wykazuje korzystne właściwości technologiczne dla produkcji zakwasów i pieczywa na zakwasie oraz właściwości probiotyczne i przeciwnowotworowe, charakteryzuje się wyjątkowo wysoką wydajnością produkcji dekstranu, wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *S. aureus* i *S. epidermidis* oraz przeciw niepożądanym w pieczywie bakteriom przetrwalnikującym (aktywność antagonistyczna wobec *Bacillus cereus*, *Bacillus brevis* i unikalna wobec *Lysinibacillus fusiformis*), hamuje proliferację komórek raka jelita grubego, jest wysoce odporny na sole żółciowe i niskie pH, posiada wszystkie geny szlaku produkcji witaminy B12 i K2 jak również geny szlaku odzyskiwania witaminy B1, ponadto, wykazuje dopuszczalny poziom oporności na antybiotyki. W analizie probiogenomicznej tego szczepu nie stwierdzono genów oporności na antybiotyki ani genów wirulencji co potwierdza jego bezpieczeństwo.

Szczep *W. cibaria* KKP 2094p został wyizolowany z zakwasu piekarskiego.

Wynalazek dotyczy również zastosowania szczepu do biotechnologicznego wytwarzania dekstranu.

Korzystnie w skład podłoża hodowlanego dla *W. cibaria* KKP 2094p powinna wejść sacharoza, organiczne źródło azotu zawierające aminokwasy i krótkie peptydy, witaminy z grupy B i potrzebne sole mineralne. Przykładowo, odpowiednim podłożem do hodowli bakterii z rodzaju *Weissella* sp. umożliwiającym produkcję EPS jest handlowa pożywka MRS (bulion DeMan-Rogosa-Sharpe) z dodatkiem sacharozy.

W korzystnym przykładzie wykonania sposobu wytwarzania dekstranu jest hodowla *W. cibaria* KKP 2094p na podłożu MRS bez dekstrozy (bez glukozy) z dodatkiem sacharozy, korzystnie sacharozy o stężeniu 10% wag. pozwalającym na uzyskanie maksymalnej wydajności produkcji dekstranu.

Wynalazek dotyczy metody pozyskiwania dekstranu z hodowli szczepu *W. cibaria* KKP 2094p według wynalazku.

Korzystnie uzyskane hodowle rozcieńczano zimną, sterylną wodą (1:1, v/v) oddzielono płyn pohodowlany od komórek poprzez wirowanie (15 151 rcf, 4 °C, 15 min), a następnie w uzyskanym supernatancie ekstrahowano EPS. Precypitację EPS przeprowadzano dwuetapowo dodając każdorazowo 4 objętości schłodzonego 75 % etanolu. Po pierwszym etapie próbkę wirowano, zawieszano osad w wodzie i dodawano drugą porcję etanolu.

Wynalazek dotyczy również wykorzystania szczepu *W. cibaria* KKP 2094p, ze względu na korzystne właściwości technologiczne wykazywane przez ten szczep, do wytwarzania zakwasów i pieczywa na zakwasie (wytwarzanie dekstranu, aktywność antagonistyczną wobec niepożądanych w pieczywie bakterii przetrwalnikujących).

Aktywność antagonistyczną testowano wobec niepożądanym w pieczywie bakteriom przetrwalnikującym (*Bacillus cereus*, *Bacillus brevis* i *Lysinibacillus fusiformis*).

Wynalazek dotyczy również wykorzystania szczepu ze względu na właściwości probiotyczne.

W korzystnych przykładach wykonania szczep *W. cibaria* KKP 2094p, wykazał aktywność antagonistyczną wobec szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis*, ale nie hamował wzrostu szczepu reprezentującego bakterie fermentacji mlekowej *L. lactis*.

Wykazano aktywność antagonistyczną hodowli nocnej szczepu *W. cibaria* KKP 2094p, jego zawiesiny komórek w PBS oraz supernatantu pohodowlanego tego szczepu wobec *S. aureus* IBB4005 (tj. wieloopornego szczepu *S. aureus* NCTC9789 [PS80] wykazującego oporność na amp Pen Asa Cad Mer). Przy czym najkorzystniejszą aktywność zaobserwowano dla hodowli nocnej i zawiesiny komórek w PBS.

Wykazano, że szczep *W. cibaria* KKP 2094p ma cechy uznawane za pożądane dla bakterii probiotycznych: oporność na niskie pH, gwarantującą przejście bakterii do dalszych odcinków przewodu pokarmowego; oporność na sole żółciowe, gwarantującą przeżycie bakterii w obecności soków trzustkowych.

Wykazano, że wytwarzany przez szczep *W. cibaria* KKP 2094p dekstran nie jest cytotoksyczny wobec ludzkich linii komórkowych Caco-2 i nienowotworowych komórek nabłonka nerek HEK293 ani nie wykazuje aktywności antagonistycznej wobec badanych szczepów bakterii *S. aureus* i *L. lactis*.

Wykazano, że szczep *W. cibaria* KKP 2094p hamował proliferację komórek raka jelita grubego, przy czym wykazana aktywność przeciwnowotworowa jest silniejsza niż aktywność znanych szczepów bakterii mlekowych (*Lactococcus lactis* zdeponowanych w PCM jako B/00311 i B/00312) o potwierdzonej aktywności antyproliferacyjnej (patent no. PL241568B1, Sałański i wsp. 2022).

Szczep *W. cibaria* KKP 2094p został zsekwencjonowany, a analiza probiogenomiczna potwierdziła brak obecności genów oporności na antybiotyki i brak genów wirulencji a zatem potwierdzono możliwość probiotycznego i medycznego jego stosowania.

Analizę bioinformatyczną szczepu *W. cibaria* KKP 2094p wykonano zgodnie z zaleceniami EFSA wykorzystując rekomendowane programy i bazy danych.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „biomasa” rozumie się biomasę komórek szczepu bakterii *Weissella cibaria* KKP 2094p otrzymywaną w wyniku namnożenia komórek w pożywkach ciekłych lub na podłożach stałych o składzie dostosowanym do wymogów kultur bakterii fermentacji mlekowej.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „potencjalnie probiotyczne” rozumie się cechy wykazane w badaniach *in vitro* o możliwym korzystnym wpływie na zdrowie gospodarza zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi, w szczególności: wytwarzanie EPS, aktywność przeciw bakteriom *S. aureus* i *S. epidermidis*, obniżanie pH środowiska, oporność na niskie pH i obecność soli żółciowych.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „aktywność przeciwdrobnoustrojowa” rozumie się działanie antagonistyczne wobec bakterii *S. aureus* i *S. epidermidis* oraz wobec niepożądanym w pieczywie bakteriom przetrwalnikującym (*Bacillus cereus*, *Bacillus brevis* i *Lysinibacillus fusiformis*).

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „potwierdzone bezpieczeństwo” rozumie się dopuszczalny poziom oporności na rekomendowane przez EFSA 9 antybiotyków: ampicylinę (AM), chloramfenikol (CL), klindamycynę (CM), kanamycynę (KM), gentamycynę (GM/CN), streptomycynę (SM), tetracyklinę (TC), wankomycynę (VA), erytromycynę (EM), oraz brak genów oporności na antybiotyki, brak genów wirulencji w analizie probiogenomicznej wykonanej zgodnie z zaleceniami EFSA wykorzystując rekomendowane programy i bazy danych.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „cytotoksyczny” rozumie się cytotoksyczność powyżej 10% i wynikającą z niej przeżywalność komórek poniżej 90% zgodnie z wartościami zaproponowanymi przez EL-Adawi i wsp. (2012) dla EPS wytwarzanych przez bakterie mlekowe.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „hodowla nocna” rozumie się hodowlę szczepu bakteryjnego założoną z pojedynczej kolonii w odpowiednim podłożu inkubowaną przez kilkanaście godzin.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „supernatant” rozumie się płyn pochodzący oddzielony od komórek bakterii.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „ekstrakt komórkowy” rozumie się płyn uzyskany po rozbiciu przy użyciu szklanych kulek komórek bakterii oddzielonych przez wirowanie z hodowli nocnej i zawieszonych w buforze PBS.

W niniejszym zgłoszeniu przez określenie „zawiesina komórek w PBS” rozumie się komórki bakterii uzyskane z hodowli nocnej poprzez zwirowanie, przepłukane i ponownie zawieszane w buforze PBS.

#### **SZCZEGÓŁOWE PRZEDSTAWIENIE WYNAŁAZKU**

Szczep *Weissella cibaria* IBB3394 zdeponowany jako KKP 2094p według wynalazku wyizolowano jak przedstawiono w **Przykładzie 1**, poszukując zdolnych do produkcji egzopolisacharydów (EPS) szczepów *Weissella* sp. pochodzących z różnych środowisk (roślin, fermentowanych roślin, fermentowanych produktów mlecznych). Szczep *W. cibaria* KKP 2094p został zidentyfikowany jako *Weissella confusa/cibaria* metodą sekwencjonowania genów kodujących 16S rRNA. Przynależność gatunkową szczepu *W. cibaria* KKP 2094p określono następnie jako *Weissella cibaria* poprzez sekwencjonowanie genomu oraz metodą spektroskopii masowej z użyciem aparatu MALDI TOF. Szczep *W. cibaria* KKP 2094p został wyselekcjonowany spośród wyizolowanych pięciu szczepów *Weissella* sp., w porównaniu również do szczepów tego rodzaju wyizolowanych wcześniej ze spontanicznych zakwasów piekarskich, na podstawie wyników analizy klasyfikującej go do grupy szczepów o najwyższej aktywności antagonistycznej wobec *S. aureus* (**Fig. 1**) i jednocześnie potwierdzającej brak takiej aktywności wobec przedstawiciela bakterii mlekowych (**Fig. 2**), przeprowadzonej jak opisano w **Przykładzie 2** oraz wyjątkowo wysokiej w porównaniu do pozostałych badanych szczepów (**Fig. 3**) oporności na niskie pH i obecność soli żółciowych, w warunkach wykorzystanych w **Przykładzie 3** do sprawdzenia przeżywalności szczepów w warunkach imitujących przewód pokarmowy. Dla szczepu *W. cibaria* KKP 2094p potwierdzono następnie aktywność antagonistyczną wobec innych szczepów *S. aureus* oraz szczepów *S. epidermidis* (**Przykład 4**). W przykładzie tym wykazano również zdolność szczepu *W. cibaria* KKP 2094p do zakwaszania środowiska. Wykazano możliwe wykorzystanie szczepu *W. cibaria* KKP 2094p jako szczepu potencjalnie probiotycznego posiadającego aktywność przeciw *S. aureus* (**Fig. 4**) i potwierdzono w **Przykładzie 5** zarówno dla hodowli nocnej szczepu jak i zawiesiny komórek w PBS. Aktywność tego typu, jednak na niższym poziomie zaobserwowano dla supernatantu, co wskazuje na to iż hamujący efekt w stosunku do *S. aureus* nie jest spowodowany wyłącznie obniżaniem pH środowiska. Ponadto, brak aktywności antagonistycznej w przypadku ekstraktu komórkowego, wskazuje na istotną, jak dotąd niepoznaną rolę odgrywaną przez żywe komórki tego szczepu. W **Przykładzie 6** wykazano dla szczepu *W. cibaria* KKP 2094p wyjątkowo silne działanie hamujące proliferację komórek raka jelita grubego (**Fig. 5**), wskazując na możliwość zastosowania szczepu w leczeniu raka przewodu pokarmowego.

Zaobserwowana w **Przykładzie 4** dla szczepu *W. cibaria* KKP 2094p według wynalazku, wyizolowanego z zakwasu piekarskiego (przystosowanego do życia w takim środowisku) zdolność do zakwaszania jak również wykazana w **Przykładzie 7** aktywność antagonistyczna wobec niepożądanych w zakwasach i pieczywie bakterii przetrwalnikujących (*Bacillus cereus*, *Bacillus brevis* i *Lysinibacillus fusiformis*) potwierdzają możliwość wykorzystanie szczepu *W. cibaria* KKP 2094p ze względu na korzystne właściwości technologiczne do produkcji zakwasów i pieczywa na zakwasie. Wykorzystanie tego szczepu w tym celu jest również korzystne ze względu na zdolność do wytwarzania EPS pełniącego istotną rolę w kształtowaniu właściwości reologicznych i strukturalnych pieczywa.

Wyselekcjonowany szczep *W. cibaria* KKP 2094p posiadający zdolność do produkcji EPS, wykorzystano w **Przykładzie 8** do wytworzenia EPS uzyskując na podłożu z 10% sacharozą jedną z najwyższych udokumentowanych wydajności biotechnologicznej produkcji dekstranu.

W **Przykładzie 9** świeżo uzyskany EPS oraz EPS przechowywany w warunkach chłodniczych przez 6 miesięcy sprawdzono pod kątem aktywności antagonistycznej wobec *S. aureus* oraz szczepu bakterii mlekowych (**Fig. 6**). Zastosowany zakres stężeń EPS od 0 do 20 mg/ml nie spowodował znaczącego zahamowania wzrostu żadnego ze szczepów wskaźnikowych, tym samym wskazując iż taki EPS nie ma istotnej aktywności antagonistycznej względem badanych szczepów bakterii.

Egzopolisacharydy stosowane jako dodatki do żywności i pasz powinny być bezpieczne dla ludzi i zwierząt. Cytotoksyczność egzopolisacharydów wytwarzanych przez bakterie mlekowe nie powinna być wyższa niż 10%, co oznacza, że odsetek komórek przeżywających nie powinien być niższy niż 90% (EL-Adawi et al., 2012). Cytotoksyczność egzopolisacharydu ze szczepu *Weissella cibaria* (KKP 2094p) była badana zgodnie z opisem w **Przykładzie 10** względem dwóch ludzkich linii komórkowych pochodzących z American Type Culture Collection: gruczołakoraka jelita grubego Caco-2 (ATCC HTB-37) i nienowotworowych komórek, komórek nabłonka nerek HEK293 (ATCC CRL-1573). Traktowanie linii komórkowych stężeniami egzopolisacharydu od 2,5 do 30% nie spowodowało istotnego statystycznie zahamowania proliferacji, tym samym potwierdzając brak cytotoksyczności badanego EPS (**Fig. 7-10**).

Dla szczepu wykonano również analizy potwierdzające bezpieczeństwo. W **Przykładzie 11**, test na wrażliwość na antybiotyki potwierdził poziom oporności na akceptowalnym poziomie zgodnie z wytycznymi EFSA. W przypadku rodzaju *Weissella*, dla których nie podano specyficznych wartości granicznych wyniki, zgodnie z rekomendacją, należy porównywać z wynikami dla najbliższej filogenetycznie spokrewnionych bakterii (heterofermentatywnych laktobacillusów oraz leukonostoków). Dodatkowo, bezpieczeństwo szczepu (brak genów oporności na antybiotyki oraz brak czynników wirulencji) zostało potwierdzone w analizie probiogenomicznej opisanej w **Przykładzie 12**.

W **Przykładzie 13**, szczep *W. cibaria* KKP 2094p z powodzeniem wykorzystano do wytworzenia pieczywa na zakwasie, które uzyskało lepsze oceny w porównaniu z pieczywem uzyskanym bez udziału tego szczepu.

**KRÓTKI OPIS FIGUR RYSUNKU**

Przykładowe realizacje wynalazku zaprezentowano na figurach rysunku, na których:

**Fig. 1** Przedstawia wynik badania aktywności antagonistycznej szczepów *Weissella* sp. przeciwko *S. aureus* IBB4005. Licząc od lewej do prawej, od góry do dołu szalka (a) zawiera: 3714 (1), 3715 (2), 3716 (3), 3717 (4), 3277 (5), 3278 (6), 3279 (7), 3385 (8), 3386 (9), 3387 (10), 3388 (11), 3389 (12), 3393 (13), 3394 (14) (tj. *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) i K - szczep kontrolny (wytwarzający nizinę *L. lactis* IBB1339). Natomiast szalka (b) zawiera: 3287 (15), 3325 (16), 3326 (17), 3327 (18), 3382 (19), 3383 (20), 3384 (21), 3280 (22), 3281 (23), 3282 (24), 3284 (25), 3285 (26), 3286 (27) i K - szczep kontrolny (wytwarzający nizinę *L. lactis* IBB1339).

**Fig. 2** Przedstawia wynik badania aktywności antagonistycznej szczepów *Weissella* sp. przeciwko *L. lactis* IL1403. Licząc od lewej do prawej, od góry do dołu szalka (a) zawiera: 3714 (1), 3715 (2), 3716 (3), 3717 (4), 3277 (5), 3278 (6), 3279 (7), 3385 (8), 3386 (9), 3387 (10), 3388 (11), 3389 (12), 3393 (13), 3394 (14) (tj. *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) i K - szczep kontrolny (wytwarzający nizinę *L. lactis* IBB1339). Natomiast szalka (b) zawiera: 3287 (15), 3325 (16), 3326 (17), 3327 (18), 3382 (19), 3383 (20), 3384 (21), 3280 (22), 3281 (23), 3282 (24), 3284 (25), 3285 (26), 3286 (27) i K - szczep kontrolny (wytwarzający nizinę *L. lactis* IBB1339).

**Fig. 3** Przedstawia odpowiedź szczepów *Weissella* sp. na stres związany z obecnością soli żółciowych i niskiego pH.

**Fig. 4** Przedstawia wpływ *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) (hodowli nocnej, supernatantu, ekstraktu komórkowego, żywych komórek zawieszonych w buforze PBS) na przeżywalność *S. aureus* IBB4005. Liczebność bakterii *Staphylococcus* wyrażoną w procentach przedstawiono względem liczebności w kontroli w MRS (dla hodowli i supernatantu) lub PBS (dla komórek i ekstraktu). Obliczenia dla pomiaru po rozpoczęciu ( $T_0$ ), po godzinie ( $T_{1h}$ ) i trzech godzinach ( $T_{3h}$ ) inkubacji.

**Fig. 5** Przedstawia hamujący wpływ szczepu *Weissella* sp. IBB3394 (KKP 2094p) na proliferację komórek gruczołakoraka jelita grubego Caco-2 w porównaniu do wpływu dwóch innych szczepów bakterii mlekowych, w tym szczepu IBB109 o potwierdzonej wcześniej aktywności antyproliferacyjnej. Proliferację komórek Caco-2 inkubowanych ze szczepami bakteryjnymi mierzono w odniesieniu do wolnej od bakterii hodowli komórkowej Caco-2 (100%) stosując test kolorymetryczny BrdU. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

**Fig. 6** Przedstawia wynik badania wpływu EPS produkowanego przez *Weissella* sp. IBB3394 (KKP 2094p) na wzrost *S. aureus* IBB4005 (a) i *L. lactis* IL1403 (b). Świeże i przechowywane przez 6 miesięcy w warunkach chłodniczych próbki EPS (20, 10, 5, 2,5, 0 mg/ml) nakropiono powyżej linii, podczas gdy poniżej linii nakropiono kontrole pozytywne - z bakteriocyną niziną w różnych stężeniach (100, 50, 20, 10, 5, 2,5 mg/ml), dolna część szalki od lewej do prawej.

**Fig. 7** Przedstawia wynik badania przeżywalności komórek linii komórkowej gruczolakoraka jelita grubego Caco-2 po inkubacji z różnymi stężeniami egzopolisacharydu izolowanego z hodowli szczepu *Weissella* sp. IBB3394 (KKP 2094p) w stosunku do linii komórkowej nieinkubowanej z egzopolisacharydem. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

**Fig. 8** Przedstawia wynik badania przeżywalności linii komórkowej nabłonka nerki HEK293 po inkubacji z różnymi stężeniami egzopolisacharydu izolowanego z hodowli szczepu *Weissella* sp. IBB3394 (KKP 2094p) w stosunku do linii komórkowej nieinkubowanej z egzopolisacharydem. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

**Fig. 9** Przedstawia wynik badania cytotoksyczności egzopolisacharydu izolowanego z hodowli szczepu *Weissella* sp. IBB3394 (KKP 2094p) na komórki linii komórkowej gruczolakoraka jelita grubego Caco-2 w stosunku do linii komórkowej nieinkubowanej z egzopolisacharydem. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

**Fig. 10** Przedstawia wynik badania cytotoksyczności egzopolisacharydu izolowanego z hodowli szczepu *Weissella* sp. IBB3394 (KKP 2094p) na linii komórkowej nabłonka nerki HEK293 w stosunku do linii komórkowej nieinkubowanej z egzopolisacharydem. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

Cytowane w opisie publikacje oraz podane w nich odniesienia są w całości niniejszym włączone, jako referencje. Poniższe przykłady ilustrują wynalazek, nie ograniczając go w żaden sposób.

## **SPOSOBY WYKONANIA WYNALAZKU**

Poniższe przykłady umieszczono jedynie w celu zilustrowania wynalazku oraz wyjaśnienia poszczególnych jego aspektów, a nie w celu jego ograniczenia i nie powinny być utożsamiane z całym jego zakresem, który zdefiniowano w załączonych zastrzeżeniach.

## **PRZYKŁADY**

### **Przykład 1 Izolacja i identyfikacja szczepów produkujących EPS**

Poszukiwanie szczepów bakterii zdolnych do produkcji EPS przeprowadzono na podłożu selekcyjnym stałym MRS bez dekstrozy z dodatkiem 10% sacharozy, na które wysiewano posiewem redukcyjnym zakwas piekarski, sok z fermentowanej kapusty i ogórków, płyn uzyskany po dokładnym wytlukaniu fragmentów roślin w buforze PBS (pH 7,4), lub po zawieszeniu fermentowanych produktów mlecznych. Płytki inkubowano w warunkach tlenowych w temp. 30 °C przez minimum 48 godzin. Pojedyncze kolonie bakterii o śluzowatej morfologii pasażowano na podłoże stałe MRS do uzyskania czystych kultur wyizolowanych bakterii, które to szczepy zdeponowano w Kolekcji IBB PAN (COLIBB, Polska).

Przynależność gatunkową określono metodą sekwencjonowania genów kodujących 16S rRNA. Wśród bakterii produkujących EPS wyizolowanych z podłoża zawierającego sacharozę wytypowano bakterie należące do *Leuconostoc* sp. (12 szczepów) i *Weissella confusa/cibaria* (5 szczepów). Na dalszym etapie

badan po określeniu zaskakujących właściwości użytkowych dla szczepu *W. cibaria* IBB3394 potwierdzono jego przynależność gatunkową jako *Weissella cibaria* poprzez sekwencjonowanie genomu oraz metodą spektroskopii masowej z użyciem aparatu MALDI TOF przy dokonywaniu depozytu tego szczepu do KKP (IAFB, Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS-PIB im. prof. Wacława Dąbrowskiego) gdzie został zdeponowany jako KKP 2094p.

**Przykład 2** Badanie przesiewowe szczepów *Weissella* sp. pod kątem aktywności antagonistycznej względem patogennego szczepu *S. aureus*

Antagonistyczne działanie 5 szczepów *Weissella* sp. wyizolowanych jak opisano w **Przykładzie 1** oraz 12 szczepów wyizolowanych wcześniej ze spontanicznych zakwasów piekarskich (**Tabela 1**) przeciwko patogennemu szczepowi *S. aureus* IBB4005 (**Fig. 1**) i szczepowi *L. lactis* IL1403 reprezentującemu bakterie mlekowe (**Fig. 2**) analizowano metodą nakraplania na szalkę ze szczepem wskaźnikowym, wobec wytwarzającego nizinę szczepu *L. lactis* IBB1339 jako kontroli pozytywnej.

**Tabela 1.** Szczepy *Weissella confusa/cibaria* użyte w przykładzie.

Numer	Źródło izolacji	Numer w "COLIBB"
1	ogórki małosolne (bazar "Zieleniak")	3714
2	ogórki małosolne	3715
3	rukola	3716
4	ziarna soi (suche)	3717
5	zakwas żytni	3277
6	zakwas żytni	3278
7	zakwas żytni	3279
8	zakwas z pszenicy zwyczajnej	3385
9	zakwas z pszenicy zwyczajnej	3386
10	zakwas z pszenicy zwyczajnej	3387
11	zakwas z pszenicy zwyczajnej	3388
12	zakwas z pszenicy zwyczajnej	3389
13	zakwas z pszenicy zwyczajnej	3393
<b>14</b>	<b>zakwas piekarski</b>	<b>3394</b>
15	zakwas żytni	3287
16	zakwas z pszenicy orkisz	3325
17	zakwas z pszenicy orkisz	3326
18	zakwas z pszenicy orkisz	3327
19	zakwas z pszenicy zwyczajnej	3382
20	zakwas z pszenicy zwyczajnej	3383
21	zakwas z pszenicy zwyczajnej	3384
22	zakwas żytni	3280
23	zakwas żytni	3281
24	zakwas żytni	3282
25	zakwas żytni	3284

26	zakwas żytni	3285
27	zakwas żytni	3286

Szczepy *Weissella* sp., *L. lactis* IBB1339 (szczep kontrolny) i IL1403 (szczep wskaźnikowy) z kolekcji szczepów IBB PAN (COLIBB, Polska) wysiano odpowiednio na szalkach z podłożem MRS, GM17 i BHI i inkubowano przez 48 godzin w 30 °C. *S. aureus* IBB4005 (szczep wskaźnikowy) również wysiano na szalce z podłożem BHI (laboratorium BSL2). Pojedynczą kolonią z każdej szalki zaszczepiono płynną pożywką i inkubowano przez noc. Kultury robocze bakterii hodowano w bulionie MRS w 30 °C dla *Weissella*, w płynnym podłożu GM17 w 30°C dla *L. lactis* IBB1339 oraz w bulionie BHI w warunkach tlenowych w 37 °C z wytrząsaniem i w 30 °C bez wytrząsania dla szczepów wskaźnikowych, odpowiednio *S. aureus* IBB4005 i *L. lactis* IL1403. Półpłynny agar BHI podgrzany do 55 °C (5 ml) zaszczepiono 100 µl hodowli nocnej (szczepy wskaźnikowe: *S. aureus* IBB4005, *L. lactis* IL1403) i natychmiast wylano na dużą szalkę z podłożem stałym BHI i równomiernie rozprowadzono, aby pokryć powierzchnię. Po związaniu agaru, 5 µl hodowli nocnych badanych kultur *Weissella* sp. i kontroli pozytywnej (szczepu *L. lactis* IBB1339 wytwarzającego nizinę) nanoszono na określone miejsca na szalce. Szalki pozostawiono do wchłonięcia kropli i inkubowano przez noc w 37°C i w 30°C odpowiednio dla *S. aureus* IBB4005 i *L. lactis* IL1403. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych. Antagonizm wobec szczepów wskaźnikowych oceniano przez obserwację stref zahamowania wzrostu.

Wielkość i przezroczystość takich stref różni się w zależności od szczepu. Ogólnie zaobserwowano cztery różne efekty: i.) wyraźne strefy zahamowania, ii.) strefy zahamowania z widocznym wzrostem badanego szczepu w środku, iii.) niewyraźne strefy ze słabo widocznym wzrostem wskaźnika i widocznym wzrostem badanego szczepu w środku oraz iv.) brak stref zahamowania wzrostu wokół badanego szczepu. Pierwsze dwa efekty zostały sklasyfikowane jako silne działanie antagonistyczne i oznaczone jako (+), trzeci efekt był bakteriostatyczny (+/-), a ostatni efekt został scharakteryzowany jako brak aktywności antagonistycznej (-). Wynik uzyskany z trzech powtórzeń (**Tabela 2**) wskazywały, że niektóre szczepy *Weissella* sp. były w stanie zahamować wzrost *S. aureus*, niektóre okazały się bakteriostatyczne, podczas gdy inne nie hamowały wzrostu *S. aureus*. Jednocześnie żaden z testowanych szczepów nie hamował wzrostu szczepu bakterii mlekowej *L. lactis* IL1403 (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Wyniki badania aktywności antagonistycznej.

Numer	Numer w "COLIBB"	Aktywność antagonistyczna przeciwko					
		<i>L. lactis</i> IL1403			<i>S. aureus</i> IBB4005		
		Powt. 1	Powt. 2	Powt. 3	Powt. 1	Powt. 2	Powt. 3
0	1339	+	+	+	+	+	+
1	3714	-	-	-	+	+	+
2	3715	-	-	-	+	+	+
3	3716	-	-	-	+	+	+
4	3717	-	-	-	+	+	+

5	3277	-	-	-	+	+	+
6	3278	-	-	-	+	+/-	+/-
7	3279	-	-	-	+	+	+
8	3385	-	-	-	+	+	+
9	3386	-	-	-	-	-	-
10	3387	-	-	-	-	-	-
11	3388	-	-	-	+/-	+	+
12	3389	-	-	-	+/-	+/-	+/-
13	3393	-	-	-	+	+	+
<b>14</b>	<b>3394</b>	-	-	-	+	+	+
15	3287	-	-	-	+	+/-	+/-
16	3325	-	-	-	+	+	+
17	3326	-	-	-	+	+	+
18	3327	-	-	-	+	+/-	+
19	3382	-	-	-	+	+/-	+/-
20	3383	-	-	-	+/-	+/-	+/-
21	3384	-	-	-	+	+	+
22	3280	-	-	-	+	+/-	+/-
23	3281	-	-	-	+	+	+/-
24	3282	-	-	-	+	+	+
25	3284	-	-	-	+	+/-	+/-
26	3285	-	-	-	+/-	+	+/-
27	3286	-	-	-	+/-	+	+/-

### **Przykład 3. Test przeżywalności szczepów *Weissella* sp. w niskim pH i w obecności soli żółciowych**

Jedną z ważnych właściwości definiujących bakterie probiotyczne jest ich zdolność do przetrwania w przewodzie pokarmowym. Oporność 5 szczepów *Weissella* sp. wyizolowanych jak opisano w Przykładzie 1 oraz 12 szczepów wyizolowanych wcześniej ze spontanicznych zakwasów piekarskich, na sole kwasów żółciowych (stres związany z solą żółciową) i niskie pH (stres kwasowy) badano w następujący sposób. Świeżo wyhodowane kolonie na podłożu IST-MRS [90% ISO-Sensitest broth (Oxoid) i 10% MRS (Merck)] dla każdego izolatu bakteryjnego zawieszono w PBS, pH = 7,4 (PBS404, BioShop) i rozcieńczono do OD600<sub>nm</sub> = 0,5 w 1 ml PBS, pH = 7,4 (kontrola); PBS, pH = 3 (stres kwasowy); oraz PBS, pH = 7,4, zawierający 3 g/l dwóch soli kwasów żółciowych: cholanu sodu i dezoksycholanu sodu (B8756, Sigma-Aldrich) (stres związany z solami żółciowymi). Próbkę inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C. Po inkubacji próbki odwirowano (3 minuty, 4°C, 10000 rpm) i zlano supernatant, a osad komórkowy zawieszono w 0,5 ml buforu PBS pH 7,4. Z każdej próbki przygotowano rozcieńczenia od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-6</sup>. Na szalkach z podłożem stałym IST-MRS nakraplano po 20 µl rozcieńczeń. Szalki inkubowano przez 48 h w 30 °C w warunkach tlenowych. Eksperymenty przesiewowe pod kątem charakterystyki szczepów w warunkach naśladujących przewód pokarmowy przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych i obliczono średnią dla każdego z warunków. Podatność na czynniki stresowe wyrażono jako spadek o rzędy wielkości liczby jednostek tworzących kolonie bakteryjne (CFU)/ml w porównaniu z warunkami kontrolnymi (pH PBS = 7,4). Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresie (Fig. 3), na ich podstawie wybrano izolat IBB3394

(zdeponowany następnie jako KKP 2094p) jako unikalny szczep najbardziej odporny na sole żółciowe i niskie pH.

**Przykład 4. Badanie wybranych szczepów *Weissella* sp. pod kątem aktywności antagonistycznej względem szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis***

Sześć szczepów bakterii mlekowych z rodzaju *Weissella* (*confusa/cibaria*) wytypowanych z Kolekcji Szczepów Bakteryjnych IBB PAN (COLIBB) przetestowano pod kątem:

- aktywności kwaszącej, w celu zbadania ewentualnego wpływu obniżenia pH na zahamowanie wzrostu szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis*,
- aktywności antagonistycznej wobec żywych komórek trzech patogennych szczepów *S. aureus* w tym szczepu wieloopornego,
- aktywności antagonistycznej wobec żywych komórek dwóch szczepów *S. epidermidis* reprezentujących gatunek bakterii wywołujący zakażenia oportunistyczne (nie wywołujący infekcji u ludzi zdrowych).

Testowane szczepy *Weissella* nakraplane na podłoże stałe BHI z purpurą bromokrezolową (wskaźnikiem kwasowości) powodowały zmianę zabarwienia podłoża z fioletowo-purpurowej na żółtą co świadczy o zakwaszeniu podłoża wokół strefy nakropień. Wartości pomiaru pH hodowli nocnych szczepów wynosiły od 4,23 do 4,89.

Test aktywności antagonistycznej wykonywano poprzez nakropienie po 5 µl płynnych hodowli nocnych szczepów *Weissella* na duże szalki (BHI z purpurą bromokrezolową) z wysianymi w formie murawki szczepami wskaźnikowymi *S. aureus* IBB4002, IBB4005 i IBB4009 oraz *S. epidermidis* 6PII6 i 5L03. Szalki inkubowano 24 godziny w 37 °C. Wokół badanych szczepów *Weissella* obserwowano strefy zahamowania wzrostu dla wszystkich wskaźnikowych szczepów *S. aureus* (Tabela 3) oraz *S. epidermidis* (Tabela 4).

**Tabela 3** Wyniki badania aktywności antagonistycznej względem szczepów *S. aureus* (średnie z dwóch powtórzeń biol.).

lp	numer w "COLIBB"	średnica kropli na BHI z purpurą po 24 h szalka z 4002	średnica strefy zahamowania wzrostu <i>S. aureus</i> 4002 na BHI z purpurą	różnica dla 4002 [mm]	średnica kropli na BHI z purpurą po 24 h szalka z 4005	średnica strefy zahamowania wzrostu <i>S. aureus</i> 4005 na BHI z purpurą	różnica dla 4005 [mm]	średnica kropli na BHI z purpurą po 24 h szalka z 4009	średnica strefy zahamowania wzrostu <i>S. aureus</i> 4009 na BHI z purpurą	różnica dla 4009 [mm]
1	3287	7,50	9,50	2,00	8,00	9,50	1,50	7,75	9,50	1,75
2	3325	7,75	10,00	2,25	6,75	9,25	2,50	7,00	9,00	2,00
3	3326	7,25	10,25	3,00	7,75	10,25	2,50	7,50	9,00	1,50
4	3389	7,50	9,70	2,20	7,25	8,95	1,70	7,25	9,75	2,50
5	3393	7,25	9,05	1,80	7,50	9,55	2,05	7,25	9,75	2,50
6	3394	7,50	9,50	2,00	7,75	9,50	1,75	7,25	8,75	1,75

**Tabela 4** Wyniki badania aktywności antagonistycznej względem szczepów *S. epidermidis* (średnie z dwóch powtórzeń biol.).

lp	numer w "COLIBB"	średnica kropli na BHI z purpurą po 24 h szalka z 6PII6	średnica strefy zahamowania wzrostu <i>S. epidermidis</i> 6PII6 na BHI z purpurą	różnica dla 6PII6	średnica kropli na BHI z purpurą po 24 h szalka z 5L03	średnica strefy zahamowania wzrostu <i>S. epidermidis</i> 5L03 na BHI z purpurą	różnica dla 5L03
1	3287	9,0	11,0	2,0	7,0	8,0	1,0
2	3325	8,8	10,0	1,2	7,0	9,0	2,0
3	3326	8,8	10,3	1,5	6,8	8,5	1,7
4	3389	9,3	12,0	2,7	7,0	8,0	1,0
5	3393	8,8	10,0	1,2	7,0	7,5	0,5
6	3394	8,8	10,0	1,2	7,0	8,5	1,5

**Przykład 5.** Aktywność antagonistyczna szczepu *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) dla różnych form preparatu (hodowli, supernatantów, ekstraktów komórkowych, żywych komórek zawieszonych w buforze PBS) wobec żywych komórek szczepu *S. aureus*

Eksperyment wykonano dla różnych wariantów:

- Hodowla nocna szczepu *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) – 900 µl,
- Supernatant – 900 µl płynnej hodowli nocnej *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) – wirowano 3 min, 13 tys. RPM, a następnie supernatant filtrowano przez filtr 0,45 µm,
- Ekstrakt z komórek *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) osadzonych przez wirowanie (3 min, 13 tys. RPM) – osad zawieszano w 900 µl buforu PBS i rozbijano kulkami (3x1 min, z przerwami na chłodzenie na lodzie po 1 min), następnie wirowano 10 min 14 tys. RPM w 4°C. Płyn z nad kulek zbierano i dodawano do PBS (ok. 100 µl) do objętości końcowej 900 µl.
- Zawiesina komórek w PBS – 900 µl płynnej hodowli nocnej *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) wirowano 3 min, 13 tys. RPM, następnie osad komórek zawieszano w 900 µl sterylnego PBS, ponownie wirowano 3 min, 13 tys. RPM a powstały osad zawieszano w 900 µl sterylnego PBS.

Rozcieńczenie w sterylnym PBS płynnych hodowli nocnych szczepu wskaźnikowego *S. aureus* IBB4005 (100 000x).

Inkubacja rozcieńczonych hodowli nocnych *Staphylococcus* (100 µl z rozcieńczenia 10<sup>-5</sup>) z poszczególnymi wariantami dla szczepu *W. cibaria* IBB3394 oraz 900 µl PBS lub podłoża MRS jako kontrola przez 3 h w temperaturze ok. 30 °C. Wysiewy na szalki LB po 100 µl z każdego wariantu w dwóch powtórzeniach zaraz po rozpoczęciu inkubacji (T<sub>0</sub>), po godzinie (T<sub>1h</sub>) i trzech godzinach (T<sub>3h</sub>). Szalki inkubowano w 42 °C (żeby wyeliminować wzrost LAB) przez 24 h lub 48 h (wariant z hodowlą nocną i komórkami). Doświadczenie wykonywano w 2 powtórzeniach technicznych i minimum 2 powtórzeniach biologicznych. Wyniki zaprezentowano na wykresie (Fig. 4), na którym liczebność bakterii *Staphylococcus* wyrażoną w procentach przedstawiono względem liczebności w kontroli (w MRS lub PBS).

Wyraźne działanie antagonistyczne zaobserwowano dla hodowli nocnej i komórek zawieszonych w buforze PBS. Aktywność przeciwoznaczającą wykazywał ponadto supernatant, podczas gdy nie zaobserwowano takiego efektu dla ekstraktu komórkowego.

**Przykład 6. Aktywność antyproliferacyjna szczepu IBB3394 (KKP 2094p) wobec komórek gruczołakoraka jelita grubego Caco-2**

Badanie hamowania proliferacji komórek raka jelita grubego wykonano według metody opisanej przez Satański i wsp. (2022), hodując szczep *Weissella* sp. IBB3394 na podłożu MRS. Wyniki testu BrdU wykazały, że szczep IBB3394 silnie hamował aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych Caco-2 (Fig. 5).

**Przykład 7. Badanie szczepu IBB3394 (KKP 2094p) pod kątem aktywności antagonistycznej względem niepożądanych w pieczywie bakterii przetrwalnikujących (*Bacillus cereus*, *Bacillus brevis* i *Lysinibacillus fusiformis*)**

Aktywność antagonistyczną szczepu IBB3394 (KKP 2094p) zbadano względem bakterii przetrwalnikujących, psujących pieczywo zgodnie z metodą opisaną dla szczepów wyizolowanych z zakwasu żytniego (Litwinek i wsp., 2022). W tym celu zaszczepiono podłoże płynne Luria-Bertani (LB) (Difco Laboratories, Franklin Lakes, New Jersey, USA) bakteriami wskaźnikowymi przetrwalnikującymi (*Bacillus cereus*, *Bacillus brevis* i *Lysinibacillus fusiformis*) i hodowano przez noc. Następnie hodowle nocne użyto do zaszczepienia upłynnionej i ostudzonej pożywki stałej LB, którą natychmiast wylano na szalkę. Po zastygnięciu podłoża, 5 µl badanego szczepu wyhodowanego na podłożu płynnym MRS naniesiono na wybrane miejsca na szalce. Płytki pozostawiono do wchłonięcia kropli i inkubowano przez noc w temperaturze 30 °C. Antagonizm w stosunku do szczepu uwidocznił się przez obserwację strefy zahamowania wzrostu. Obecność strefy zahamowania oznaczano jako „++”, „+” lub „+/-”, w zależności od wielkości, natomiast brak aktywności antagonistycznej oznaczano jako „-”. Uzyskany wynik porównano z wynikami otrzymanymi dla szczepów *Weissella* sp. wyizolowanych z zakwasów z mąki żytniej (Litwinek i wsp., 2022). Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że szczep IBB3394 (KKP 2094p) przejawia aktywność antagonistyczną ocenioną na „+” względem wszystkich szczepów wskaźnikowych, w tym unikalną wobec szczepu *Lysinibacillus fusiformis*. Aktywność ta była wyższa niż dla szczepów wyizolowanych z zakwasu żytniego, dla których zaobserwowano nieco słabsze hamowanie wzrostu *Bacillus brevis* przez wszystkie badane szczepy, aktywność antagonistyczną wobec *Bacillus cereus* dla 4 z 7 szczepów i brak takiej aktywności względem *Lysinibacillus fusiformis*.

**Przykład 8. Charakterystyka egzopolisacharydu (EPS) wytwarzanego przez IBB3394 (KKP 2094p)**

Oznaczenie wydajności produkcji egzopolisacharydu (EPS) przez IBB3394 przeprowadzono dla szczepu hodowanego na podłożu MRS bez dekstrozy zawierającym dodatek 5% lub 10% sacharozy. Produkcję, a następnie ekstrakcję, rozdział i charakterystykę EPS wykonano zgodnie z metodą opisaną przez Buksa i wsp. (2021). Wyniki analizy wydajności produkcji oraz charakterystykę EPS przedstawiono w Tabeli 5. Wydajność produkcji surowego EPS dla szczepu IBB3394 była wyższa na podłożu z 10% sacharozą i

wyniosła blisko 50 g/l. W wyniku rozdziatu surowego EPS na kolumnach SEC wykryto frakcję o wysokiej masie molowej, którą zidentyfikowano jako dekstran.

**Tabela 5.** Wydajność produkcji surowego egzopolisacharydu (EPS) i udział procentowy reszt cukrowych po kwasowej hydrolizie preparatu surowego EPS.

Szczep	Wydajność produkcji EPS w podłożu z sacharozą (g s.m./l)	Udział reszt cukrowych po hydrolizie kwasowej (%)				
		Glc	Gal	Man	Fru	Suma
<i>EPS wytworzony w obecności 5% sacharozy w podłożu produkcyjnym</i>						
IBB3394	<b>26.4±0.8</b>	95.6±0.8	0.4±0.1	0.6±0.8	0.3±0.1a	<b>96.9±0.8</b>
<i>EPS wytworzony w obecności 10% sacharozy w podłożu produkcyjnym</i>						
IBB3394	<b>48.9±0.9</b>	94.9±0.8	0.5±0.2	0.5±0.8	0.3±0.2a	<b>96.2±0.8</b>

**Przykład 9.** Badania wpływu EPS produkowanego przez *Weissella* sp. IBB3394 (KKP 2094p) na *S. aureus* IBB4005 i *L. lactis* IL1403

Ocenę aktywności antagonistycznej EPS wytwarzanego przez szczep IBB3394, przeprowadzono metodą podobną do opisanej dla oznaczenia aktywności antagonistycznej szczepów *Weissella* sp. w **Przykładzie 2**. W tym przypadku na szalki ze szczepami wskaźnikowymi nakraplano określone stężenia (20, 10, 5, 2,5, 0 mg/ml) świeżego i przechowywanego przez 6 miesięcy w warunkach chłodniczych EPS wobec kontroli pozytywnych - nizyny w różnych stężeniach (100, 50, 20, 10, 5, 2,5 mg/ml). Wyniki uzyskane w odniesieniu do różnych stężeń nizyny wskazują, że EPS z *Weissella* IBB3394 dla większości badanych stężeń nie hamował wzrostu *S. aureus* (**Fig. 6a**), z wyjątkiem stężenia 20 mg/ml, które wykazywało bardzo niewielkie zahamowanie. Ponadto zaobserwowano, że żadne stężenie EPS nie hamowało wzrostu *L. lactis* IL1403 (**Fig. 6b**).

**Przykład 10.** Badanie cytotoksyczności egzopolisacharydu (EPS) izolowanego z hodowli szczepu *Weissella* sp. IBB3394 (KKP 2094p)

Badanie przeprowadzono według metody opisanej przez Vosough et al., 2021, z modyfikacjami. Linie komórkowe gruczołakoraka Caco-2 (ATCC HTB-37) oraz komórki embrionalne nabłonka nerki linii HEK293 (ATCC CRL-1573) hodowano w warunkach optymalnych, zalecanych przez ATCC, tj. w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wilgotność 95%. Podłożem (dalej zwanym podłożem dla linii komórkowych) stosowanym w hodowli był MEM (Minimal Essential Medium; Gibco) wzbogacony 10% bydlęcą surowicą płodową, roztworem aminokwasów (NEAA – non-essential amino acid solution) (1X), 1 mM pirogronianem sodu, dodatkiem penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 µg/ml). Liczbę komórek linii komórkowych określano w komorze Thoma. Komórki rozcieńczano w ww. podłożu dla linii komórkowych do uzyskania gęstości 10<sup>5</sup> komórek/ml i наносzono na płytkę 96-dołkową po 100 µl zawiesiny komórek na dołek i inkubowano przez 24 godziny w warunkach optymalnych. Na płytce 96-dołkowej, zawierającej komórki Caco-2 lub HEK293 po 24-godzinnej hodowli znad których uprzednio zebrano pożywkę, nakładano po 100 µl zawiesiny egzopolisacharydu o stężeniach 30, 20, 10, 5 i 2,5 mg/ml w podłożu dla linii komórkowych. Płytki inkubowano 24 godziny w 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> i wilgotności 95%, a następnie oceniano żywotność komórek linii

komórkowych metodą kolorymetryczną przy użyciu komercyjnie dostępnego testu proliferacji Cell Proliferation Kit I, MTT (Roche). Pomiar absorbancji prowadzono przy długościach fali 570 i 680 nm. Doświadczenie wykonywano w 10 powtórzeniach technicznych i 3 powtórzeniach biologicznych. Kontrolę stanowiły hodowle komórek Caco-2 i HEK293 traktowane podłożem bez egzopolisacharydu. Przeżywalność liczone z następującego wzoru:  $Przeżywalność [\%] = \frac{OD\ próbki}{OD\ kontroli} \cdot 100\%$ , natomiast cytotoksyczność ze wzoru:  $Cytotoksyczność [\%] = 100\% - Przeżywalność [\%]$ . Ze względu na dużą lepkość zawiesiny egzopolisacharydu, stężenie 30 mg/ml zostało wybrane jako najwyższe możliwe do zastosowania w tym doświadczeniu. Analizy statystyczne przeprowadzono z użyciem testów Shapiro-Wilka i wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

Wyniki przedstawiono na rysunkach (Fig. 7-10). Traktowanie linii komórkowych stężeniami egzopolisacharydu od 2,5 do 30% nie spowodowało istotnego statystycznie zahamowania proliferacji, tym samym potwierdzając brak cytotoksyczności badanego EPS.

#### **Przykład 11. Test wrażliwości na antybiotyki**

Ocenę bezpieczeństwa wybranego szczepu *Weissella* sp. IBB3394 przeprowadzono wykonując oznaczenie antybiotykowrażliwości przy użyciu pasków E-test (bioMérieux) zgodnie z zaleceniami producenta. Badany szczep wysiano na podłoże stałe IST-MRS i inkubowano w temperaturze 30 °C w warunkach tlenowych. Uzyskane kolonie wykorzystano do przygotowania zawiesiny bakteryjnej w PBS o OD600nm = 0,25 – skala McFarlanda 1, którą następnie rozprowadzano wymazówką po powierzchni szalek w różnych kierunkach, w celu zapewnienia, równomiernego rozprowadzenia szczepu. Na powierzchni szalki umieszczono paski z antybiotykiem i płytki inkubowano w temperaturze 30 °C przez 48 h w warunkach tlenowych. Wykonano oznaczenie oporności szczepu na 9 antybiotyków (zgodnie z zaleceniami EFSA): ampicylinę (AM), wankomycynę (VA), gentamycynę (GM), kanamycynę (KM), streptomycynę (SM), erytromycynę (EM), klindamycynę (CM), tetracyklinę (TC) i chloramfenikol (CL).

Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 6. Wykazano, że minimalne stężenie hamujące (MIC) w stosunku do wszystkich badanych antybiotyków było poniżej wartości granicznych rekomendowanej przez EFSA.

**Tabela 6.** Wyniki badania wrażliwości szczepu IBB3394 (KKP 2094p) na antybiotyki.

Antybiotyk	Minimalne stężenie hamujące (MIC) [µg/ml]	Stężenia graniczne MIC rekomendowane przez EFSA [µg/ml]	
	IBB3394	Lactobacillus heterofermentatywne	Leuconostoc spp.
AM	0,38-0,5	2	2
VA	>256	*	*
GM	4	16	16
KM	16	32	16

SM	8	64	64
EM	0,094	1	1
CM	0.016	1	1
TC	2	8	8
CL	2-3	4	4

\* Nie wymagane (oporność naturalna)

### **Przykład 12. Analiza genomu szczepu IBB3394 (KKP 2094p)**

Ze szczepu *Weissella* IBB3394 wyizolowano DNA, który następnie został poddany sekwencjonowaniu całego genomu w Środowiskowej Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy DNA w IBB PAN z wykorzystaniem platformy Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, USA) i sekwenatora GridION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Wielka Brytania).

Do analizy bioinformatycznej wykorzystano różne serwery, oprogramowanie i bazy danych. Serwis RAST został wykorzystany do oznaczenia sekwencji kodujących (CDS) i niekodującego RNA (Aziz i in., 2008). Ogólna analiza sekwencji genomowej szczepu IBB3394 wykazała, że szczep posiada kolisty chromosom DNA o wielkości 2 488 843 bp i 44,8% zawartości GC, podczas gdy liczba całkowitych sekwencji kodujących (CDS) wynosiła 2 313. Analiza sekwencji genomu szczepu wykazała, że należy on do gatunku *Weissella cibaria*. Do analizy funkcjonalnej genów wykorzystano bazę danych KEGG (Kanehisa i in., 2022) oraz automatyczną usługę adnotacji BlastKOALA (Kanehisa i in., 2016). Stwierdzono, że szczep koduje 172 różne szlaki metaboliczne. Wśród 30 kompletnych modułów szlaków znaleziono m.in. kompletne szlaki biosyntezy witamin, takich jak ryboflawina (witamina B12) i menachinon (witamina K2) oraz szlak odzyskiwania tiaminy (witamina B1). Analizę bezpieczeństwa przeprowadzono poprzez wyszukanie domniemanych czynników wirulencji za pomocą narzędzia VirulenceFinder. Ocenę przeprowadzono porównując sekwencje całego genomu IBB3394 ze znanymi genami wirulencji *Enterococcus*, *E. coli*, *S. aureus* i *Listeria*. Wynik wskazuje, że w genomie IBB3394 nie ma genów wirulencji. W rezultacie stwierdzono, że IBB3394 nie posiada żadnych toksycznych ani patogennych genów związanych z dobrze znanymi patogenami *Enterococcus*, *E. coli*, *S. aureus* i *Listeria*. Wynik został również potwierdzony przez analizę sekwencji całego genomu przy użyciu innego serwera sieciowego do przewidywania patogenności bakterii – PathogenFinder. To narzędzie nie sklasyfikowało szczepu IBB3394 jako patogenu. Analiza genomu z wykorzystaniem różnych narzędzi bioinformatycznych rekomendowanych przez EFSA, takich jak ResFinder, CARD i RGI oraz KEGG, nie wykazała w szczepie IBB3394 obecności genów oporności na antybiotyki (ARG). Poprzez analizę sekwencyjną potwierdzono bezpieczeństwo wykorzystania szczepu jako probiotyku oraz szczepu do zastosowań przemysłowych, spożywczych i medycznych.

### **Przykład 13. Wytwarzanie pieczywa na zakwasie zawierającym *Weissella cibaria* IBB3394 (KKP 2094p)**

Pieczywo z dodatkiem drożdży piekarskich wytworzono z wykorzystaniem mąki żytniej pełnoziarnistej.

Do wytworzenia zakwasów wykorzystano opisaną w patencie PL238153B1 kulturę starterową zawierającą szczepy *Lactobacillus plantarum* B/00117, *Lactobacillus plantarum* B/00118 i *Lactobacillus brevis* w proporcji 1:1:1 jako kontrolę oraz ten sam zestaw uzupełniony o szczep *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) w proporcji 1:1:1:1 jako próbie badanej.

Zakwasy wytworzono jak w Przykładzie 3 opisanym w patencie PL238153B1.

Pieczywo przygotowano według następującej receptury (dla chlebów o wadze 0,5 kg).

Przygotowanie surowców i ich ilości na około 1 kg ciasta:

– mąka żytnia typ 2000	0,5 kg
– zakwas z mąki żytniej typ 2000	0,17 kg
– drożdże piekarskie	0,006 kg
– sól	0,012 kg
– woda (temp. 38°C)	około 0,31 kg

Wytwarzanie i sporządzanie ciasta właściwego

– czas miesienia – wolne obroty	7 min.
– czas miesienia – szybkie obroty	3 min.
– temperatura ciasta właściwego	do 35 °C

Dzielenie, formowanie, kształtowanie ciasta właściwego

– masa kęsa	0,5 kg
– czas dzielenia i kształtowanie ciasta na kęsy	45 min.
– czas fermentacji ciasta właściwego w kęsach	do 90 min.

Proces wypieku

– temperatura wypieku:	200 °C
– czas wypieku	60 min.

Do oceny pieczywa stosowano metody opisane w PL238153B1. Otrzymane pieczywo poddano ocenie organoleptycznej wg PN-A-74108:1996, analizę przeprowadzono metodą punktową przez panel o sprawdzonej wrażliwości sensorycznej. Po wypieczeniu wykonano analizę wilgotności miększu oraz profilu tekstury miększu upieczonych chlebów. Dla wytworzonego pieczywa wyznaczono również trwałość mikrobiologiczną. Otrzymane chleby przechowywano przez 7 dni w celu określenia zmian zachodzących podczas starzenia się pieczywa.

Dla chleba z dodatkiem zakwasu wytworzonego z *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) zaobserwowano zwiększoną elastyczność miększu z zachowaniem chrupkości skórki chleba, polepszenie smaku i zapachu otrzymanego chleba w porównaniu do kontroli. Pieczywo z dodatkiem *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) charakteryzowało się zwiększoną objętością bochenka i wyższą wilgotnością miększu, znacząco mniejszą twardością i żujnością miększu w porównaniu do pieczywa kontrolnego. Pieczywo na zakwasie suplementowanym *W. cibaria* IBB3394 (KKP 2094p) wykazuje taką samą trwałość mikrobiologiczną (przez 3 dni) jak pieczywo kontrolne. Otrzymane pieczywo uzyskało wyższą ocenę organoleptyczną od pieczywa kontrolnego.

## LITERATURA:

[1] Aziz i wsp. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1):1-15. [2] Badel i wsp. (2011). New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides, *Biotechnol Adv*, 29:54–66. [3] Baruah i wsp. (2016). Functional food applications of dextran from *Weissella cibaria* RBA12 from pummelo (*Citrus maxima*). *Int J Food Microbiol*, 242:124–31. [4] Boyce i Havill (2005). Nosocomial antibiotic-associated diarrhea associated with enterotoxin-producing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Gastroenterol*, 100:1828–34. [5] Boyce i wsp. (2007). Widespread environmental contamination associated with patients with diarrhea and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of the gastrointestinal tract. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 28:1142–7. [6] Buksa i wsp. (2021). Extraction, purification and characterisation of exopolysaccharides produced by newly isolated lactic acid bacteria strains and the examination of their influence on resistant starch formation. *Food Chem*, 362, 130221. [7] Collins i wsp. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J Appl Bacteriol*, 75:595–603. [8] Dey i Kang (2020). *Weissella confusa* DD\_A7 pre-treatment to zebrafish larvae ameliorates the inflammation response against *Escherichia coli* O157: H7. *Microbiol Res*, 237, 126489. [9] EFSA (2018) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA J* 16(3), e05206. [10] EL-Adawi i wsp. (2012). Cytotoxicity assay and antioxidant activities of the lactic acid bacterial strains. *African J Microbiol Res*, 6(8):1700-12. [11] Elshagabee i wsp. (2020). Effect of oral administration of *Weissella confusa* on fecal and plasma ethanol concentrations, lipids and glucose metabolism in wistar rats fed high fructose and fat diet. *Hepatic Med*, 12:93–106. [12] Han i wsp. (2016). Improvement of the texture of yogurt by use of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria, *BioMed Res Int*, 7945675. [13] Hu i Gänzle (2018) Effect of temperature on production of oligosaccharides and dextran by *Weissella cibaria* 10 M. *Int J Food Microbiol* 280:27-34. [14] Jin i wsp. (2019). Isolation and characterization of high exopolysaccharide-producing *Weissella confusa* VP30 from young children's feces. *Microbiol Cell Factories*, 18, 110. [15] Kang i wsp. (2019). Safety evaluation of oral care probiotics *Weissella cibaria* CMU and CMS1 by phenotypic and genotypic analysis. *Int J Mol Sci*, 20(11), 2693. [16] Kanehisa i wsp. (2022). KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein Science*, 31(1):47-53. [17] Kanehisa i wsp. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J Mol Biol*, 428(4):726-31. [18] Kavitake i wsp. (2020). Overview of exopolysaccharides produced by *Weissella* genus – A review. *Int J of Bioll Macromol*, 164:2964-73. [19] Kavitake, i wsp. (2016). Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food. *International journal of biological macromolecules*, 86, 681-689. [20] Kim i wsp. (2008). Characterization of exopolysaccharide (EPS) produced by *Weissella hellenica* SKkimchi3 isolated from kimchi. *J Microbiol*, 46(5):535-41. [21] Lan i wsp. (2012). Bio-protective potential of lactic acid bacteria isolated from fermented wax gourd. *Folia Microbiol*, 57(2):99-105. [22] Le i wsp. (2020). Synbiotic fermented soymilk with *Weissella cibaria* FB069 and xylooligosaccharides prevents proliferation in human colon cancer cells. *J Appl Microbiol*, 128(5):1486-96. [23] Lee i wsp. (2012). Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe*, 18:96-102. [24] Lee i wsp. (2015). Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. *LWT- Food Sci Technol*, 64:1036–1041. [25] Lim, i wsp. (2018). Characterization of antibacterial cell-free supernatant from oral care probiotic *Weissella cibaria*, CMU. *Molecules*, 23(8), 1984. [26] Litwinek i wsp. (2022). Developing lactic acid bacteria starter cultures for wholemeal rye flour bread with improved functionality, nutritional value, taste, appearance and safety. *PLoS ONE* 17(1), e0261677. [27] Lynch i wsp. (2018). Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits, *Annu Rev Food Sci Technol*, 9:155-76. [28] Mun i Chang (2020). Characterization of *Weissella koreensis* SK isolated from kimchi fermented at low temperature (around 0 degrees C) based on complete genome sequence and corresponding phenotype. *Microorganisms*, 8, 1147. [29] Ndagano i wsp. (2011). Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food. *J Food Sci*, 76(6):M305-M311. [30] Onanuga i Temedie (2011). Multidrug-resistant intestinal *Staphylococcus aureus* among self-medicated healthy adults in Amassoma, South-South, Nigeria. *J Health Popul Nutr*,

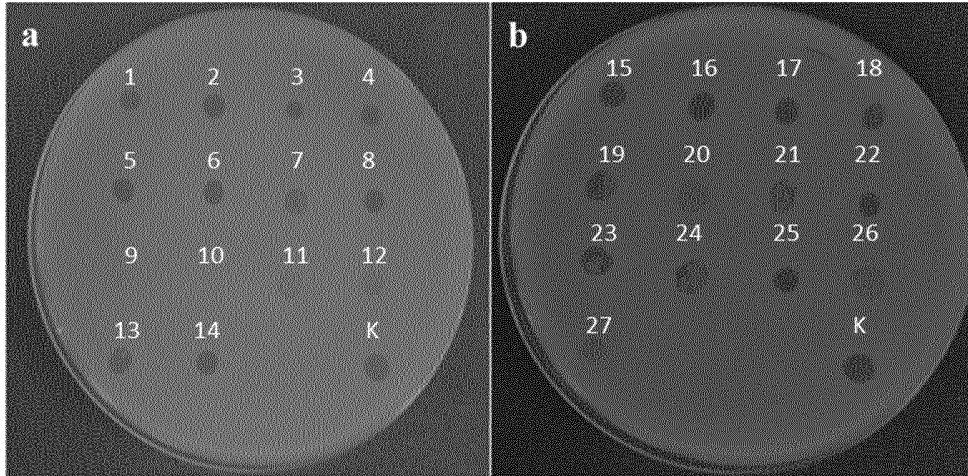
29(5):446-53. [31] Patrone i wsp. (2021). Integrated phenotypic-genotypic analysis of candidate probiotic *Weissella cibaria* strains isolated from dairy cows in Kuwait. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 13(3), 809-23. [32] Prado i wsp. (2020). *Weissella paramesenteroides* WpK4 ameliorate the experimental amoebic colitis by increasing the expression of MUC-2 and the intestinal epithelial regeneration. *J Appl Microbiol*, 129(6): 1706-19. [33] Vosough i wsp. (2021). Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of exopolysaccharide from *Enterococcus* strains isolated from traditional Iranian Kishk. *Food Measure*, 15:5221-30. [34] Saadat i wsp. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides, *Carbohydr Polym*, 217:79–89. [35] Sałański i wsp. (2022). Health-promoting nature of *L. lactis* IBB109 and IBB417 strains exhibiting proliferation inhibition and stimulation of interleukin-18 expression in colorectal cancer cells-insights at physiological and genomic level. *Front Microbiol*, 1825. [36] Sandes i wsp. (2020). *Weissella paramesenteroides* WpK4 plays an immunobiotic role in gut-brain axis, reducing gut permeability, anxiety-like and depressive-like behaviors in murine models of colitis and chronic stress. *Food Res Int*, 137, 109741. [37] Sokołowska-Wojdyło (2021). Infekcje gronkowcowe skóry – problem wciąż aktualny. *Wiadomości dermatologiczne* 11, 24 września 2021 [38] Tao i wsp. (2017). Database and bioinformatics studies of probiotics. *J Agric Food Chem*, 65(35): 7599–606. [39] Teixeira i wsp. (2021). *Weissella*: an emerging bacterium with promising health benefits. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 13:915-25. [40] Torino i wsp. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. [Review]. *Front Microbiol*, 6, 834. [41] Valerio i wsp. (2020). Effect of Amaranth and Quinoa Flours on exopolysaccharide production and protein profile of liquid sourdough fermented by *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Front Microbiol* 11, 967. [42] Vasanthakumari i wsp. (2015). Physicochemical characterization of an exopolysaccharide produced by a newly isolated *Weissella cibaria*. *Appl Biochem Biotechnol*, 176(2):440-53. [43] Wolter i wsp. (2014) Evaluation of exopolysaccharide producing *Weissella cibaria* MG1 strain for the production of sourdough from various flours. *Food Microbiol* 37:44-50. [44] Xu i wsp. (2017). In situ synthesis of exopolysaccharides by *Leuconostoc* spp. and *Weissella* spp. and their rheological impacts in fava bean flour. *Int J Food Microbiol*, 248:63-71. [45] Yeu i wsp. (2021). Antimicrobial and antibiofilm activities of *Weissella cibaria* against pathogens of upper respiratory tract infections. *Microorganisms*, 9(6), 1181. [46] Yildiz i Karatas (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72:41-6. [47] Yu i wsp. (2019a). Antagonistic and antioxidant effect of probiotic *Weissella cibaria* JW15. *Food Sci Biotechnol*, 28:851-5. [48] Yu i wsp. (2019b). Anti-Inflammatory potential of probiotic strain *Weissella cibaria* JW15 isolated from kimchi through regulation of NF- $\kappa$ B and MAPKs pathways in LPS-induced RAW 264.7 cells. *J Microbiol Biotechnol*, 29:1022-32. [49] Zeidan i wsp. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: From genes to industrial applications. *FEMS Microbiol Rev*, 41(Supp\_1):S168–S200. [50] Zhang i wsp. (2018) Characterization of a yogurt-quality improving exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* AR333, *Food Hydrocoll*, 81:220-8. [51] Zhou i wsp. (2018) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure, bioactivity and associations: a review, *Carbohydr Polym*, 207:317-32.

**ZASTRZEŻENIA PATENTOWE**

1. Nowy szczep bakterii *Weissella cibaria*, zdeponowany w IAFB (Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS-PIB im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie, Polska) pod nr depozytu KKP 2094p.
2. Kompozycja zawierająca nowy szczep bakterii *Weissella cibaria*, zdeponowany w IAFB pod nr depozytu KKP 2094p.
3. Kompozycja według zastrz. 2, **znamienna tym, że** jest kompozycją farmaceutyczną zawierającą ponadto dopuszczalny farmaceutycznie nośnik, przy czym korzystnie kompozycja jest w postaci płynnej, stałej, proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego.
4. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca szczep bakterii *Weissella cibaria* jak określony w zastrz. 1 i/lub kompozycję jak określoną w zastrz. 3 oraz dopuszczalny farmaceutycznie nośnik do zastosowania jako lek.
5. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 4, **znamienna tym, że** jest do zastosowania jako lek do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita, korzystnie do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita grubego, najkorzystniej gruczolakoraka jelita grubego.
6. Suplement diety zawierający szczep bakterii *Weissella cibaria* jak określony w zastrz. 1 i/lub kompozycję jak określoną w zastrz. 3, przy czym suplement diety korzystnie jest w postaci płynnej, stałej, proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego.
7. Preparat probiotyczny zawierający szczep bakterii *Weissella cibaria* jak określony w zastrz. 1 i/lub kompozycję jak określoną w zastrz. 3, przy czym preparat probiotyczny korzystnie ponadto zawiera substancje prebiotyczne, korzystnie wybrane z oligosacharydów, polisacharydów, fruktooligosacharydów, laktulozy, inuliny, skrobi odpornej, celulozy, hemicelulozy i pektyn, przy czym preparat korzystnie ponadto zawiera postbiotyki, korzystnie postbiotyki wybrane są z krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, enzymów, lipopolisacharydów, kwasów teichojowych, witamin, kwasu masłowego, octanu, propionianu, dipeptydu muramilu, indlu, kwasu teichowego, laktocepin.
8. Preparat probiotyczny według zastrz. 7, **znamienny tym, że** jest w postaci w postaci płynnej, stałej, proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego.
9. Bakteryjna kultura starterowa do wyrobu pieczywa, **znamienna tym, że** w jej skład wchodzi szczep *Weissella cibaria* jak określony w zastrz. 1.
10. Zakwas do wyrobu pieczywa, **znamienny tym, że** zawiera bakteryjną kulturę starterową jak określoną w zastrz. 9.
11. Sposób wytwarzania pieczywa **znamienny tym, że** obejmuje etap dodawania bakteryjnej kultury starterowej jak określonej w zastrz. 9 i/lub zakwasu jak określonego w zastrz. 10.

- 12.** Pieczywo, **znamiennie tym, że** zawiera bakteryjną kulturę starterową jak określoną w zastrz. 9 i/lub zakwas jak określony w zastrz. 10.
- 13.** Sposób mikrobiologicznego wytwarzania dekstranu, **znamienny tym, że** obejmuje etap, w którym szczep bakterii *Weissella cibaria* jak określony w zastrz 1 i/lub kompozycję jak określoną w zastrz. 2 hoduje się na płynnym podłożu bez dekstrozy (bez glukozy) z dodatkiem sacharozy, organicznym źródłem azotu zawierającym aminokwasy i krótkie peptydy, witaminy z grupy B i sole mineralne.
- 14.** Sposób według zastrz. 13, **znamienny tym, że** hodowlę prowadzi się na podłożu MRS (bulion DeMan-Rogosa-Sharpe), podłożu dla bakterii mlekowych, korzystnie z dodatkiem 5-10%±2 wag. sacharozy.
- 15.** Preparat bakteryjny zawierający szczep bakterii *Weissella cibaria* jak określonej w zastrz 1 i/lub kompozycję jak określoną w zastrz. 2 do zastosowania jako składnik czynny w probiotyku, preparacie terapeutycznym, żywności funkcjonalnej, suplementcie diety, do zastosowania jako składnik aktywny leku przeznaczonego do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita, korzystnie nowotworu jelita grubego.
- 16.** Zastosowanie szczepu bakterii *Weissella cibaria* jak określonego w zastrz 1 i/lub kompozycji jak określonej w zastrz. 2 jako dodatku funkcjonalnego w żywności funkcjonalnej, dodatku funkcjonalnego do napoju spożywczego, jako składnika aktywnego preparatu probiotycznego, preparatu bakteryjnego, suplementu diety, kompozycji farmaceutycznej.
- 17.** Zastosowanie szczepu bakterii *Weissella cibaria* jak określonego w zastrz 1 i/lub kompozycji jak określonej w zastrz. 2 w przemyśle spożywczym jako emulgator, zagęszczacz, stabilizator lub polepszacz tekstury produktu spożywczego.
- 18.** Zastosowanie szczepu bakterii *Weissella cibaria* jak określonego w zastrz 1 i/lub kompozycji jak określonej w zastrz. 2 do mikrobiologicznego wytwarzania egzopolisacharydów (EPS), korzystnie dekstranu.
- 19.** Zastosowanie szczepu bakterii *Weissella cibaria* jak określonego w zastrz 1 i/lub kompozycji jak określonej w zastrz. 2 i/lub bakteryjnej kultury starterowej jak określonej w zastrz. 9 do wytwarzania zakwasu do pieczywa.
- 20.** Zastosowanie szczepu bakterii *Weissella cibaria* jak określonego w zastrz 1 i/lub kompozycji jak określonej w zastrz. 2 i/lub zakwasu do wyrobu pieczywa jak określonego w zastrz. 10 do wytwarzania pieczywa.

**FIG. 1**



**FIG. 2**

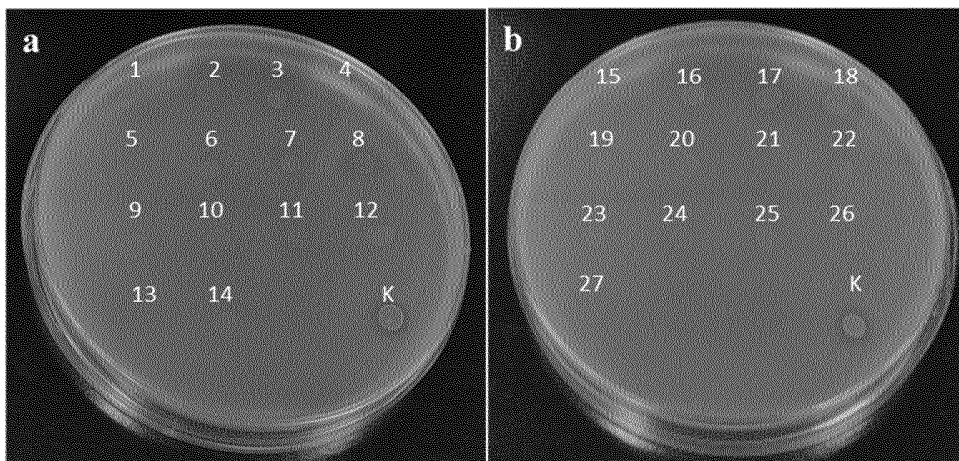


FIG. 3

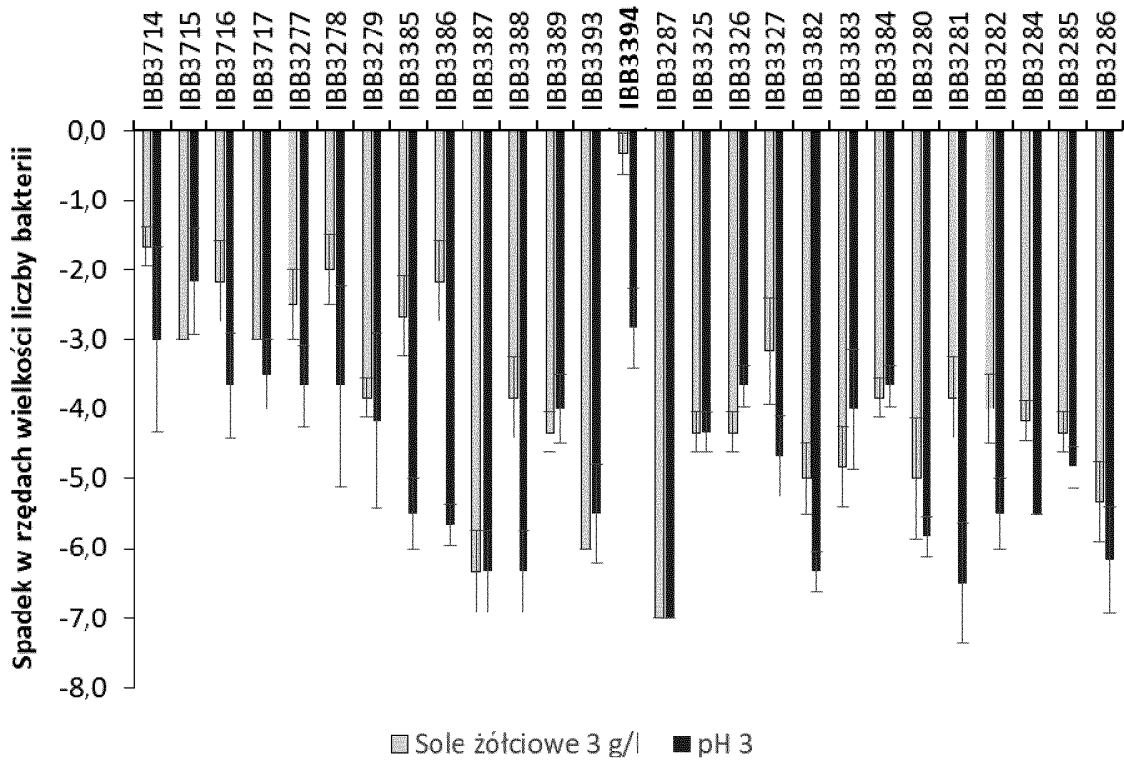


FIG. 4

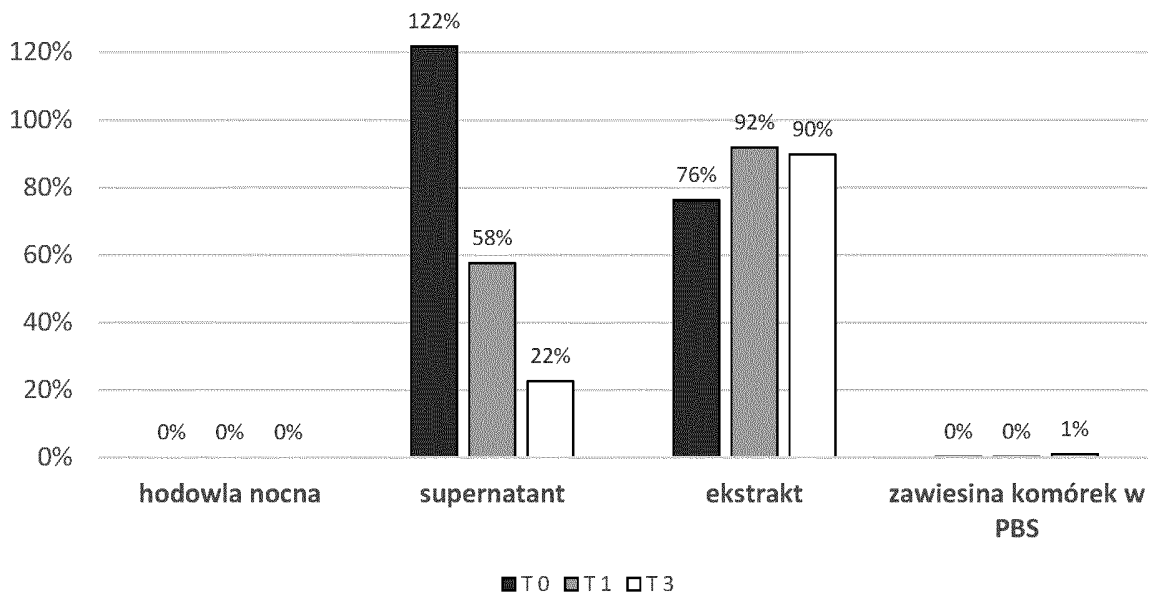


FIG. 5

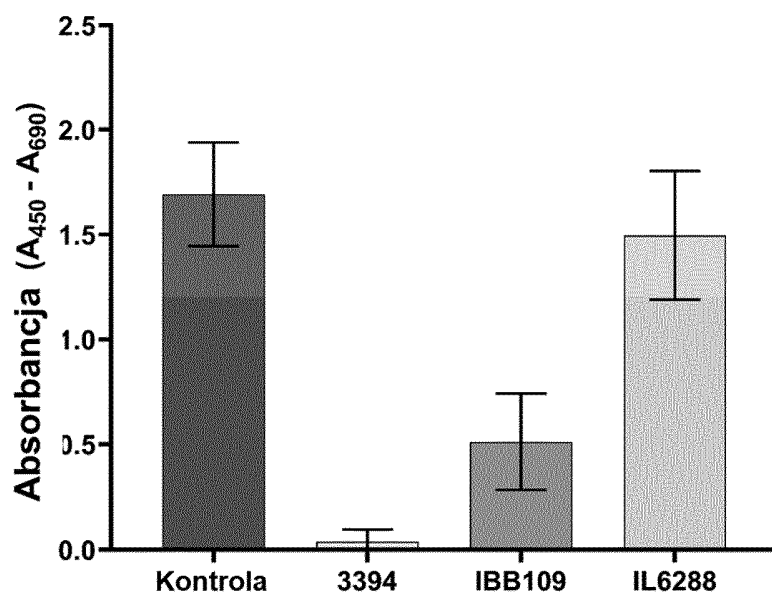


FIG. 6

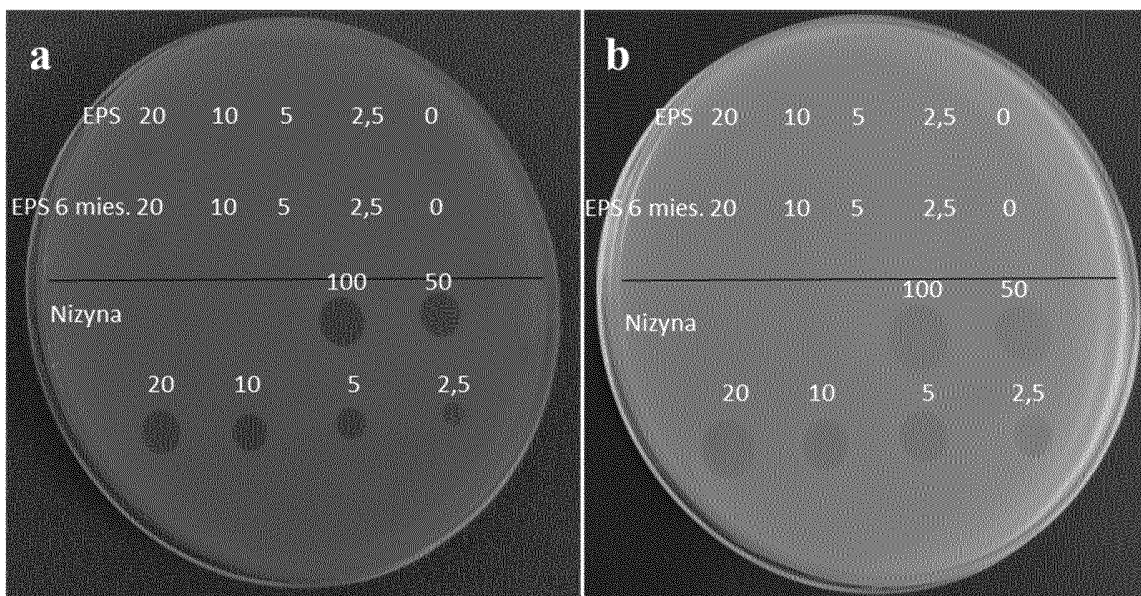


FIG. 7

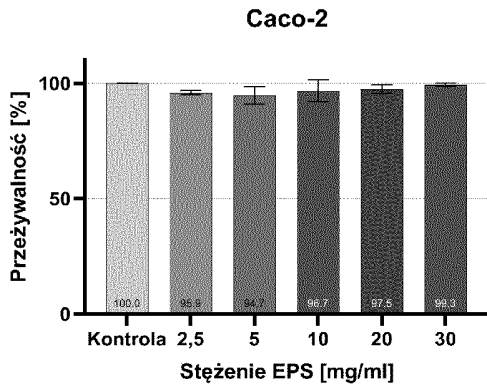


FIG. 8

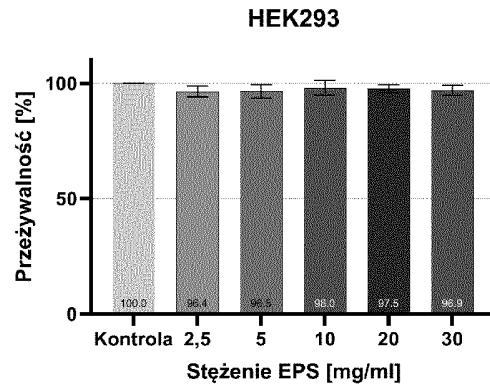


FIG. 9

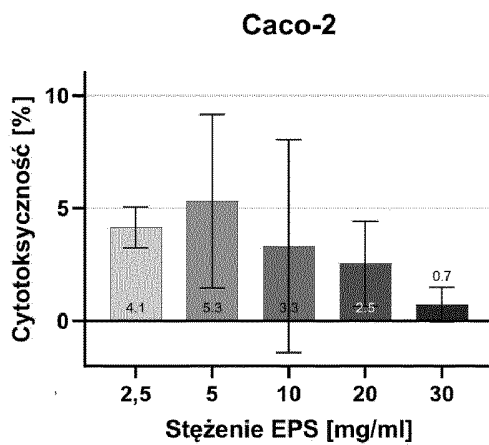
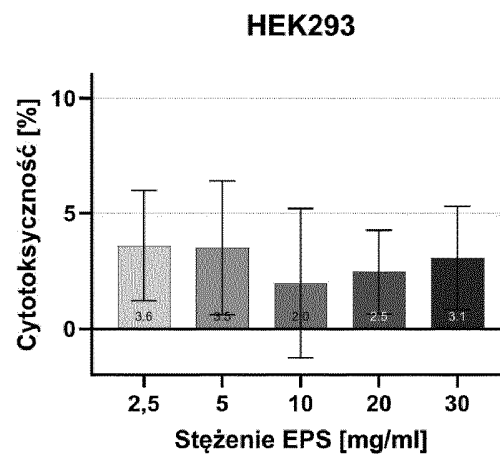


FIG. 10





## SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.443929

Klasyfikacja zgłoszenia: C12N 1/20, C12R 1/01, A61K 35/744, A61K 31/721, A61P 35/00, C12P 19/08, A21D 8/04, A21D 13/06

Podklasy w których prowadzono poszukiwania: C12N1 C12R1 A61K35 A61K31 A61P35 C12P19 A21D8 A21D13

Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: EPODOC WPI bazy UPRP STN

Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	PL411242 A (Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Wacława Dąbrowskiego, Warszawa) 16-02-2015 zastrzeżenia 1-15, przykłady	1-20
A	EP4098271 A1 (LISCURE BIOSCI CO LTD [KR]) 07-12-2022 zastrz. 1-15, Fig. 1-5	1-20
A	EP3895717 A1 (KOREA FOOD RES INST) 20-10-2021 zastrz. 1-3, abstrakt	1-20
A	Ahmed, S.; Singh, S.; Singh, V.; Roberts, K.D.; Zaidi, A.; Rodriguez-Palacios, A., The Weissella Genus: Clinically Treatable Bacteria with Antimicrobial/Probiotic Effects on Inflammation and Cancer, Microorganisms, 2022, 10, 2427, <a href="https://doi.org/10.3390/microorganisms10122427">https://doi.org/10.3390/microorganisms10122427</a> abstrakt, str. 10-11	1-20

 Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie

A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie,  
 E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia,  
 L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu,  
 O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób,  
 P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa,  
 T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku,  
 X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie,  
 Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy,  
 & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.

Sprawozdanie wykonał/-a:

 Ewa Waszkowska  
 Ekspert

Data:

29.05.2023

Podpis:

 /podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/  
 Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o zastrz. z dnia 28.02.2023r.