

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **234248**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **415670**

(51) Int.Cl.  
**C12N 11/12 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **08.01.2016**

---

(54) **Sposób immobilizacji mikroorganizmów na i/lub w celulozie bakteryjnej**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**17.07.2017 BUP 15/17**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**31.01.2020 WUP 01/20**

(73) Uprawniony z patentu:  
**ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET  
TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE,  
Szczecin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:  
**KAROL FIJAŁKOWSKI, Szczecin, PL  
DOROTA PEITLER, Łębork, PL  
ANNA ŻYWICKA, Łobez, PL  
RAFAŁ RAKOCZY, Szczecin, PL**

(74) Pełnomocnik:  
**rzecz. pat. Renata Zawadzka**

---

**PL 234248 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób immobilizacji mikroorganizmów na i/lub w celulozie bakteryjnej biosyntetyzowanej przez bakterie z gatunku *Gluconacetobacter xylinus* metodą hodowli stacjonarnej lub z wytrząsaniem.

Probiotyki definiowane są jako żywe mikroorganizmy, które wprowadzone w odpowiednich ilościach wywołują pożądany efekt w organizmie człowieka. Definicja Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) precyzuje, że probiotyki są żywymi mikroorganizmami, głównie bakteriami, które podawane w odpowiednich ilościach powodują dobroczynne działanie na gospodarza. Z zapisu w Dzienniku Ustaw (EC 11.09.1996 WC 263/3) wynika, że za szczepy probiotyczne uważa się drobnoustroje przynależne do 15 rodzajów drobnoustrojów, w tym 11 gatunków bakterii, 3 gatunków drożdży i 1 gatunku pleśni. Do grupy bakterii probiotycznych zalicza się bakterie kwasu mlekowego (*Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.* i *Pediococcus spp.*), drożdże i pleśnie (*Saccharomyces spp.* i *Aspergillus spp.*), bakterie z rodzaju (*Bifidobacterium spp.*, *Bacillus spp.* i *Clostridium spp.*), a także *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* i *E. faecalis*.

Mikroorganizmy probiotyczne pozytywnie wpływają na jelitową florę bakteryjną i ogólny stan organizmu (obniżają poziom cholesterolu; wzmagają tolerancję laktozy; zapobiegają nowotworom, biegunkom; modulują aktywność układu odpornościowego). Jednak skuteczność korzystnego oddziaływania probiotycznych szczepów bakterii probiotycznych na organizm człowieka lub zwierząt jest uwarunkowany wieloma czynnikami. Ważna jest również właściwa selekcja i dobór szczepów probiotycznych oraz systematyczne dostarczanie organizmowi dużej ich liczby w postaci żywych komórek.

Powszechnie stosowaną metodą wprowadzania różnego typu substancji aktywnych biologicznie i mikroorganizmów do organizmu jest metoda doustna (per os). W tego typu metodzie substancja aktywna może być wchłaniana w żołądku i jelicie, bądź tylko w jelicie. W efekcie wchłaniane substancje transportowane są do układu krwionośnego, osiągając wysokie stężenie we krwi przez określony czas. Innowacje w tej terapii polegają na transporcie biologicznie aktywnych cząstek do właściwego miejsca w organizmach żywych oraz ich uwalnianiu, najkorzystniej w kontrolowany sposób. Systemy opierające się na immobilizacji aktywnego biologicznie materiału w częściowo przepuszczalnych nośnikach dają medycynie i dietetyce nowe możliwości oraz pozwalają na opracowywanie nowych metod podawania leków, substancji odżywczych lub suplementów diety.

W praktyce mikroorganizmy są unieruchamianie na powierzchni nośnika lub wewnątrz nośnika, który może być w postaci kapsułek. W obrębie metod unieruchomienia na powierzchni nośnika wyróżnia się adsorpcję i adhezję, polegające na wytworzeniu pomiędzy nośnikiem a substancją aktywną wiązań jonowych, wodorowych, hydrofobowych, sił elektrostatycznych, sił van der Waalsa lub kombinacji tych sił. W tym przypadku nośnik wprowadza się do roztworu z materiałem biologicznym w celu osadzania na nim komórek mikroorganizmów. Proces ten może być wspomagany mieszaniem lub wytrząsaniem. W przypadku unieruchamiania substancji probiotycznych wewnątrz nośnika stosuje się hydrożelowe kapsułki, wykonane najczęściej z alginianu, karagenu lub agarozy.

Powszechnie stosowana metoda doustna podawania preparatów probiotycznych cechuje się wieloma niedogodnościami. Przykładowo, probiotyki muszą pokonać barierę w postaci soków trawiennych w żołądku lub żółci w jelicie. Niekorzystnym zjawiskiem związanym z doustnym podawaniem mikroorganizmów probiotycznych jest również możliwość ich uszkodzenia podczas wędrówki przez układ trawienny. Dlatego też, poszukiwanie odpowiedniego materiału w celu unieruchamiania na powierzchni lub enkapsulacji materiału probiotycznego jest obecnie kluczowym problemem.

Nośnik do enkapsulacji tego typu substancji powinien charakteryzować się nietoksycznością, łatwością obróbki oraz stosunkowo niskim kosztem wytwarzania, jak również biogodnością. Ponadto materiał taki powinien cechować się odpornością na środowiska kwaśne i zasadowe oraz na aktywność różnego rodzaju enzymów, czy reakcji zachodzących w organizmie. W przypadku dojelitowego dostarczania mikroorganizmów probiotycznych za pomocą kapsułek, stosowany materiał powinien być nierozpuszczalny w środowisku kwaśnym oraz rozpuszczalny po odpowiedniej ekspozycji w środowisku zasadowym. Przy terapii doustnej należy maksymalizować również przeżywalność bakterii i ich zdolność do dostarczania substancji odżywczej oraz zapewnić odpowiednie właściwości mechaniczne materiału, który stosowany jest jako nośnik.

Głównym celem immobilizacji materiału probiotycznego jest uzyskanie większej żywotności bakterii w produktach kwaśnych (np. jogurtach), czy w ludzkim żołądku (pH ok. 2). W tym celu stosuje się zazwyczaj mikrokapsułkowanie z zastosowaniem polimeru alginianowo-skrobiowego indukowanego

wapniem (Godward G., Kailasapathy K., Milk Science International, 58, 2003, 396–399; Sultana K., et al., International Journal of Food Microbiology, 62, 2000, 47–55), karagenianów indukowanych potasem (Adhikari K., et al., Journal of Dairy Science, 83, 2000, 1946–1951) lub kapusłkowanie w podłożach na bazie białek serwatkowych (Picot A., Lacroix Ch., International Dairy Journal, 14, 2004, 505–515). Wszystkie te metody pozwoliły na wydłużenie czasu żywotności w warunkach ekstremalnych (pH ok. 2).

Jako nośnik dla mikroorganizmów probiotycznych może być zastosowana celuloza bakteryjna. Cechuje się ona wysoką czystością, wytrzymałością mechaniczną, zdolnością chłonięcia cieczy, biogodnością z żywą tkanką, porowatością oraz elastycznością. Celuloza bakteryjna jest również nietoksyczna oraz można stosować ją jako dodatek do żywności. Właściwości te otwierają wiele możliwości praktycznego zastosowania celulozy bakteryjnej m.in. jako nośnik dla organizmów probiotycznych. Celulozę bakteryjną otrzymuje się sposobem, który polega na zaszczepieniu na wysterylizowanym oraz wzbogacanym alkoholem etylowym podłożu Herstina-Schramma (zawierającym: glukozę, ekstrakt drożdżowy, pepton bakteryjny, kwas cytrynowy,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) bakterii *Gluconacetobacter xylinus*, przechowywanych na wysterylizowanym i wzbogaconym alkoholem etylowym podłożu o składzie: glukoza, ekstrakt drożdżowy, pepton bakteryjny, kwas cytrynowy,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , agar bakteriologiczny. Następnie przygotowaną hodowlę mieszano przez 15 minut i inkubowano przez 7 dni w temperaturze 28–30°C, ponownie mieszano przez 5 minut i przenoszono tak otrzymane inokulum na świeże podłoże Herstin-Schramm o takim samym składzie w celu hodowli produkcyjnej.

Wykonane z celulozy bakteryjnej membrany mogą być stosowane, jako nośnik/matryca do unieruchamiania różnego typu komórek. Przykładowo w opisie patentu US 8871743 omówiono wynalazek polegający na wytwarzaniu matrycy celulozowej syntetyzowanej przez *G. xylinus*, którą można stosować do immobilizacji mikroorganizmów. Sposób wytwarzania wielowarstwowych matryc z zastosowaniem szczepu *G. xylinus* jest szczegółowo omówiony w patencie CN 100460020. W patencie polskim PL 214828 opisano sposób immobilizowania bakterii *Bacillus subtilis* syntetyzujących proteinazę na nośniku stanowiącą mieszaninę alkoholu poliwinylowego i rozdrobnionej celulozy bakteryjnej otrzymanej na drodze hodowli bakterii *Acetobacter xylinum*. W patencie CN 101967471 opisano metody produkcji celulozy bakteryjnej w formie granulek lub membran, które zastosowano do unieruchamiania enzymów. Enzym na celulozowej matrycy był immobilizowany na bazie oddziaływań fizycznych (metoda adsorpcyjna) lub za pomocą sieciowania. W opisie patentowym CN 102226174 podano metodę immobilizacji drożdży na matrycach celulozowych syntetyzowanych przez *G. xylinus* metodą hodowli stacjonarnej lub z wytrząsaniem. Metoda ta polega na przenoszeniu tych matryc i zawieszeniu ich w pożywce z zaszczepionymi drożdżami na czas od 2 do 5 godzin. Alternatywny sposób immobilizacji, również opisany w tym patencie, polega na natryskiwaniu roztworu drożdży na nośnik i następne suszeniu go przez okres od 2 do 5 godzin. W celu zachowania sterylnych warunków oba procesy prowadzone są z zastosowaniem ultradźwięków (20–40 kHz; 0,1–0,2 W·cm<sup>2</sup>). W patencie US 20120077250 podano metodę polegającą na wykorzystaniu matryc z celulozy bakteryjnej, syntetyzowanych przez *G. xylinus*, do hodowli mikroorganizmów fotosyntetyzujących. Na odpowiednio spreparowany celulozowy nośnik (wstępnie umieszczony przez 1 godzinę w pożywce stosowanej do hodowli) posiewa się odpowiedni szczep. W tym celu zawiesza się nośnik celulozowy w medium z zaszczepionymi mikroorganizmami fotosyntetyzującymi w pojemniku, który oświetlony jest za pomocą źródła światła.

Mikroorganizmy probiotyczne korzystnie wpływają na organizm gospodarza poprzez poprawę równowagi jego ekosystemu jelitowego. Obecnie mikroorganizmy probiotyczne stosowane są, jako suplement diety w formie proszku, kapsułek lub tabletek. W celu osiągnięcia optymalnych efektów, mikroorganizmy probiotyczne powinny zostać dostarczone do jelita w stosunkowo dużych ilościach przy utrzymaniu odpowiednio długotrwałej stabilności i żywotności. Probiotyki cechują się słabą trwałością podczas przechowywania, jak również wysoką odpornością na ekstremalne warunki panujące w przewodzie pokarmowym. Sposobem na zwiększenie przeżywalności mikroorganizmów probiotycznych jest ich immobilizacja na matrycach, wykonanych z materiału nietoksycznego dla organizmu gospodarza. Alternatywnym sposobem dostarczenia probiotyków jest ich kapsułkowanie z zastosowaniem takich materiałów jak: alginian sodu, karagenina i agar. Materiały te cechują się dość słabą wytrzymałością na niekorzystne warunki środowiskowe, co może prowadzić do uszkodzania wytworzonych z tych materiałów matryc lub powłok, powodując w efekcie obniżenie jakości i ilości materiału probiotycznego.

Uwzględniając powyższe spostrzeżenia, celowym jest opracowanie sposobu immobilizacji mikroorganizmów probiotycznych z zastosowaniem nośników wykonanych z materiału kompatybilnego z organizmem gospodarza, odpornych na niekorzystne warunki panujące w układzie trawiennym oraz umożliwiających kontrolowane uwalnianie mikroorganizmów probiotycznych we właściwym czasie.

Sposób immobilizacji mikroorganizmów na i/lub w celulozie bakteryjnej, według wynalazku, charakteryzuje się tym, że mokrą lub suchą celulozę bakteryjną umieszcza się w zawiesinie bakterii *Lactobacillus spp.*, o gęstości  $1^{\circ}\text{McFerland}$  i inkubuje się ją w tej zawiesinie przez 24 h w temperaturze  $25^{\circ}\text{C}$  z wytrząsaniem 180 obr/min. Stosuje się bakterie *Lactobacillus spp.* pochodzące z 24 h hodowli prowadzonej w płynnym podłożu MRS (deMan, Rogosa and Sharpe), które oddzielono od podłoża poprzez wirowanie przez 15 minut przy 3000 obr/minutę. Zawiesinę bakterii *Lactobacillus spp.* otrzymano umieszczając bakterie w buforze fosforanowym (PBS). Do immobilizacji bakterii *Lactobacillus spp.* stosuje się celulozę bakteryjną w postaci membran lub kulek, uzyskaną w wyniku prowadzenia 6 dniowej hodowli, odpowiednio w warunkach stacjonarnych lub wytrząsanych przy zastosowaniu 180 obr/min.

Sposób według wynalazku pozwala na zapewnienie ochrony komórek bakteryjnych przed niekorzystnym wpływem soli kwasów żółciowych, enzymów trzustkowych i soku żołądkowego. Zastosowanie uwodnionej lub suchej celulozy bakteryjnej w formie membran lub kulek do unieruchomienia bakterii probiotycznych *Lactobacillus spp.* pozwala na istotne zwiększenie przeżywalności tego typu mikroorganizmów w porównaniu do bakterii nieimmobilizowanych na nośniku wykonanym z celulozy bakteryjnej.

Sposób immobilizacji według wynalazku przedstawiony jest w przykładach wykonania oraz rysunku, na którym fig. 1 przedstawia zdjęcie mokrej, 6 dniowej celulozy bakteryjnej, uzyskanej w hodowli stacjonarnej oraz po inkubacji celulozowych membran przez okres 24 h w zawiesinie bakterii *Lactobacillus spp.*; fig. 2 przedstawia zdjęcie mokrej, 6 dniowej celulozy bakteryjnej uzyskanej w hodowli wytrząsanej oraz po inkubacji celulozowych kulek przez okres 24 h w zawiesinie bakterii *Lactobacillus spp.*

#### Przykład 1

W celu uzyskania nośnika celulozowego, przygotowano inokulum bakterii *G. xylinus*. W pierwszym etapie, sporządzono podłoże Herstina-Schramma zawierające: glukozę (2 w/v%), ekstrakt drożdżowy (0,5 w/v%), pepton bakteryjny (0,5 w/v%), kwas cytrynowy (0,115 w/v%),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,27 w/v%),  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,05 w/v%). Podłoże wysterylizowano oraz wzbogacono alkoholem etylowym (1 v/v%). Bakteria *G. xylinus*, przechowywana w stałym podłożu o składzie: glukoza (2 w/v%), ekstrakt drożdżowy (0,5 w/v%), pepton bakteryjny (0,5 w/v%), kwas cytrynowy (0,115 w/v%),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,27 w/v%),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05 w/v%) agar bakteriologiczny (2 w/v%), również wysterylizowanym i wzbogaconym alkoholem etylowym (1 v/v%). Po zaszczepieniu bakterii hodowlę mieszano na wytrząsarce laboratoryjnej przez 15 minut i inkubowano się przez kolejne 7 dni w temperaturze  $28\text{--}30^{\circ}\text{C}$ . Po 7 dniach inkubacji uzyskaną hodowlę ponownie mieszano na wytrząsarce typu worteks przez 5 minut. Otrzymane w ten sposób inokulum bakterii *G. xylinus* przenoszono na świeże podłoże Herstina-Schramma o takim samym składzie jak podano powyżej i prowadzono hodowlę, według następującej procedury. Inokulum bakterii *G. xylinus*, otrzymane według opisu powyżej, w ilości 2 w/v% przenoszono do świeżego podłoża Herstina-Schramma, które zawiera: glukozę (2 w/v%), ekstrakt drożdżowy (0,5 w/v%), pepton bakteryjny (0,5 w/v%), kwas cytrynowy (0,115 w/v%),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,27 w/v%),  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,05 w/v%). Podłoże wysterylizowano oraz wzbogacono alkoholem etylowym (1 v/v%). Następnie 2 ml uzyskanej hodowli przenoszono do płytki 24-dółkowej. Inkubację prowadzono przez 6 dni w temperaturze  $28^{\circ}\text{C}$ . Otrzymane membrany celulozowe przenoszono do czystych pojemników, przemywano wodą destylowaną, a następnie oczyszczano poprzez inkubację w 0,1 M wodnym roztworze NaOH w temperaturze  $90^{\circ}\text{C}$  przez 30 minut. Procedurę oczyszczania powtarzano trzykrotnie. W kolejnym etapie oczyszczoną celulozę płukano w wodzie destylowanej do momentu ustabilizowania pH na poziomie 6,5–7,5, a następnie celulozę poddawano autoklawowaniu w temperaturze  $121^{\circ}\text{C}$  przez 15 minut. W ten sposób uzyskano celulozę mokrą (uwodnioną). W celu uzyskania celulozy suchej, celulozę uwodnioną poddawano suszeniu w temperaturze  $60^{\circ}\text{C}$ , do momentu uzyskania stałej wagi.

W następnym etapie komórki *Lactobacillus spp.* pochodzące z 24 h hodowli, prowadzonej w płynnym podłożu MRS (deMan, Rogosa and Sharpe), oddzielano od podłoża poprzez odwirowanie z prędkością 3000 obr/min przez 15 min, a następnie komórki zawieszano w buforze fosforanowym (PBS), w celu otrzymania zawiesiny komórek o gęstości  $1^{\circ}\text{McFerland}$ .

W celu immobilizacji bakterii *Lactobacillus spp.* na powierzchni celulozowego nośnika, zarówno w formie mokrej jak i suchej, membrany umieszczano w przygotowanej zawiesinie bakterii i inkubowano przez 24 h w temperaturze  $25^{\circ}\text{C}$  z wytrząsaniem 180 obr/min.

Dla uzyskanego biomateriału przeprowadzono testy w celu określenia wpływu symulowanego soku żołądkowego i soli żółciowych na immobilizowane bakterie *Lactobacillus spp.* na powierzchni celulozowego nośnika. W tym celu przygotowano roztwór HCl o pH 2,0 (podłoże MRS + 5 MHC1) oraz roztwór soli żółciowych (MRS + 0,3% soli żółciowych). Następnie membrany z celulozy bakteryjnej z immobilizowanymi na nich bakteriami probiotycznymi inkubowano w przygotowanych roztworach przez 4h w temperaturze 37°C. Jako kontrolę te same testy przeprowadzono dla mikroorganizmów probiotycznych nieimmobilizowanych na membranach z celulozy bakteryjnej. Opisany powyżej sposób unieruchamiania umożliwia immobilizowanie ok.  $300 \times 10^5$  komórek bakterii probiotycznych na gram celulozy mokrej i uzyskanie stopnia przeżywalności immobilizowanych na mokrej celulozie bakterii w obecności symulowanego kwasu żołądkowego powyżej 50% i soli żółciowych powyżej 90% oraz immobilizowanie ok.  $20 \times 10^5$  komórek bakterii probiotycznych na gram celulozy suchej i uzyskanie stopnia przeżywalności immobilizowanych na suchej celulozie bakterii w obecności symulowanego kwasu żołądkowego powyżej 50% i soli żółciowych powyżej 90%.

#### Przykład 2

Inokulum bakterii *G. xylinus*, przygotowane według opisu w przykładzie pierwszym, w ilości 2 w/v% przeniesiono do 50 ml świeżego podłoża Herstina-Schramma, umieszczonego w szklanych kolbach o pojemności 100 ml, a następnie hodowle inkubowano się przez 6 dni w temperaturze 28°C z jednoczesnym wytrząsaniem 180 obr/min. Uzyskaną celulozę bakteryjną w postaci kulek przemycano, oczyszczano i autoklawowano w taki sam sposób jak w przykładzie pierwszym. W celu uzyskania suchej celulozy otrzymane kulki celulozowe poddawano suszeniu w temperaturze 60° C do momentu uzyskania stałej wagi. W kolejnym etapie przygotowano zawiesinę komórek *Lactobacillus spp.*, według sposobu podanego w przykładzie pierwszym. Immobilizacja na powierzchni kulek celulozowych oraz testy przeżywalności w obecności HCl i soli żółciowych przeprowadzono w sposób podany w przykładzie pierwszym. Opisany powyżej sposób unieruchamiania umożliwia immobilizowanie ok.  $400 \times 10^5$  komórek bakterii probiotycznych na gram celulozy mokrej i uzyskanie stopnia przeżywalności immobilizowanych na mokrej celulozie bakterii w obecności symulowanego kwasu żołądkowego powyżej 50% i soli żółciowych powyżej 90% oraz immobilizowanie ok.  $30 \times 10^5$  komórek bakterii probiotycznych na gram celulozy suchej i uzyskanie stopnia przeżywalności immobilizowanych na suchej celulozie bakterii w obecności symulowanego kwasu żołądkowego powyżej i soli żółciowych powyżej 90%.

### **Zastrzeżenie patentowe**

1. Sposób immobilizacji mikroorganizmów na i/lub w celulozie bakteryjnej, **znamienny tym**, że mokrą lub suchą celulozę bakteryjną umieszcza się w zawiesinie bakterii *Lactobacillus spp.* o gęstości 1°McFerland i inkubuje się je w tej zawiesinie przez 24 h w temperaturze 25°C z wytrząsaniem 180 obr/min., przy czym stosuje się bakterie *Lactobacillus spp* pochodzące z 24 h hodowli prowadzonej w płynnym podłożu MRS (deMan, Rogosa and Sharpe) które oddzielono od podłoża poprzez wirowanie przez 15 minut z prędkością 3000 obr/minut, zaś celulozę bakteryjną syntetyzowaną przez bakterie *Gluconacetobacter xylinus* w postaci uwodnionych lub suchych membran otrzymanych z hodowli stacjonarnej prowadzonej przez 6 dni bądź w postaci uwodnionych lub suchych kulek otrzymanych z hodowli wstrząsanej prowadzonej przez 6 dni przy zastosowaniu 180 obr/min.

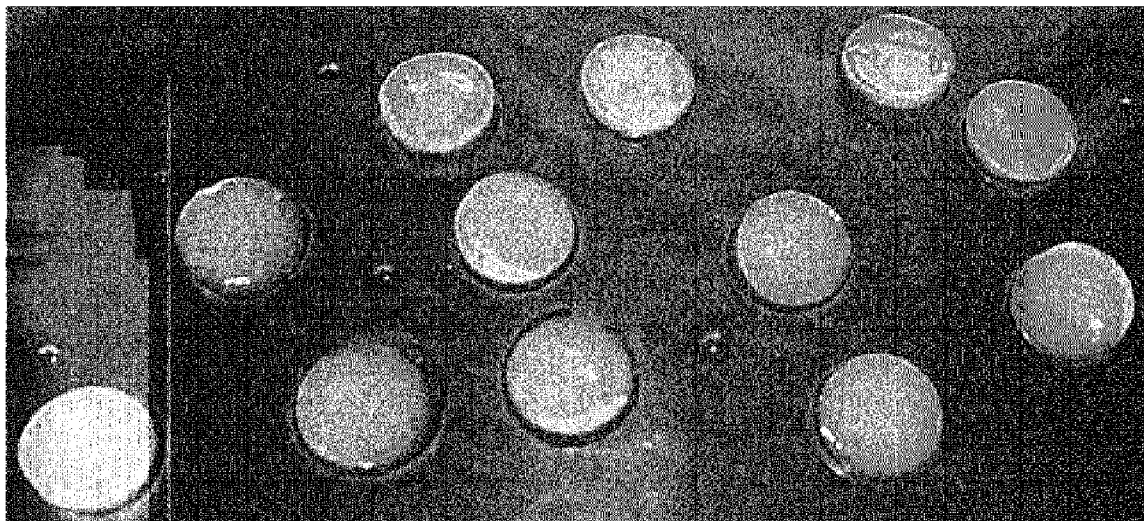
**Rysunki**

Fig. 1

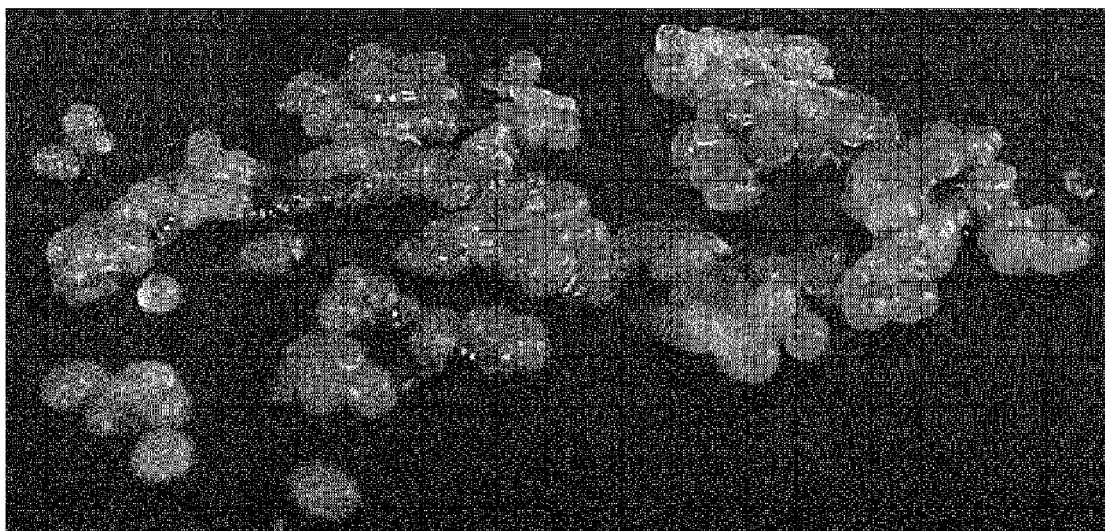


Fig. 2