

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **236769**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426522**

(22) Data zgłoszenia: **01.08.2018**

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23K 10/16 (2016.01)

A23K 10/12 (2016.01)

A23K 20/174 (2016.01)

C12P 1/04 (2006.01)

C12P 7/52 (2006.01)

C12P 7/02 (2006.01)

(54) **Nowy szczep bakterii *Pediococcus acidilactici* o zdolności metabolizowania
1,2-propanodiolu, zawierająca go kultura starterowa oraz preparat**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

10.02.2020 BUP 04/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

22.02.2021 WUP 04/21

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT BIOTECHNOLOGII PRZEMYSŁU
ROLNO-SPOŻYWCZEGO
IM. PROF. WACŁAWA DĄBROWSKIEGO,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KRYSTYNA ZIELIŃSKA, Warszawa, PL
KATARZYNA PIASECKA-JÓŹWIAK,
Warszawa, PL
MICHAŁ ŚWIĄTEK, Stoczek Łukowski, PL
ANTONI MIECZNIKOWSKI, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Grzelak

PL 236769 B1

Opis wynalazku

Dziedzina techniki

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065p o zdolności syntezy kwasu propionowego z 1,2-propanodiolu. Wynalazek dotyczy także kultury starterowej i preparatu obejmujących nowy szczep.

Stan techniki

Znane szczepy należące do gatunku *Pediococcus acidilactici* opisane np. w zgłoszeniach patentowych: US 2011/0195152, US 2015/0246082 i CN 104388345 A (2017-grant) wytwarzające bakteriocynę – pediocynę, charakteryzującą się wysokim antagonizmem w stosunku do mikroorganizmów patogennych i wirusów. Z tego względu szczepy z tego gatunku bakterii wchodziły często w skład medycznych preparatów probiotycznych, są stosowane jako probiotyczne dodatki do żywności oraz jako kultury starterowe do kiszenia żywności i pasz.

Inokulanty bakteryjne nowej generacji powinny łączyć, synergicznie działające w procesie kiszenia roślin, szczepy bakterii pochodzące z rodzajów i gatunków LAB (bakterii fermentacji mlekowej), które zapewnią bezpieczeństwo mikrobiologiczne kiszonek roślinnych oraz stabilność tlenową w czasie długotrwałego, ponad rocznego przechowywania. Dlatego tak ważne jest poszukiwanie nowych efektywnych szczepów LAB, które są zdolne do hamowania rozwoju mikroorganizmów patogennych, a jednocześnie do efektywnej syntezy kwasów: octowego i propionowego, odpowiedzialnych za stabilność tlenową kiszonek.

Preparaty LAB przeznaczone do stymulowania procesu kiszenia pasz i poprawy ich stabilności tlenowej znane z następujących zgłoszeń patentowych: US 2005/0281917 A1, WO 2014105847 A1 i polskiego patentu PL228711 zawierają szczepy bakterii z gatunków: *Lactobacillus buchneri* i *Lactobacillus diolivorans* odpowiedzialnych za syntezę i/lub metabolizm 1,2-propanodiolu do kwasu propionowego.

Celem niniejszego wynalazku było wyizolowanie z kiszonego ziarna kukurydzy, szczepu bakterii fermentacji mlekowej, który bez modyfikacji genetycznych, będzie charakteryzował się zdolnością do metabolizowania 1,2-propanodiolu i efektywnej syntezy kwasu propionowego.

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii, który został określony jako *Pediococcus acidilactici* PD2 i został zdeponowany 15 września 2017 w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego, pod numerem depozytu KKP 2065 p, przy czym wymieniony szczep ma zdolność metabolizowania 1,2-propanodiolu i wykazuje zdolność syntezy kwasu propionowego, w ilościach efektywnych do zastosowania do przedłużania stabilności tlenowej kiszonek.

Szczep *Pediococcus acidilactici* PD2 został wyizolowany z kiszonego ziarna kukurydzy, przechowywanego w warunkach beztlenowych przez 3 lata.

Nieoczekiwanie okazało się, że nowy szczep *Pediococcus acidilactici* PD2 zdeponowany jako KKP 2065p charakteryzuje się zdolnością do wykorzystywania 1,2-propanodiolu jako źródła węgla do namnażania biomasy bakterii i syntezy metabolitów, w tym kwasu propionowego, a zatem do metabolizowania 1,2-propanodiolu do kwasu propionowego, co nie jest cechą oczywistą dla tego gatunku bakterii.

Przedmiotem wynalazku jest również kultura starterowa preparatu bakteryjnego do przedłużania stabilności tlenowej kiszonek pasz i/lub roślinnych surowców odnawialnych, która obejmuje szczep bakterii *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065 p, według wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest również preparat do przedłużania stabilności tlenowej kiszonek pasz i/lub roślinnych surowców odnawialnych który obejmuje szczep według wynalazku lub kulturę starterową według wynalazku i przynajmniej jeden składnik pomocniczy, przy czym korzystnie składnikiem pomocniczym jest – witamina B12.

Składnikiem pomocniczym w preparacie według wynalazku może być dowolny składnik pomocniczy spośród znanych w dziedzinie i stosowanych w preparatach bakteryjnych. Przykładowe składniki pomocnicze obejmują bufony (np. bufor fosforanowy), pożywkę do hodowli bakteryjnej w tym mikroelementy i witaminy.

Kiszonymi paszami w rozumieniu wynalazku mogą być przykładowo, ale nie wyłącznie: lucerna, koniczyzna, ruń łąkowa, rośliny zbożowe w tym kukurydza.

Roślinnymi surowcami odnawialnymi w rozumieniu wynalazku mogą być, przykładowo, ale nie wyłącznie: trawy, ruń łąkowa i całe rośliny kukurydzy.

W korzystnym przykładzie wykonania preparatu według wynalazku, zawarte bakterie są liofilizowane.

W korzystnym przykładzie wykonania preparatu według wynalazku, preparat o zawartości suchej masy około 94% zawiera w 1 g liczbę bakterii wynoszącą około 2×10^{10} jednostek tworzących kolonie bakterii.

Opis figur

Fig. 1 przedstawia zmiany zawartości 1,2-propanodiolu, 1-propanolu i kwasu propionowego w podłożu w czasie hodowli bakterii szczepu według wynalazku.

Fig. 2 przedstawia wyniki testów dla stabilności tlenowej kiszzonek z runi łąkowej wykonanych bez i z dodatkiem preparatu według wynalazku.

PRZYKŁADY

P r z y k ł a d 1. Izolacja i charakterystyka nowego szczepu *Pediococcus acidilactici*

Szczep *Pediococcus acidilactici* PD2 został wyizolowany z kiszzonego ziarna kukurydzy, przecho-
wywanego w warunkach beztlenowych przez 3 lata. Szczep wyizolowano na drodze wielokrotnej
selekcji kolonii rosnących na stałych podłożach MRS, zawierających jako jedyne źródło węgla 1,2-
-propanodiol.

Identyfikację genetyczną szczepu wykonano metodą sekwencjonowania fragmentu genu 16S
rRNA i porównania uzyskanych wyników z publikowanymi w bazach danych genetycznej identyfikacji
bakterii tego gatunku.

Nowy szczep bakterii określono przy 98% zgodności z gatunkiem szczepu testowego jako *Pe-
diococcus acidilactici*.

Wyniki analizy genetycznej odcinka 16S rRNA, określonego niniejszym wynalazkiem, szczepu
Pediococcus acidilactici PD2 KKP 2065p przedstawia SEQ ID NO: 1. Oznaczenia nukleotydów zgodne
z IUPAC, przy czym Y oznacza nukleotyd C lub T, W oznacza A lub T, R oznacza A lub G, K oznacza
G lub T.

Nowy szczep został zdeponowany w dniu 19 września 2017 roku w Kolekcji Kultur Przemysł-
owych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego,
Warszawa, Polska pod numerem kolekcyjnym KKP 2065 p.

Szczep *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065 p charakteryzuje się następującymi cechami mor-
fologicznymi:

- kolonie bakterii rosnące w warunkach beztlenowych na specyficznej dla rodzaju *Lactoba-
cillus* sp. pożywce MRS zestalonej agarowo (wg. de Man, Rogosa i Sharpe), mają kształt
owalny, są koloru białego, o wielkości około 0,6 – 1,0 μm .
- komórki bakterii nie wytwarzają przetrwalników, są Gram +, mają postać ziarniaków, wystę-
pują w parach lub tetradach, są charakterystyczne dla rodzaju *Pediococcus* sp. Optymalna
temperatura wzrostu szczepu wynosi 37°C.

Warunki namnażania biomasy szczepu bakterii według wynalazku.

Po namnożeniu inokulum (stadium probówkowe oraz stadium kolbkowe w trzech etapach) ho-
dowlę bakterii prowadzono w pożywce o składzie (w g/l wody): sacharoza – 20, ekstrakt drożdżowy –
10, namok kukurydziany – 5, fosforan dwuamonowy – 0,2, siarczan magnezowy – 0,08, siarczan amo-
nowy – 0,35, siarczan manganowy – 0,01; w fermentorach o pojemności 150 l, w temperaturze 35°C,
przy pH regulowanym wodą amoniakalną do wartości 5,8.

Do wydzielania biomasy użyto wirówki o współczynniku rozdziału (współczynnika uwielokrotnie-
nia przyspieszenia ziemskiego) powyżej 13000 x g.

Po przeprowadzeniu hodowli w podanych wyżej warunkach uzyskano 1000 g biomasy bakterii
o zawartości 30% s.m.

Otrzymaną po wirowaniu biomasę bakterii, po wymieszaniu z nośnikami liofilizowano według zna-
nego przepisu podanego w patencie PL228552. W skrócie, wodną zawiesinę biomasy bakterii dopro-
wadza się do zawartości suchej masy od 14% do 16% poprzez dodatek soli fizjologicznej, miesza się
z glicerolem jako krioprotektantem, dodanym w ilości 20% w stosunku do zawartości suchej masy w
biomasie, a następnie dodaje się odtłuszczone, granulowane mleko w proszku w stosunku do biomasy
jak 0,75:1, przy czym 0,75 stanowi ilość mleka w stosunku do nierozcieńczonej solą fizjologiczną ilości
biomasy. Następnie, całość dokładnie miesza się i zamraża. W końcowym etapie, półprodukt poddaje
się procesowi liofilizacji metodą suszenia sublimacyjnego do uzyskania produktu o zawartości suchej

masy powyżej 94–98%. Liofilizat bakterii o zawartości suchej masy około 94% zawiera w 1 g liczbę bakterii około 2×10^{11} jednostek tworzących kolonie.

Liofilizat szczepu *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065 p jest przeznaczony jako komponent kultury starterowej i/lub preparatu bakteryjnego o działaniu przedłużającym stabilność tlenową kiszonnych pasz i surowców odnawialnych.

Preparat otrzymywany jest po zmieszaniu liofilizatu bakterii, stanowiącego 10% preparatu, z nośnikiem – sproszkowaną sacharozą z dodatkiem 0,1% witaminy B₁₂. Preparat, o zawartości suchej masy około 94%, zawiera w 1 g liczbę bakterii około 2×10^{10} jednostek tworzących kolonie.

W tabeli 1 przedstawiono wyniki badań modelowych dotyczące wykorzystania glukozy, w czasie hodowli szczepu *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065p w podłożu MRS, do syntezy kwasów organicznych, w tym kwasu propionowego oraz 1,2-propanodiolu. Bakterie hodowano w temperaturze 37°C, w czasie 21 dni.

W czasie hodowli bakterii *Pediococcus acidilactici* PD2 najwyższa zawartość 1,2-propanodiolu i kwasu propionowego w podłożu wynosiła odpowiednio 2,60 i 0,26 mg w 100 ml podłoża czyli pozostawała na bardzo niskim poziomie. Zawartość kwasu mlekowego i octowego wzrastała do 7 dnia hodowli bakterii do wartości odpowiednio 1,6 i 0,28%, po tym czasie wykazywała tendencje zniżkowe.

Tabela 1

Dynamika syntezy kwasów organicznych i 1,2-propanodiolu oraz przyrostu biomasy bakterii *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065p, w czasie 21 dniowej hodowli bakterii w podłożu MRS

MRS/ glukoza	Dni hodowli bakterii				
	3	7	10	14	21
Zawartość kwasu mlekowego [L+D]					
g/100ml	1,32	1,60	1,58	1,52	1,48
Zawartość kwasu octowego					
g/100ml	0,30	0,38	0,36	0,34	0,30
Zawartość kwasu propionowego					
mg/100ml	0,22	0,26	0,26	0,22	0,20
Zawartość 1,2-propanodiolu					
mg/100ml	0	2,60	2,52	2,28	2,24
Biomasa bakterii					
liczba j.t.k. bakterii/ml	$2,4 \times 10^9$	$4,2 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$

Czas hodowli 21 dni, temp. 37°C, wyniki są średnimi z trzech doświadczeń.

W tym doświadczeniu wykazano, że wyizolowany szczep bakterii *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065p hodowany przez 21 dni w podłożu MRS, zawierającym jako jedyne źródło węgla glukozę, nie wykazywał zdolności do syntezy 1,2-propanodiolu.

W tabeli 2 przedstawiono wyniki badań modelowych dotyczących hodowli bakterii szczepu *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065p w modyfikowanym podłożu MRS, w którym 50% ilości glukozy zastąpiono dodatkiem 1,2-propanodiolu w ilości 800,0 mg/100 ml. Stosunek molowy glukozy do 1,2-propanodiolu wynosił jak 1:2. Skład modyfikowanego podłoża MRS uzupełniono dodatkiem kobalaminy w ilości 20 µg/100 ml. Kobalamina jest kofaktorem enzymu diol dehidratazy, który katalizuje reakcje przemiany 1,2-propanodiolu do kwasu propionowego.

Nieoczekiwanie okazało się, że nowy szczep *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065p wykazuje zdolności do efektywnego wykorzystywania 1,2-propanodiolu, wchodzącego w skład podłoża, do namnażania biomasy bakterii, a zatem jest zdolny do jego metabolizowania, co nie jest

oczywiste dla tego gatunku bakterii. W celu udokumentowania dynamiki przemiany 1,2-propanodiolu poprzez 1-propanol do kwasu propionowego przez bakterie szczepu *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065p w tabeli 2 podano również procent jego ubytku z podłoża w czasie ich hodowli. Bakterie hodowano w temperaturze 37°C, w czasie 21 dni.

Tabela 2

Stopień wykorzystania 1,2-propanodiolu na przyrost biomasy bakterii *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065p i syntezę metabolitów

MRS/glukoza 1,2-propanodiol	Dni hodowli bakterii				
	3	7	10	14	21
Zawartość kwasu mlekowego [L+D]					
g/100ml	0,95	1,20	1,30	1,35	1,30
Zawartość kwasu octowego					
g/100ml	0,29	0,34	0,40	0,46	0,42
Zawartość 1-propanolu					
mg/100ml	120,65	180,96	196,27	208,56	156,24
Zawartość kwasu propionowego					
mg/100 ml	66,85	224,90	246,41	270,06	312,27
Biomasa bakterii					
liczba j.t.k. bakterii/ml	$1,2 \times 10^9$	$6,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$2,4 \times 10^7$
Stopień wykorzystania 1,2-propanodiolu dodanego do podłoża					
procent	60,2	96,4	97,0	97,8	99,0

Czas hodowli 21 dni, temp. 37°C. Podłoże MRS: glukoza – 1 g/100 ml, 1,2-propanodiol – 800 mg/100 ml, witamina B₁₂ 20 µg/100 ml. Wyniki są średnimi z trzech doświadczeń.

Zmiany zawartości 1,2-propanodiolu, 1-propanolu i kwasu propionowego w podłożu w czasie hodowli bakterii szczepu według wynalazku przedstawiono na Fig. 1.

W warunkach hodowli bakterii szczepu według wynalazku do 21 dni hodowli w modyfikowanym podłożu MRS, w którym źródłem węgla była glukoza i 1,2-propanodiol w stosunku molowym jak 1:2, zawartość kwasu mlekowego i octowego wzrastała do 14 dnia hodowli, a następnie powoli spadała. Do 14 dnia hodowli bakterii wzrastała zawartość 1-propanolu, związku pośredniego między 1,2-propanodiolem i kwasem propionowym. Z ilości 800 mg/100 ml 1,2-propanodiolu, dodanego do podłoża, bakterie wykorzystały do produkcji biomasy i syntezy metabolitów, w tym kwasu propionowego 99,0 procent początkowej zawartości tego związku w podłożu. Efektywność syntezy kwasu propionowego była wysoka i w 21 dniu hodowli bakterii jego zawartość wynosiła 312,27 mg /100 ml podłoża, (tabela 2 i Fig. 1).

Przykład 2. Porównanie zdolności wykorzystania 1,2-propanodiolu szczepu według wynalazku do znanego szczepu o takich zdolnościach metabolicznych

W tabeli 3 przedstawiono wyniki efektywności syntezy kwasu propionowego z 1,2-propanodiolu przez dwa szczepy pochodzące z różnych gatunków LAB, a hodowane w tych samych warunkach (czas hodowli 21 dni, temp. 37°C, źródła węgla glukoza i 1,2-propanodiol z dodatkiem witaminy B₁₂):

Lactobacillus diolivorans KKP 2057 p – znany szczep pochodzący z gatunku o udokumentowanej zdolności do metabolizowania 1,2-propanodiolu i

Pediococcus acidilactici PD2 KKP 2065 p. — nowo wyizolowany szczep według wynalazku.

T a b e l a 3

Porównanie efektywności metabolizmu 1,2-propanodiolu przez *Lactobacillus diolivorans* K KKP 2057 p i *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065 p

<i>Lactobacillus diolivorans</i> K KKP 2057 p	<i>Pediococcus acidilactici</i> PD2 KKP 2065 p
Zawartość kwasu propionowego w mg/100 ml podłoża w 21 dniu hodowli	
125,40	312,27
Procent wykorzystania 1,2-propanodiolu dodanego do podłoża	
85,0	99,0

Czas hodowli 21 dni, temp. 37°C. Podłoże: zmodyfikowany MRS: glukoza – 1 g/100 ml, 1,2-propanodiol – 800 mg/100 ml, witamina B₁₂ – 20 µ/100 ml.

Wyniki są średnimi z trzech doświadczeń.

Opisany w patencie PL228711, znany ze zdolności do metabolizowania 1,2-propanodiolu do kwasu propionowego, szczep bakterii *Lactobacillus diolivorans* K KKP 2057 p okazał się mniej efektywny, od nowo wyizolowanego szczepu z gatunku *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065 p, w tych samych warunkach hodowli. Zawartość kwasu propionowego w podłożu po upływie 21 dni hodowli szczepu według wynalazku była dwu i półkrotnie wyższa, a wykorzystanie 1,2-propanodiolu z podłoża wynosiło 99 procent.

P r z y k ł a d 3. Porównanie stabilności tlenowej kiszonek z runi łąkowej wykonanych bez preparatu i z dodatkiem preparatu według wynalazku

Wyniki testu stabilności tlenowej kiszonek kontrolnych bez dodatku preparatu i doświadczalnych z dodatkiem preparatu przedstawiono na Fig. 2.

Test stabilności tlenowej kiszonek z runi łąkowej, bez (kontrola) i z dodatkiem preparatu, zawierającego nowy szczep *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065 p, wykonano metodą temperaturową Honiga. Kiszonki wytworzono w belach cylindrycznych, o masie 500 kg każda, owiniętych trzykrotnie folią. Dawka preparatu wynosiła 5 g/t kiszonych roślin. Preparat, otrzymany jak opisano w Przykładzie 1, podawano na rośliny w formie oprysku po zawieszeniu preparatu w wodzie pitnej. Po upływie 3 miesięcy kiszenia pobrano próby z trzech losowo wybranych bel kiszonek kontrolnych i doświadczalnych i wykonano 11-dniowy test stabilności w temperaturze 20 stopni C. Wzrost temperatury prób kiszonek w czasie doświadczenia, w danym dniu testu, o ponad 3 stopnie C świadczył o braku stabilności tlenowej kiszonki.

Wyniki przedstawione na Fig. 2 są średnimi z trzech próbek pobranych z trzech wybranych bel kiszonek z runi łąkowej wykonanych w rolnym gospodarstwie doświadczalnym.

Kiszonki doświadczalne z dodatkiem preparatu według wynalazku charakteryzowały się przedłużoną stabilnością tlenową do 7 dni, podczas gdy kiszonki kontrolne bez dodatku preparatu były stabilne tylko przez 4 dni, po otwarciu bel kiszonkarskich

Lista sekwencji

110> Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno Spożywczego im.
prof. Wacława Dąbrowskiego

<120> Nowy szczep bakterii *Pediococcus acidilactici* o zdolności
metabolizowania 1,2-propanodiolu, oraz zawierająca go kultura
starterowa i preparat

<130> PK-5623-AGR

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1359

<212> DNA

<213> *Pediococcus acidilactici*

<400> 1

actgtcactt agacggctag ctctaaaag gttacccac cggttttggg tgttacaaac	60
tctcatggtg tgacgggagg tgtgtacaag gcccggaac gtattcaccg cggcatgctg	120
atccgcgatt actagcgatt ccgacttcgt gtaggcgagt tgcagcctac agtccgaact	180
gagaatggtt ttaagagatt agctaaacct cggggtttcg cgactcgttg taccatccat	240
tgtagcacgt gtgtagccca ggtcataagg ggcattgatga tttgacgtcg tccccacctt	300
cctccggttt gtcaccggca gtctcactag agtgcccaac tgaatgctgg caactagtaa	360
taagggttgc gtcgtttgcg ggacttaacc caacatctca cgacacgagc tgacgacaac	420
catgcaccac ctgtcattct gtccccgaag ggaacgccta atctcttagg ttggcagaag	480
atgtcaagac ctggtaagggt tcttcgcgta gcttcgaatt aaaccacatg ctccaccgct	540
tgtgcgggcc cccgtcaatt cttttgagtt tcaaccttgc ggtcgtactc cccaggcgga	600
ttacttaatg cgtttagctgc agcactgaag ggcggaacc ctccaacact tagtaatcat	660
cgtttacggc atggactacc agggatatcta atcctgttcg ctacccatgc tttcgagcct	720
cagcgtcagt tacagaccag acagccgcct tcgccactgg tgttcttcca tatatctacg	780
catttcaccg ctacacatgg agttccactg tctctttctg cactcaagtc tcccagtttc	840
caatgcactt cttcggttga gccgaaggct ttcacattag acttaaaaga ccgcctgcgc	900
tcgctttacg cccaataaat ccggataacg cttgccacct acgtattacc gcggctgctg	960
gcacgtagtt agccgtgctt tctgggtaaa taccgtcact ggggtgaacag ttactctcac	1020
ccacgttctt ctttaacaac agagctttac gagccgaaac ctttcttcac tcacgcggcg	1080
ttgctccatc agacttgctg ccattgtgag attccctact gctgcctccg tagagtctgg	1140
gccgtgtctc agtcccatgt gcgataccct ctacgtcgct acgcatcatc gctggtgagc	1200
gtactcacac tagctatgcg cgcgggtcat cgatgawgcg agcatctttc aagaaacagg	1260
cgatttcytg ttwacgatar ccattctgtt cagggttatcc cckgatygca gttaccaagt	1320
tayacgatcg caattgattc gttagtcacat catgcagac	1359

Zastrzeżenia patentowe

1. Nowy szczep bakterii *Pediococcus acidilactici* PD2 zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie im. prof. Wacława Dąbrowskiego, pod numerem KKP 2065 p, przy czym wymieniony szczep ma zdolność metabolizowania 1,2-propanodiolu i wykazuje zdolność syntezy kwasu propionowego, w ilościach efektywnych do zastosowania do przedłużania stabilności tlenowej kiszzonek.
2. Kultura starterowa preparatu bakteryjnego do przedłużania stabilności tlenowej kiszonych pasz i/lub roślinnych surowców odnawialnych, **znamienna tym**, że obejmuje szczep bakterii *Pediococcus acidilactici* PD2 KKP 2065 p, jak określony w zastrz. 1.
3. Preparat do przedłużania stabilności tlenowej kiszonych pasz i/lub roślinnych surowców odnawialnych **znamienny tym**, że obejmuje szczep jak określony w zastrz. 1 lub kulturę starterową jak określoną w zastrz. 2 i przynajmniej jeden składnik pomocniczy, przy czym korzystnie składnikiem pomocniczym jest witamina B12.
4. Preparat według zastrz. 3, **znamienny tym**, że zawarte w nim bakterie są liofilizowane.
5. Preparat według zastrz. 4 **znamienny tym**, że ma zawartość suchej masy około 94% i zawiera liofilizat bakterii, przy czym w 1 g zawiera liczbę bakterii wynoszącą około 2×10^{10} jednostek tworzących kolonie bakterii.

Rysunki

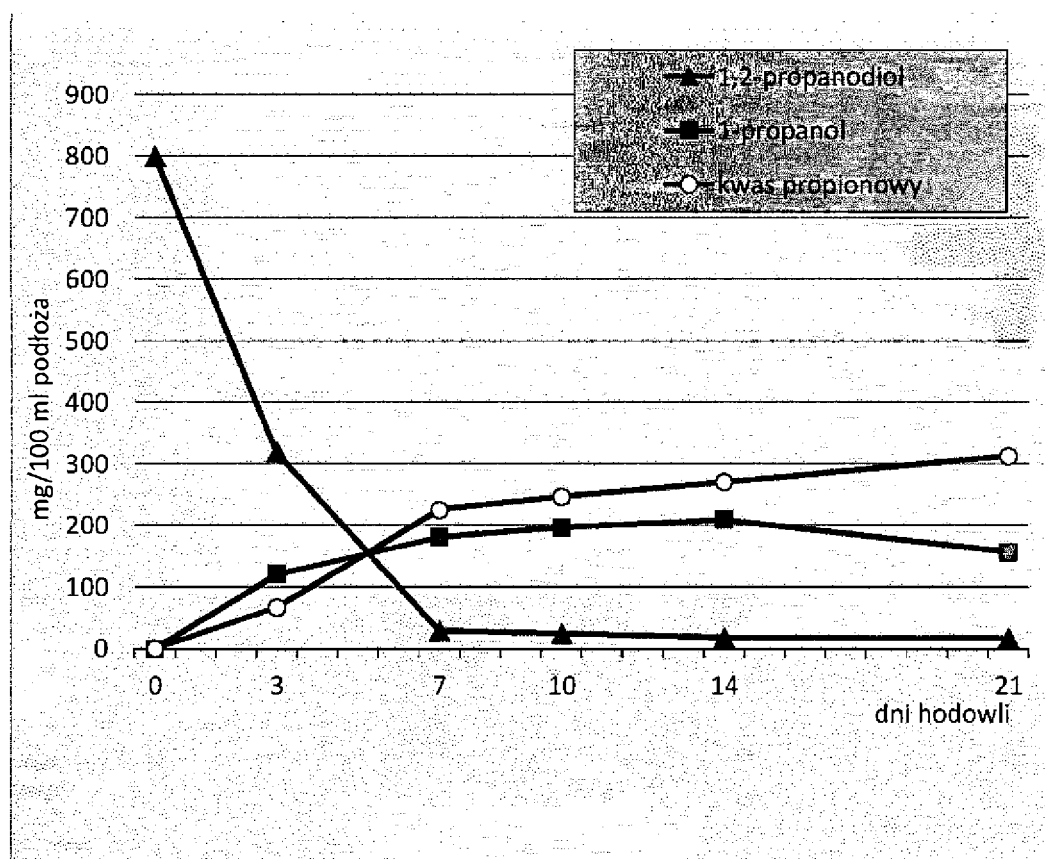


Fig. 1

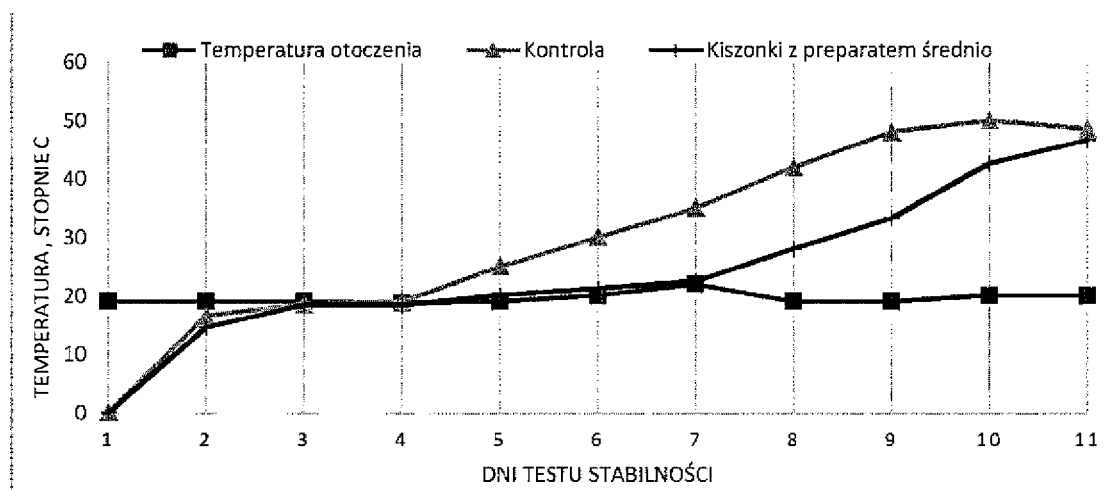


Fig. 2