

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237228**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429133**

(22) Data zgłoszenia: **04.03.2019**

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

(54) **Nowy szczep bakterii *Lactobacillus hilgardii* FLUB oraz zastosowanie szczepu do wytwarzania mannitolu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
07.09.2020 BUP 19/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.03.2021 WUP 06/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ADAM WAŚKO, Lublin, PL
KLAUDIA GUSTAW, Lublin, PL
MAGDALENA POLAK-BERECKA,
Osmolice Pierwsze, PL
KATARZYNA SKRZYPCZAK, Lublin, PL**

PL 237228 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii *Lactobacillus hilgardii* FLUB efektywnie wytwarzający mannitol.

Mannitol jest naturalnie występującym poliolem, szeroko wykorzystywanym w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i chemicznym.

Poliole znalazły swoje zastosowanie jako zamienniki cukru czyli słodzików. Mannitol jest słabo wchłaniany przez organizm ludzki, a zatem wzrost stężenia glukozy we krwi i zapotrzebowanie na insulinę są znacznie mniejsze niż po spożyciu sacharozy. Jest tylko częściowo wchłaniany (~ 25%) z jelita cienkiego i nie jest metabolizowany. Szacuje się że mannitol jest w połowie tak słodki jak sacharoza i ma pożądany efekt chłodzenia, który jest skuteczny w maskowaniu gorzkich smaków. Mannitol można mieszać z innymi składnikami i słodzikami, co może skutkować synergicznym efektem lepszej słodkości i smaku. Ten alkohol cukrowy charakteryzuje się przyjemnym smakiem, stabilnością, nawet w wysokich temperaturach i wysoką temperaturą topnienia (165–169°C).

Jest używany jako środek teksturujący o słodkim smaku. Mannitol zmniejsza skłonność do krystalizacji produktów, wykazuje bardzo niską higroskopijność wydłuża przydatność produktu do spożycia. Najczęściej jest wykorzystywany jako składnik gum do żucia. Ponieważ mannitol nie jest higroskopijny, stosuje się go jako środek wypełniający dla bezcukrowych powłok gum do żucia lub jako powłokę pudrującą aby zapobiec przywieraniu gumy do urządzeń produkcyjnych czy opakowań.

Mannitol w przemyśle farmaceutycznym zapobiega wchłanianiu wilgoci z powietrza, wykazuje doskonałe właściwości mechaniczne takie jak ściśliwość, nie wchodzi w interakcje z aktywnymi składnikami, a jego słodki, chłodny smak maskuje nieprzyjemny smak wielu leków. Może być również stosowany jako silny diuretyk osmotyczny i jako przeciwutleniacz, niweluje działanie wolnych rodników i tym samym może chronić przed rozwojem raka okrężnicy. Wszystkie te właściwości mannitolu sprawiają, że jako dodatek do żywności zwiększa ich wartości odżywcze i prozdrowotne.

Mannitol na drodze chemicznej syntetyzowany jest przez katalityczne uwodornienie mieszaniny fruktozy i glukozy, w wysokiej temperaturze i ciśnieniu. W wyniku reakcji powstaje mieszanina mannitolu i sorbitolu, która musi zostać oczyszczona, co dodatkowo zwiększa cenę produktu końcowego. Wysokie koszty użytych substratów, warunków fizycznych reakcji i konieczność przeprowadzenia trudnego procesu rozdzielenia mannitolu od sorbitolu sprawiają że wytwarzanie mannitolu drogą mikrobiologiczną stało się niezwykle atrakcyjne na skalę przemysłową.

W międzynarodowych patentach opisano szczepy z rodzaju *Lactobacillus* produkujące mannitol. Przykładami takich patentów są: JP6377091A (1991-03-06), EP19910119453 (1991-11-14), US 6,855,526 B2 (2005-02-15), CN 201310111633 (2013-04-01), PCT/CN2014/090476 (2014-11-06).

Znanych jest wiele mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania mannitolu. Publikacja amerykańskiego zgłoszenia patentowego o numerze US2009023195 (A1) dotyczy biotechnologicznego wykorzystania szczepów pochodzących z amerykańskiej kolekcji ARS (NRRL) wśród których wybrano *Lb. intermedius* NRRL B-30560 efektywnie produkujący mannitol. Pierwszorzędowy substrat węglowy zarówno w przemianach fermentacyjnych, jak i biochemicznych stanowi fruktoza, ale wtórnym źródłem węgla może być też glukoza, maltoza, mannoza i galaktoza.

Natomiast z literatury przedmiotu znane są wytwarzające mannitol szczepy: *Lb. hilgardii* NRRL B-1843 oraz *Lb. intermedius* NRRL B-3693 (Arena, M. E., Landete, J. M., Manca de Nadra, M. C., Pardo, I., & Ferrer, S. (2008). Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* XIB isolated from wine. *Journal of applied microbiology*, 105(1), 158–165.)

Celem wynalazku było wyizolowanie z miodu pitnego – środowiska bogatego we fruktozę i inne cukry takie jak glukoza, sacharoza i maltoza, nowego szczepu bakterii, który bez modyfikacji genetycznych będzie efektywnie wytwarzał mannitol na zewnątrz komórki.

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep z gatunku *Lactobacillus hilgardii* FLUB zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie pod numerem KKP 2067p.

Przedmiot wynalazku stanowi również zastosowanie szczepu *Lactobacillus hilgardii* FLUB do wytwarzania mannitolu.

Korzystnie, do wytwarzania mannitolu, jako jedyne źródło węgla stosuje się fruktozę.

Korzystnie, jako źródło węgla stosuje się fruktozę i glukozę.

Korzystnie, dodatek każdego z cukrów fruktozy i glukozy w podłożu hodowlanym wynosi po 4% w/v.

Korzystnie, jako jedyne źródło węgla stosuje się syrop glukozowo-fruktozowy.

Przykład 1

Identyfikacja szczepu

W celu identyfikacji nowego izolatu wykorzystano technikę MALDI-TOF program BioTyper zakwalifikował go jako *Lactobacillus hilgardii* z wynikiem 2,03 co pozwala na pewną identyfikację do rodzaju i prawdopodobne przypisanie do gatunku. Dodatkowo wykonano amplifikację i sekwencjonowanie genu 16S rRNA. Przyporównanie sekwencji genu do bazy NCBI GeneBank wykazuje 100% zgodność badanego szczepu z zamieszczonymi tam sekwencjami gatunku *Lb. hilgardii*.

Wyniki sekwencjonowania fragmentu 16S rRNA, określonego niniejszym wynalazkiem szczepu *Lactobacillus hilgardii* FLUB przedstawiają się następująco:

```
TGCAAGTCGAACGCGTCTTGGTCAATGAAGTTGAGTGCTTGCATTAACT
GATTTGACATTAAGACGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
TTGCCCCGAAGCGGGGGATAACATTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCAT
AACAAACAAAACCACATGGTTTTTGTTTAAAAGATGGTTTCGGCTATCAC
TTTGGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC
CAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGG
TTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAAC

TGTTGACATCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATCGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTATTGGGC
GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCT
TAACCCGAGAAGTGCATCGGAAACCGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG
ACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCG
AAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCT
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGATGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCTAACCTA
AGAGATTAGGCGTTCCCTTCGGGGACGGAATGACAGGTGGTGATGGTT
GTCGTGAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCTTATTGTCAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTGGCGAGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGC
GAAACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTG
TAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGAATC
AGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGGTGAGGTAACCTTCGGGGGC
CAGCC
```

Opisywany szczep *Lactobacillus hilgardii* FLUB charakteryzuje się następującymi cechami morfologicznymi:

- bakterie Gram-dodatnie, nie wytwarzające przetrwalników, mają postać pałeczek występujących pojedynczo lub połączonych w łańcuszki, co przedstawia Fig. 1 (Mikrofotografia komórek *Lb. hilgardii* FLUB ze skaningowego mikroskopu elektronowego, powiększenie 15 000.) na załączonym rysunku,
- wykazują wzrost w warunkach beztlenowych i względnie tlenowych, na pożywce MRS (de Man, Ragosa i Sharpe) z agarem. Kolonie są średniej wielkości o średnicy około 1–3 mm, o okrągłym regularnym kształcie. Profil kolonii jest lekko wypukły, o gładkim regularnym brzegu. Kolonia jest nieprzejrysta, matowa, białego-kremowego koloru. Struktura kolonii jest mazisto-kremowa, po rozmazaniu ciągnąca się, w wodzie czy pożywce łatwo tworzą zawiesinę homogeną. Zapach wydzielany przez kolonie jest wyczuwalny i wyrazisty, charakterystyczny dla fermentacji z dodatkiem etanolu. Wszystkie opisane cechy sprawiają że kolonie tworzone przez szczep *Lb. hilgardii* FLUB są typu S.

Szczep *Lb. hilgardii* FLUB izolowany z miodu pitnego znacznie odbiega od szczepów *Lb. hilgardii* izolowanych z wina, pod względem preferencji wzrostowych. Szczep izolowany z miodu pitnego potrafi rosnąć i namnażać się w wyższych stężeniach cukru. Fig. 1 przedstawia wzrost obu szczepów na pożywkach z 15% i 25% zawartością glukozy, *Lb. hilgardii* wykazuje wzrost aż do 25% stężenia cukru w pożywce.

Wykorzystanie węglowodanów przez szczep *Lb. hilgardii* FLUB zostało określone za pomocą Hi-Carbo Kit (HiMedia, Mumbai, Indie). Szczep wykorzystuje fruktozę, L-arabinozę i D-arabinozę, eskulinę oraz malonian. Pozostałe wyniki zamieszczono w tabeli 1.

T a b e l a 1. Wykorzystanie węglowodanów

Węglowodan	Wynik	Węglowodan	Wynik
laktoza	-	inozytol	-
ksyloza	+	sorbitol	-
maltoza	+	mannitol	-
fruktoza	+	adonitol	-
dekstroza	-	arabitol	-
galaktoza	+	erytrytol	-
rafinoza	-	alfa-metylo-D-glukozyd	-
trehaloza	-	rammnoza	-
melibioza	-	celobioza	-
sacharoza	-	melezitoza	-
L-arabinoza	+	alfa-metylo-D-mannozyd	-
mannoza	-	ksylitol	-
inulina	-	ONPG	-
glukonian sodu	-	eskulina	+
glicerol	-	D-arabinoza	-
salicyna	-	cytrynian	-
dulcytol	-	malonian	+

W celu identyfikacji wykonano także testy API-ZYM (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Francja). Zestawienie wyników zostało umieszczone w tabeli 2.

T a b e l a 2. Profil enzymatyczny

Lp.	Enzym	Substrat	pH	Wynik
1.	kontrola	-	-	-
2.	fosfataza alkaliczna	2-naftylo-fosforan	8,5	-
3.	esteraza (C 4)	2-naftylo-maślan	6,5	+
4.	esteraza Lipaza (C 8)	2-naftylo-kaprylan	7,5	+
5.	lipaza (C 14)	2-naftylo-mirystynian	7,5	+
6.	arylamidaza leucyny	L-leucylo-2-naftylamid	7,5	+
7.	arylamidaza waliny	L-walilo-2-naftylamid	7,5	+
8.	arylamidaza cystyny	L-cystylo-2-naftylamid	7,5	+
9.	trypsyna	N-benzoilo-DL-arginino-2-naftylamid	8,5	-
10.	α -chymotrypsyna	N-glutarylo-feniloalanino-2-naftylamid	7,5	-
11.	fosfataza kwaśna	2-naftylo-fosforan	5,4	+
12.	fosfohydrolaza naftylo-AS-BI	Naftylo-AS-BI-fosforan	5,4	+
13.	α -galaktozydaza	6-Br-2-naftylo- α D-galaktopiranozyd	5,4	+
14.	β -galaktozydaza	2-naftylo- β D-galaktopiranozyd	5,4	+
15.	β -glukuronidaza	Naftylo-AS-BI- β D-glukuronid	5,4	+
16.	α -glukozydaza	2-naftylo- α D-glukopiranozyd	5,4	+
17.	β -glukozydaza	6-Br-2-naftylo- β D-glukopiranozyd	5,4	+
18.	N-acetylo- β -glukozaminidaza	1-naftylo-N-acetyl- β D-glukozaminid	5,4	-
19.	α -mannozydaza	6-Br-2-naftylo- α D-mannopiranozyd	5,4	-
20.	β -fukozydaza	2-naftylo- α L-fukopiranozyd	5,4	-

Wyizolowany z miodu pitnego, nowy szczep *Lb. hilgardii* FLUB charakteryzuje się osmotolerancją, wykazuje odporność na wysokie ciśnienie osmotyczne, wywołane wysokim stężeniem cukrów w środowisku jego występowania, co przedstawiono na Fig. 2. Może mieć to istotne znaczenie w przemysłowej produkcji mannitolu z wykorzystaniem opisywanego szczepu *Lb. hilgardii* FLUB. W badaniach jako szczepów kontrolnych użyto *Lb. hilgardii* NRRL B-1843 oraz *Lb. intermedius* NRRL B-3693. (Arena et al. 2008, Carvalho et al. 2011).

Wyizolowany z miodu pitnego *Lb. hilgardii* FLUB wytwarza najwięcej mannitolu, na pożywce z glukozą i fruktozą (8% w/v, w stosunku 1:1). Po 7 dniach hodowli oznaczono w podłożu hodowlanym obecność mannitolu na poziomie 4,942% dla *Lb. hilgardii* FLUB, 4,295 dla *Lb. hilgardii* NRRL, oraz 1,63% dla *Lb. intermedius* NRRL. Po piątym dniu ilość mannitolu zaczyna spadać w przypadku *Lb. intermedius* NRRL. W przeciwieństwie do *Lb. intermedius* NRRL, gatunek *Lb. hilgardii* wtórnie nie metabolizował wytworzonego mannitolu, jako źródła węgla, co poza zdolnością efektywnej produkcji, jest cechą pożądaną. Stwierdzono również, że *Lb. hilgardii* FLUB w odróżnieniu od *Lb. hilgardii* NRRL B-1843 wykazuje zdolność do efektywnej biosyntezy mannitolu z fruktozy, gdy jest ona jedynym źródłem węgla w pożywce. W przypadku produkcji mannitolu z użyciem *Lb. hilgardii* FLUB na pożywce z fruktozą, procentowa zawartość tego polioliu była o ponad 100% wyższa niż w badanych szczepach kontrolnych *Lb. hilgardii* NRRL B-1843 i *Lb. intermedius* NRRL. W przypadku użycia pożywki 8% fruktozy, zaobserwowano generalnie mniejsze ilości wytwarzanego mannitolu niż z użyciem pożywki z mieszaniną cukrów 4% glukozy i 4% fruktozy. Jako że mannitol syntezowany jest z fruktozy za pomocą enzymu dehydrogenazy mannitolu, komórki wszystkich wykorzystanych w tym badaniu gatunków wykorzystują glukozę na potrzeby metaboliczne, zaś fruktozę konwertują do mannitolu. W badaniu sprawdzono także produkcję mannitolu na tanim źródle cukrów jakim jest syrop glukozowo-fruktozowy. Tutaj także *Lb. hilgardii* FLUB wytwarza większe ilości mannitolu w 7 dobie 0,25%, natomiast *Lb. hilgardii* NRRL, w 7 dobie 0,19%. *Lb. intermedius* NRRL nie wytwarzał mannitolu na tym źródle węgla. Może być to spowodowane faktem iż syrop glukozowo-fruktozowy jest mieszaniną różnych cukrów nie tylko glukozy i fruktozy, co może powodować zbyt wysokie stężenie osmotyczne dla *Lb. intermedius* NRRL, lub obecność innych cukrów przekierowuje ten gatunek na inne szlaki metaboliczne. Jednakże wyniki wykonanych badań potwierdziły wyższą efektywność wytwarzania mannitolu przez opisywany szczep *Lb. hilgardii* FLUB po 7 dniach niż u pozostałych *Lb. hilgardii* NRRL i *Lb. intermedius* NRRL. W wykonanych analizach widoczne jest większe powinowactwo do fruktozy u *Lb. hilgardii* FLUB, co spowodowane jest przystosowaniem się do

środowiska w którym żyje. Miód pitny z którego został wyizolowany, jest niekorzystnym środowiskiem ze względu na alkohol, czy wysokie stężenia cukrów, dlatego szczep *Lb. hilgardii* FLUB wykształcił odpowiednie mechanizmy aby przejąć tę niszę ekologiczną. Jego przystosowanie do środowiska bogatego w cukry, a w szczególności w fruktozę, spowodowało to, że jest on doskonałym producentem mannitolu.

Przykład 2

Wytwarzanie mannitolu z fruktozy przez szczep *Lb. hilgardii* FLUB

Kolby z pożywką MRS zaszczerpiono 2% inokulum. Hodowle założono na podłożu hodowlanym z dodatkiem fruktozy 8% (w/v). Hodowle prowadzono przez 7 dni w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 150 rpm (Minitron Incubator Shaker Infors AG, Szwajcaria). Codziennie pobierano próbki hodowli i po odwirowaniu biomasy czysty płyn pohodowlany przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz. Procentową zawartość mannitolu określono za pomocą HPLC (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Francja). Próbki wcześniej oczyszczono z białek za pomocą odczynnika Carreza I II. Stężenie mannitolu odczytano z chromatogramów z wykorzystaniem oprogramowania CHROMAX (POL-LAB). Procentową ilość wytworzonego przez badane szczepy mannitolu w każdym dniu hodowli przedstawiono w Tabeli 3 z uwzględnieniem wydajności procesu biosyntezy oraz na wykresie przedstawionym na Fig. 3.

Tabela 3

dni	Mannitol w pożywce [%]		
	<i>Lactobacillus hilgardii</i> FLUB	<i>Lactobacillus hilgardii</i> NRRL	<i>Lactobacillus intermedius</i> NRRL
I	0,253	0,230	0,284
II	0,369	0,258	0,325
III	0,556	0,233	0,544
IV	1,673	0,928	0,963
V	1,993	1,112	3,010
VI	2,786	1,329	1,887
VII	3,698	1,604	1,351

Przykład 3

Wytwarzanie mannitolu z glukozy i fruktozy przez szczep *Lb. hilgardii* FLUB

Kolby z pożywką MRS zaszczerpiono 2% inokulum. Hodowle założono na podłożu hodowlanym z dodatkiem glukozy i fruktozy po 4% w/v każdego cukru. Hodowle prowadzono przez 7 dni w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 150 rpm (Minitron Incubator Shaker Infors AG, Szwajcaria). Codziennie pobierano próbki hodowli i po odwirowaniu biomasy czysty płyn pohodowlany przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz. Procentową zawartość mannitolu określono za pomocą HPLC (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Francja). Próbki wcześniej oczyszczono z białek za pomocą odczynnika Carreza I II. Stężenie mannitolu odczytano z chromatogramów z wykorzystaniem oprogramowania CHROMAX (POL-LAB). Procentową ilość wytworzonego przez badane szczepy mannitolu w każdym dniu hodowli przedstawiono w Tabeli 4 z uwzględnieniem wydajności procesu biosyntezy oraz na wykresie przedstawionym na Fig. 4.

Tabela 4

dni	Mannitol w pożywce [%]		
	<i>Lactobacillus hilgardii</i> FLUB	<i>Lactobacillus hilgardii</i> NRRL	<i>Lactobacillus intermedius</i> NRRL
I	0,152	0,181	0,147
II	0,309	0,223	0,284
III	0,506	0,379	0,515
IV	1,933	1,496	1,356
V	2,205	1,962	3,549
VI	3,099	3,120	2,090
VII	4,942	4,295	1,630

Przykład 4

Wytwarzanie mannitolu przez *Lb. hilgardii* FLUB z wykorzystaniem syropu glukozowo-fruktozowego

Kolby z pożywką MRS zaszczerpiono 2% inokulum. Hodowle założono na podłożu, gdzie jedynym źródłem węgla był syrop glukozowo-fruktozowy 8% (w/v). Hodowle prowadzono przez 7 dni w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 150 rpm (Minitron Incubator Shaker Infors AG, Szwajcaria). Po 4 i 7 dobie pobierano próbki hodowli i po odwirowaniu biomasy czysty płyn pohodowlany przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz. Procentową zawartość mannitolu określono za pomocą HPLC (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Francja). Próbki wcześniej oczyszczono z białek za pomocą odczynnika Carreza I i II. Stężenie mannitolu odczytano z chromatogramów z wykorzystaniem oprogramowania CHROMAX (POL-LAB). Procentową ilość wytworzonego przez badane szczepy mannitolu w każdym dniu hodowli przedstawiono w Tabeli 5 z uwzględnieniem wydajności procesu biosyntezy oraz na wykresie przedstawionym na Fig. 5.

Tabela 5

Dni	Mannitol w pożywce [%]	
	<i>Lactobacillus hilgardii</i> FLUB	<i>Lactobacillus hilgardii</i> NRRL
I	0,082	0,055
II	0,124	0,098
III	0,153	0,149
IV	0,186	0,188
V	0,192	0,189
VI	0,221	0,191
VII	0,249	0,194

Zastrzeżenia patentowe

1. Nowy szczep bakterii *Lactobacillus hilgardii* FLUB zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie pod numerem KKP 2067p.
2. Zastosowanie szczepu jak określono w zastrz. 1 do wytwarzania mannitolu,
3. Zastosowanie według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że jako jedyne źródło węgla stosuje się fruktozę.
4. Zastosowanie według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że jako źródło węgla stosuje się fruktozę i glukozę.
5. Zastosowanie według zastrz. 4, **znamiennie tym**, że dodatek każdego z cukrów fruktozy i glukozy w podłożu hodowlanym wynosi po 4% w/v.
6. Zastosowanie według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że jako jedyne źródło węgla stosuje się syrop glukozowo-fruktozowy.

Rysunki

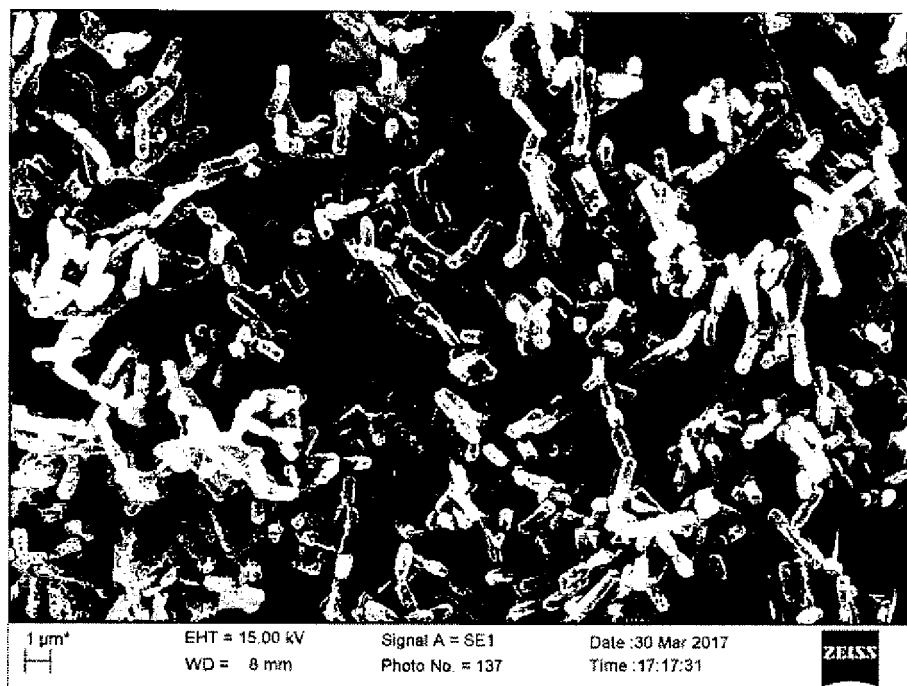


Fig.1

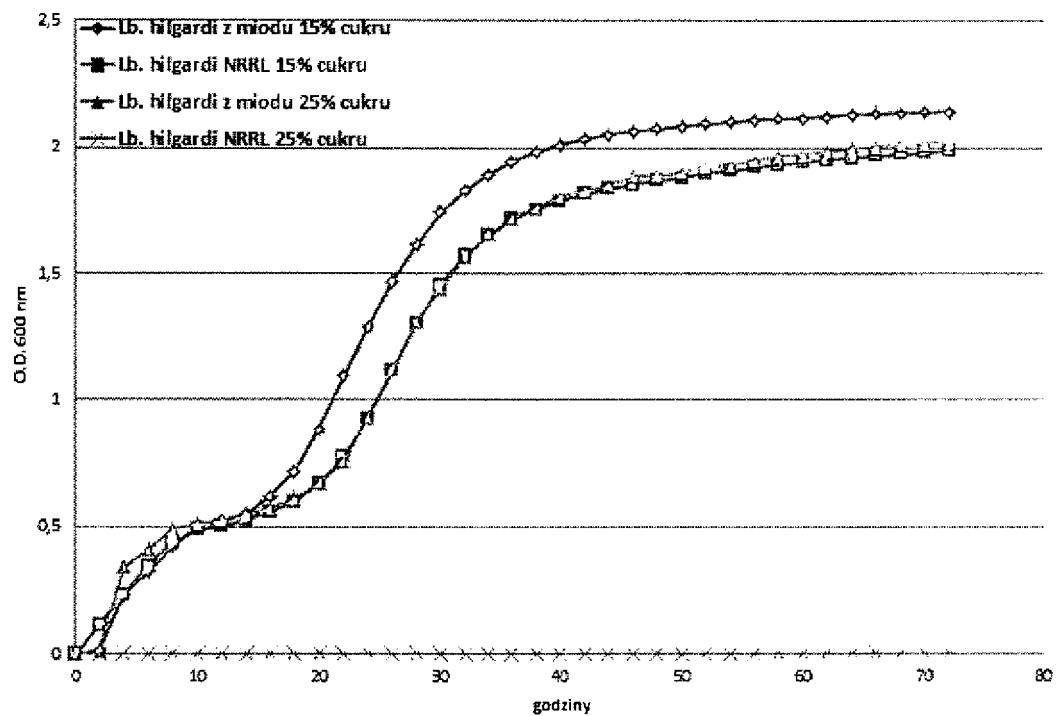


Fig.2

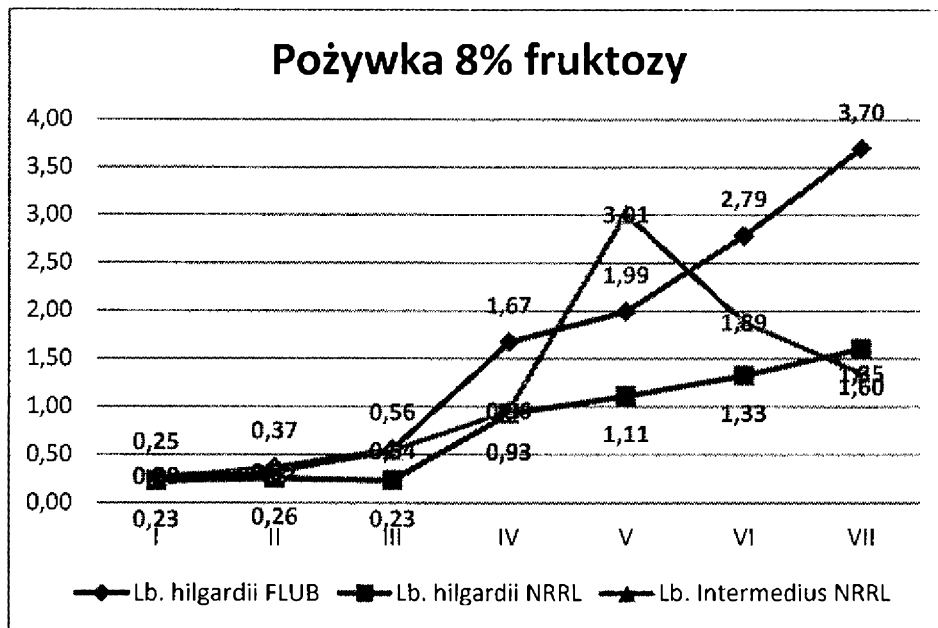


Fig.3

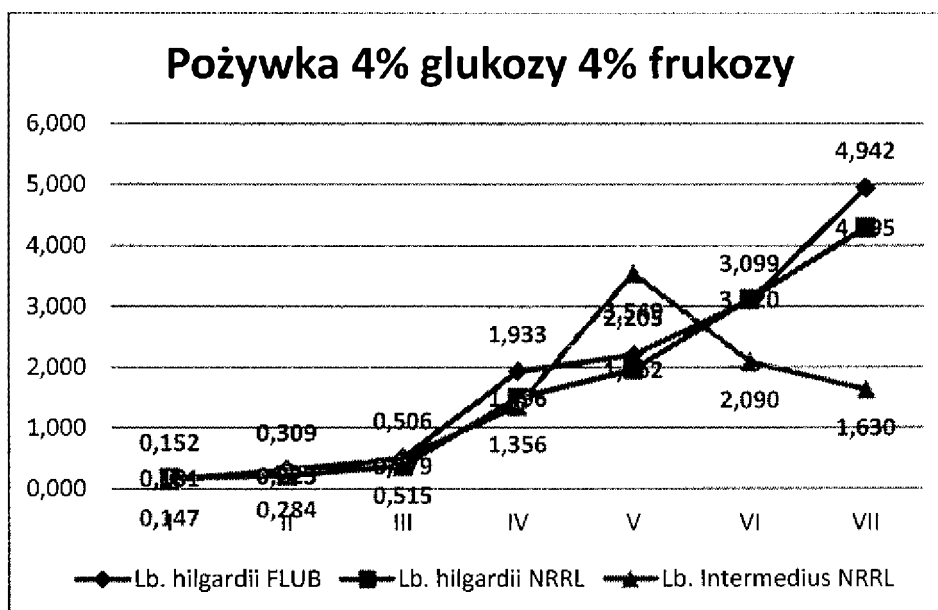


Fig.4

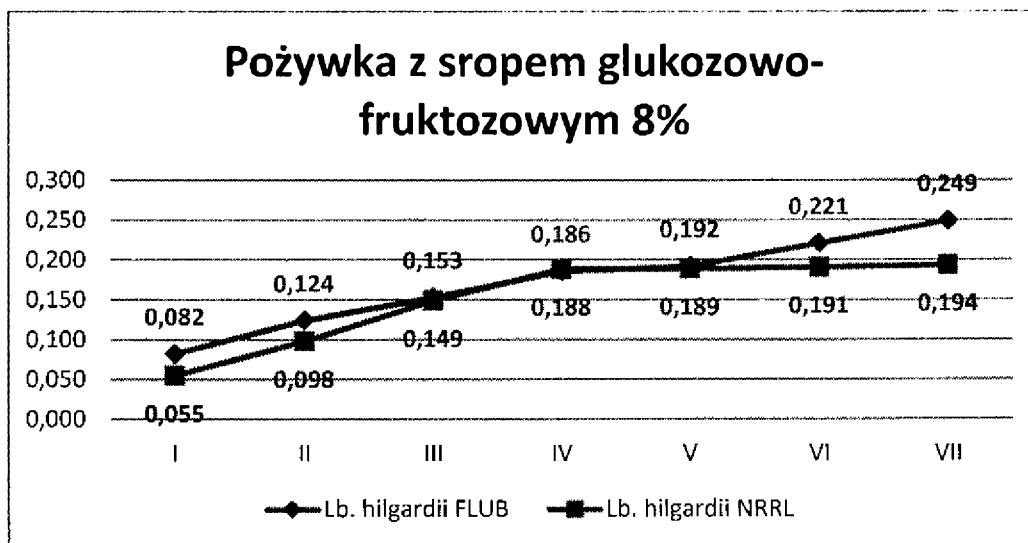


Fig.5