

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **241759**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **434201**

(22) Data zgłoszenia: **04.06.2020**

(51) Int.Cl.
A61K 31/702 (2006.01)
A23L 33/21 (2016.01)

(54) **Hydrolizat α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego
Laetiporus sulphureus do zastosowania jako oligosacharydowy prebiotyk**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
06.12.2021 BUP 36/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
05.12.2022 WUP 49/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ,
Lublin, PL**

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

ADRIAN WIATER, Lublin, PL

MAŁGORZATA PLESZCZYŃSKA, Lublin, PL

JANUSZ SZCZODRAK, Lublin, PL

PAULINA ADAMCZYK, Rudno, PL

ADAM WAŚKO, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Maria Brodzicka

PL 241759 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest hydrolizat α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego *Laeliporus sulphureus*, znajdujący zastosowanie jako prebiotyk dla ludzi i zwierząt wspomagający namnażanie i wzrost dobroczynnej mikroflory jelitowej, zaburzonej np. na skutek przebytej antybiotykoterapii, stresu lub nieprawidłowej diety.

Do znanych i wymienionych przykładowo w publikacji *J. Appl. Glycosci.*, 2005, 52, 267–271; *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2016, 902, 119–142; *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 27, 1119–1128, prebiotyków zalicza się, m.in. oligosacharydy czyli węglowodany o niskiej masie cząsteczkowej, zawierające od dwóch do kilkunastu jednostek monosacharydowych. Przykładem oligosacharydów są pochodne skrobi, jak np., maltooligosacharydy, izomaltooligosacharydy, nigerooligosacharydy, cyklodekstryny, trehaloza, gentioooligosacharydy, kojooligosacharydy; pochodne sacharozy, takie jak, fruktooligosacharydy, izomaltuloza, rafinoza, stachioza; czy też pochodne laktozy typu, galaktooligosacharydy, laktuloza, laktitol i inne.

Oligosacharydy takie mogą być otrzymywane poprzez bezpośrednią ekstrakcję z nieprzetworzonych surowców roślinnych lub zwierzęcych, np. oligosacharydy sojowe; syntezę chemiczną z disacharydów, np. oporne dekstryny, laktuloza; syntezę z użyciem enzymów, np. ksylo- i galaktooligosacharydy czy też kontrolowaną hydrolizę chemiczną lub enzymatyczną różnego rodzaju polisacharydów, np. fruktooligosacharydy z inuliny.

Ze względu na cenne z punktu widzenia technologii produkcji żywności własności fizykochemiczne, takie jak dobra rozpuszczalność w wodzie, brak zapachu, umiarkowana zawartość sacharozy, wysoka zdolność do utrzymywania wilgotności bez zwiększania aktywności wody, stabilność w szerokim przedziale pH, czy też zdolność do stabilizacji różnych substancji aktywnych, wiele z wymienionych oligosacharydów stosowanych jest jako dodatki do żywności, szczególnie napojów, wyrobów cukierniczych i mleczarskich (*Food Res. Int.*, 2009, 42, 8–12; *Carbohydr. Pol.*, 2007, 68, 587–597). Najważniejszą jednak przyczyną zainteresowania oligosacharydami jako dodatkami do żywności są ich właściwości biologiczne. Układ pokarmowy zasiedlony jest przez bardzo liczną i złożoną populację bakterii, głównie beztlenowych. Oligosacharydy w znacznym stopniu modyfikują skład tej mikroflory jelitowej, ponieważ służą jako substraty dla wzrostu i namnażania się bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, które uważane są za korzystnie wpływające na organizm gospodarza (*Ann. Rev. Nutr.*, 2002, 22, 104–138; *Int. Dairy J.*, 1999, 9, 69–80; *Adv. Exp. Med Biol.*, 2016, 902, doi 10.1007/978-3-319-31248-4-9). Oligosacharydy fermentowane są przez te mikroorganizmy do kwasu mlekowego oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, takich jak kwas octowy, masłowy czy propionowy. Dowiedziono, że prebiotyczne oligosacharydy mają udział w terapii i profilaktyce schorzeń układu pokarmowego, zapewniając właściwe funkcjonowanie jelit, wpływają na poprawę funkcji immunologicznych organizmu poprzez zwiększanie produkcji IgA, interleukiny 10 oraz liczebności i aktywności fagocytarnej leukocytów, a także są stosowane w profilaktyce chorób krążenia, ponieważ ograniczają wchłanianie glukozy, cholesterolu i tłuszczów ze światła przewodu pokarmowego.

Prebiotyczne oligosacharydy zawierające jedno lub wiele wiązań α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukozydowych znane są jako nigerooligosacharydy i charakteryzują się stopniem polimeryzacji od 2 do 10. Poza wiązaniami α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukozydowymi, mogą zawierać wiązania α -(1 $\rightarrow$ 1), α -(1 $\rightarrow$ 2), α -(1 $\rightarrow$ 4) lub α -(1 $\rightarrow$ 6)-glukozydowe, w różnej proporcji (*M. Stacey and J. M. Webber: Methods in Carbohydrate Chemistry, I*, 339–341, Academic Press, 1962).

Dotychczas opisano (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66, 1806–1818; *J. Biosci. Bioeng.* 2002, 94, 336–342) cykliczne nigerooligosacharydy (CNN) zawierające cztery reszty D-glukopiranozowe połączone naprzemiennie występującymi wiązaniami α -(1 $\rightarrow$ 3)- i α -(1 $\rightarrow$ 6)-glukozydowymi. CNN są syntetyzowane z dekstranopodobnego polisacharydu z użyciem degradującego go enzymu (*Eur. J. Biochem.*, 1994, 226, 633–639 i 641–648) lub z maltodekstryn poprzez łączne działanie 6- α -glukozylotransferazy i 3- α -izomaltozylotransferazy (*J. Biosci. Bioeng.*, 2003, 95, 215–224; *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2002, 14, 321–333). Jak doniesiono w *J. Agricultural Food Chem.* 2005, 53, 5911–5916; *Lett. Appl. Microbiol.* 2005, 40, 385–390, również liniowe oligosacharydy zawierające reszty glukozydowe połączone wiązaniami α -(1 $\rightarrow$ 3)-, α -(1 $\rightarrow$ 6)-glukozydowymi mają właściwości prebiotyczne. Są one wytwarzane przez enzym alternanosacharazę z *Leuconostoc mesenteroides* w obecności akceptorów cukrowych o niskiej masie cząsteczkowej. Nigerooligosacharydy będące mieszkanką nigerozy (dimer), nigerozyloglukozy (trimer) i nigerozylomaltozy (tetramer) są produkowane na dużą skalę z maltozy przy użyciu α -glukozydazy wytwarzanej przez *Acremonium implicatum* S4G13, co ujawniono w opisie

patentowym JP 59559 i publikacji *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61, 439-442. Z opisu patentowego JP 322958 znana jest też metoda otrzymywania nigerozy w reakcji hydrolizatów skrobi z glukano-transferazą cyklodekstrynową. Nigerooligosacharydy mogą być otrzymywane także w procesach hydrolizy enzymatycznej lub kwasowej, takich polimerów produkowanych przez mikroorganizmy, jak nigeran lub elsinan (*M Stacey and J. M. Webber: Methods in Carbohydrate Chemistry, I, 339-341, Academic Press, 1962*). Ponadto, jak opisano w publikacji *Agric. Biol. Chem.*, 1988, 52, 1345-135, otrzymywane są także w procesie katalizowanej przez α -glukozydazę, transglikozylacji czy kondensacji. Z opisu patentowego JP 759559 znana jest również metoda produkcji nigerooligosacharydów w reakcji polisacharydów lub oligosacharydów zawierających wiązania α -(1 $\rightarrow$ 4)-glukozydowe z glukozylotransferazą pochodzącą z hodowli grzyba z rodzaju *Acremonium* sp., która syntetyzuje wiązania α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukozydowe. (1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glukan może pochodzić z różnych źródeł, m.in. roślin, bakterii, a szczególnie grzybów. Polisacharydy izolowane z grzybów, w tym z owocników grzybów wielkoowocnikowych, mają zróżnicowaną budowę chemiczną, składają się z różnych monomerów połączonych wiązaniami (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4), (1 $\rightarrow$ 6)-glikozydowymi. Najlepiej poznane pod względem właściwości biologicznych są homopolimery glukozy, głównie β -glukanu np, lentinian, schiozofylan czy grifolan, natomiast słabo zbadane pod tym względem są α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukany. Wiadomo, że biopolimery zbudowane z jednostek glukozy połączonych wiązaniami α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukozydowymi, których obecność stwierdzono w ścianie komórkowej takich gatunków grzybów jak, drożdże *Schizosaccharomyces*, grzyby nitkowate z rodzaju *Aspergillus*, grzyby wielkoowocnikowe, jak np., *Pleurotus*, *Fomitopsis* czy *Laeliporus*, są nierozpuszczalne w wodzie, natomiast rozpuszczają się w alkaliach. Do tej pory w publikacjach *Appl. Microbiol Biotechnol*, 2002, 60, 258-274; *Carbohydr. Res.*, 2001, 336, 127-140; *Biotechnol. Lett.*, 2011, 33, 787-795; *Biol. Pharmaceutical Bull*, 1996, 19, 114-121; *Int. J. Biol. Macromol*, 2012, 51, 1014-1023, opisano głównie właściwości immunomodulacyjne tych polisacharydów. Z publikacji w *Carbohydr. Pol.*, 2009. 56, 548-556, znany jest jako prebiotyk w stosunku do bakterii *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, liniowy α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukan pochodzący jedynie z grzyba *Pleurotus ostreatus* i *Pleurotus eryngii*.

Jak dotąd, w znanym stanie techniki, nie ujawniono źródła otrzymywania oligosacharydów o właściwościach prebiotycznych w wyniku hydrolizy grzybowych α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, a duże zapotrzebowanie na takie składniki sprawia, że wciąż poszukuje się nowych, relatywnie tanich i łatwo dostępnych źródeł prebiotyków, co było celem niniejszego wynalazku.

Nieoczekiwanie okazało się, że hydrolizat α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, wyizolowanych z powszechnie dostępnego o stosunkowo niskiej cennie surowca, jakim są owocniki żółciaka siarkowego *Laetiporus sulphureus*, w efekcie daje substancję o wysokim stopniu bifidogennym.

Istotą wynalazku jest hydrolizat α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów otrzymany poprzez częściową hydrolizę kwasową grzybowego α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanu, z owocników żółciaka siarkowego *Laetiporus sulphureus*, zawierający α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukooligosacharydy do zastosowania jako prebiotyk.

Otrzymanie oligosacharydów z α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego, z użyciem częściowej hydrolizy kwasowej, umożliwia pozyskanie mieszaniny α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukooligosacharydów o stopniu polimeryzacji od 2 do 10, co przedkłada się na ich wysokie właściwości prebiotyczne, na przykład, w stosunku do bakterii mlekowych *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, wyrażone poprzez wartości gęstości optycznej (OD₆₀₀) hodowli tych bakterii, odczytywane w hodowlach *in vitro*, co opisano w poniższych przykładach.

Przykład 1. Otrzymywanie hydrolizatu α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów wyizolowanych z żółciaka siarkowego *Laetiporus sulphureus*.

50 g wysuszonych i zmielonych owocników żółciaka siarkowego *Laetiporus sulphureus*, zawieszano w 2 dm³ wody destylowanej i gotowano przez 60 min w autoklawie w temp. 121°C, po czym pozostawiono na 12 godz. w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu i przepłukaniu wodą destylowaną, czynność tę powtarzano jeszcze 2-krotnie. Przepłukany i odwirowany osad zawieszano w 2 dm³ 1M NaOH i mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego (300 obr/min) przez 24 godziny. Po tym czasie, uzyskany po odwirowaniu supernatant, neutralizowano przy użyciu 1M HCl. Wtrącony biały, amorficzny precypitat (α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukany) przepłukiwano 3-krotnie wodą destylowaną, zamrażano i suszono w liofilizatorze. 40 g otrzymanych α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów poddano hydrolizie przy użyciu 100 ml 0,1 M H₂SO₄ w ciągu 1 godz. w temp. 100°C. Pozostałości usunięto przez odwirowanie w ciągu 20 min, przy 12000 obr/min. Otrzymany supernatant zneutralizowano za pomocą CaCO₃. Po ponownym odwirowaniu w warunkach jak wyżej, supernatant poddano odsoleniu, a odsolony roztwór zawierający α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukooligosacharydy zagęszczono za pomocą wyparki próżniowej i zliofilizowano. Analizę składu otrzymanego

Przykład 2. Badanie potencjalnego efektu prebiotycznego hydrolizatu według wynalazku na bakterie *Lactobacillus acidophilus*.

Tak przygotowane podłoża zaszczerpiono szczepem bakterii kwasu mlekowego *Lactobacillus acidophilus* PCM 2499 i inkubowano warunkach beztlenowych, w temperaturze 37°C, w czasie 72 godzin. W czasie trwania hodowli, prowadzonej w automatycznym czytniku wzrostu mikroorganizmów, monitorowano co dwie godziny jej gęstość optyczną OD₆₀₀. Każdy pomiar wykonano trzykrotnie a wynik przedstawiono jako wartość średnią. Uzyskane w czasie hodowli wartości gęstości optycznej OD₆₀₀ bakterii *L. acidophilus* PCM 2499 rosnących odpowiednio na hydrolizacie α-(1→3)-glukanów, FOS i inulinie przedstawiono w tabeli 2.

W warunkach jak w przykładzie 2 przeprowadzono hodowlę bakterii kwasu mlekowego *L. plantarum* ATTC 14917 na pożywkach zawierających hydrolizat α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, FOS i inulinie jako jedynym źródle węgla. Uzyskane w czasie hodowli wartości gęstości optycznej OD₆₀₀ bakterii *L. plantarum* ATTC 14917 rosnących odpowiednio na hydrolizacie α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, FOS i inulinie przedstawiono w tabeli 2.

W warunkach jak w przykładzie 2 przeprowadzono hodowlę bakterii kwasu mlekowego *L. acidophilus* ATTC 20079 na pożywkach zawierających hydrolizat α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, FOS i inulinie jako jedynym źródle węgla. Uzyskane w czasie hodowli wartości gęstości optycznej OD₆₀₀ bakterii *L. acidophilus* ATTC 20079 rosnących odpowiednio na hydrolizacie α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, FOS i inulinie przedstawiono w tabeli 2.

W warunkach jak w przykładzie 2 przeprowadzono hodowlę bakterii kwasu mlekowego *B. infantis* ATTC 1567 na pożywkach zawierających hydrolizat α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, FOS i inulinie jako jedynym źródle węgla. Uzyskane w czasie hodowli wartości gęstości optycznej OD₆₀₀ bakterii *B. infantis* ATTC 1567 rosnących odpowiednio na hydrolizacie α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, FOS i inulinie przedstawiono w tabeli 2.

W warunkach jak w przykładzie 2 przeprowadzono hodowlę bakterii kwasu mlekowego *B. bifidum* ATTC 41410 na pożywkach zawierających hydrolizat α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów. FOS i inulinie jako jedynym źródle węgla. Uzyskane w czasie hodowli wartości gęstości optycznej OD₆₀₀ bakterii *B. bifidum* ATTC 41410 rosnących odpowiednio na hydrolizacie α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, FOS i inulinie przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 1.

Cukry (%)									
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
14,4	17,5	16,8	14,8	12,0	9,1	6,7	4,4	2,9	1,4

G1 – glukoza, G2-G10 – α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukooligosacharydy

Tabela 2

Przykład	Mikroorganizm	Prebiotyk	Wartość gęstości optycznej komórek [OD ₆₀₀] po czasie hodowli 72 godz.
2.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> PCM 2499	Inulina	0,025
		FOS	0,05
		hydrolizat α -(1→3)-glukanów	0,32
3.	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATTC 14917	Inulina	0
		FOS	0,08
		hydrolizat α -(1→3)-glukanów	0,35
4.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATTC 20079	Inulina	0
		FOS	0,11
		hydrolizat α -(1→3)-glukanów	0,42
5.	<i>Bifidobacterium infantis</i> ATTC 1567	Inulina	0,05
		FOS	0,2
		hydrolizat α -(1→3)-glukanów	1,05
6.	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATTC 41410	Inulina	0,05
		FOS	0,18
		hydrolizat α -(1→3)-glukanów	0,92

Zastrzeżenie patentowe

1. Hydrolizat α -(1→3)-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego *Laetiporus sulphureus* do zastosowania jako oligosacharydowy prebiotyk zawierający α -(1→3)-glukooligosacharydy.