

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **215973**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **393189**

(51) Int.Cl.  
**C12N 1/20 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **09.12.2010**

(54)

**Preparat bakteryjny oraz medium liofilizacyjne**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**18.06.2012 BUP 13/12**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**28.02.2014 WUP 02/14**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODNICZY  
W LUBLINIE, Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ADAM WAŚKO, Lublin, PL**

**MAGDALENA POLAK-BERECKA,  
Osmolice, PL**

**MONIKA KORDOWSKA-WIATER, Natalin, PL**

**AGNIESZKA KUBIK-KOMAR, Lublin, PL**

**ZDZISŁAW TARGOŃSKI, Lublin, PL**

**PL 215973 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest preparat bakteryjny zawierający żywe bakterie z rodziny *Lactobacillaceae* oraz medium liofilizacyjne dla konserwacji żywych bakterii z rodziny *Lactobacillaceae*.

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* pełnią ważną rolę w życiu ssaków, a w tym człowieka. Są one między innymi składnikami wielu środków spożywczych i preparatów leczniczych. W celu zapewnienia im długiej żywotności poddaje się je liofilizacji w medium. Medium z jednej strony musi zapewnić nawodnienie żywych komórek, a z drugiej strony zapewnić biochemiczną ochronę żywych komórek przed uszkodzeniem w trakcie zamrażania lub suszenia.

W tradycyjnym medium liofilizacyjnym wykorzystuje się mleko odtłuszczone z dodatkiem węglowodanów np. sacharozy. Jednak ze względu na możliwość alergennego działania białek mleka w nowszych preparatach mleko zastępuje się substancjami prebiotycznymi, jak np. fruktooligosacharydy czy inulina.

Z praktyki znany jest preparat „Lactiv up” zawierający liofilizat bakterii *Lactobacillus acidophilus* oraz inulinę, która stanowi składnik medium liofilizacyjnego. Preparat ten służy do przywracania prawidłowej flory bakteryjnej w przewodzie pokarmowym człowieka po lub w trakcie leczenia antybiotykami.

Inny preparat o nazwie „LaciBios femina” zawiera liofilizowane szczepy bakterii *Lactobacillus rhamnosus* na podłożu zawierającym skrobię ziemniaczaną i mikrokrystaliczną celulozę. Preparat pomaga przywrócić właściwą florę bakteryjną układu moczowo-płciowego kobiety.

Z kolei preparat o nazwie „Gynoflor” zawiera liofilizat bakterii *Lactobacillus acidophilus* na podłożu zawierającym laktozę jednowodną i celulozę mikrokrystaliczną. Preparat pomaga przywrócić właściwą florę bakteryjną układu moczowo-płciowego kobiety.

Znanych jest też szereg zastosowań spiruliny. Ze skrótów opisów zgłoszeń patentowych JP 2003009813 i JP 2003061614 znana jest zdrowa żywność zawierająca m.in. spirulinę oraz bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Wymienione suplementy diety działają na organizm człowieka, co objawia się redukcją stresu. W opisie patentowym RU 2183464 przedstawiony jest preparat spiruliny o działaniu immunomodulacyjnym na organizm człowieka i potencjalnym zastosowaniu w terapii chorób.

Znanych jest także szereg publikacji naukowych, a w tym:

1. „Probiotic efficiency of *Spirulina platensis*-stimulating growth of lactic acid bacteria Dola Bhowmik, et. al World Journal of Dairy & Food Sciences, 2009, Vol. 4 No. 2 pp. 160-163.
2. „Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*” Parada JL, et. al. Int J., Food Microbiol., 1998 grudzień 22; 45(3), str. 225-8.
3. „Effect of *Spirulina platensis* biomass on the growth of lactic acid bacteria in milk”. World Journal of Microbiology and Biotechnology tom 16, Issue 6, 07/2000 str. 563-565.
4. Influence of *Spirulina platensis* powder on the microflora of yoghurt and acidophilus milk” Guldass, M.; Irkin, R. Mljekarstvo 2010 Vol. 60 No. 4 pp. str. 237-243.
5. Spirulina in Human Nutrition and Health, M. E. Gershwin, Amha Belay, Taylor & Francis, 08-10-2007, str. 328,

które dotyczą zastosowania Spiruliny do stymulacji wzrostu komórek bakterii kwasu mlekowego w hodowlach płynnych w warunkach *in vitro*. W przytoczonych pracach efektem suplementacji medium hodowlanego spiruliną jest przyrost biomasy bakterii.

Z kolei w opisie patentowym PL 159645 przedmiotem wynalazku są liofilizowane kultury bakterii kefirowych i jogurtowych, a skład medium liofilizacyjnego to sacharoza granulowana, skrobia ziemniaczana oraz talk.

Istota medium liofilizacyjnego dla bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus*, zawierającego dwucukier oraz wodę, polega na tym, że medium zawiera do 3% spiruliny, zaś dwucukier stanowi sacharoza lub laktuloza, przy czym ilość jednego z nich nie przekracza 15% w/v, zaś ich łączna ilość nie przekracza 20% w/v oraz wodę do 100.

Istota preparatu bakteryjnego zawierającego liofilizowane bakterie z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* oraz dwucukier, znamienny tym, że zawiera spirulinę, zaś dwucukier stanowi sacharoza lub laktuloza, przy czym stosunek wagowy ilości spiruliny do ilości dwucukrów wynosi od 1:10 do 1:35.

Preparaty symbiotyczne wytworzone na bazie bakterii liofilizowanych w medium według wynalazku, łączą w sobie probiotyczne działanie bakterii z wartościami odżywczymi i prozdrowotnymi spiruliny, bez udziału białek mleka jako potencjalnych czynników uczulających. Medium według wynalazku może być stosowane do przygotowania liofilizatów bakterii z gatunku *Lactobacillus*

*rhamnosus* możliwych do stosowania przez osoby uczulone na białka mleka. Liofilizowane bakterie tego rodzaju mogą znaleźć zastosowanie do produkcji preparatów probiotycznych w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i paszowym.

Badania porównawcze przeżywalności bakterii po liofilizacji z użyciem opracowanego podłoża i medium zawierającego mleko odtłuszczone wykazały większy efekt ochronny podłoża będącego przedmiotem wynalazku niż znanego podłoża, to jest dzięki medium według wynalazku można osiągnąć ten sam efekt terapeutyczny przy wykorzystaniu znacznie mniejszej liczby bakterii niż w przypadku preparatu opartego na znanym medium.

Zawarta w podłożu spirulina i laktuloza nadają mu charakter prebiotyczny. Spirulina jest suplementem diety, ma status GRAS (uznana jako bezpieczna dla zdrowia ludzi i zwierząt) jest bogatym źródłem białek, witamin, istotnych aminokwasów, minerałów, kwasów tłuszczowych, glikolipidów, sulfolipidów i różnych związków fitochemicznych. Po spożyciu spirulina wywiera pozytywny wpływ na przewód pokarmowy i układ immunologiczny człowieka. Spirulina stymuluje również wzrost bakterii kwasu mlekowego (z rodzaju *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*). Przeprowadzone badania wykazały, że spirulina działa ochronnie na komórki bakterii *Lactobacillus rhamnosus* podczas liofilizacji.

Laktuloza w odróżnieniu od innych dwucukrów nie ulega hydrolizie ani wchłanianiu w jelicie cienkim. Jest fermentowana dopiero w jelicie grubym przez bakterie z rodzajów *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Lactobacillus*. W procesie bakteryjnego rozkładu laktulozy powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, a także obniża się pH jelita grubego. Powoduje to wzrost ciśnienia osmotycznego skutkując zatrzymaniem wody w świetle jelita i nasileniem perystaltyki. Obecność laktulozy w jelicie zwiększa wchłanianie i retencję związków mineralnych w organizmie zapobiegając osteoporozie oraz aktywując system odpornościowy. Laktuloza reguluje również proces trawienia białek i tłuszczów hamując wytwarzanie i wchłanianie amoniaku. Pozytywny wpływ laktulozy przejawia się także w utrzymaniu równowagi mikroflory jelitowej i hamowaniu rozwoju patogenów.

Zastosowane w medium dwucukry charakteryzują się wysoką masą molową, przez co posiadają zdolności do podwyższania temperatury przemiany szklistej kryształów lodu w zawiesinie komórek, przyspieszając jej przejście w stan szklisty. Powodują zwiększenie lepkości roztworu, w wyniku czego nie następuje krystalizacja lodu, ponieważ woda zostaje unieruchomiona w tej strukturze. W takich warunkach zostają zatrzymane przemiany fizykochemiczne białek wewnątrzkomórkowych. Dodatkowo użyte protektanty powodują wzrost hydratacji łańcuchów polipeptydowych w komórkach, wpływając na stabilizację konformacji białka. Cukry obniżają poziom przejścia fazowego fosfolipidów błony komórkowej tworząc wiązania wodorowe z grupami polarnymi. Przejścia fazowe błony dają także możliwość wnikięcia do wnętrza komórki dwucukrów. Powstałe wiązania wodorowe zapobiegają też denaturacji białek. Podczas odwadniania komórki ubytek wody powoduje przejście białek cytoplazmy z hydrozolu w hydrożel. Aby zachować białkową strukturę cytozolu podczas suszenia sublimacyjnego materiału biologicznego cukry muszą mieć dostęp do wnętrza komórki i muszą być obecne po obu stronach błony komórkowej. Protektanty zapobiegają również agregacji hydrofilowych części fosfolipidów błonowych w trakcie zarażania i rozmrażania poprzez zwiększanie gęstości ładunku wokół nich i w efekcie zapobiegają integralności błon. Dodatek sacharozy obniża temperaturę krioskopową, co prowadzi do skrócenia czasu zamrażania i wpływa na wzrost przeżywalności komórek.

#### P r z y k ł a d y I-IX

Skład medium liofilizacyjnego opracowano w oparciu o statystyczną metodę odpowiedzi płaszczyzn (RSM) wykorzystywaną m.in. w przemyśle do projektowania nowych produktów, zwłaszcza w sytuacji analizy wielu zmiennych i ich wpływu na otrzymany produkt. Opracowano dziewięć rodzajów medium różniących się pomiędzy sobą jakością lub ilością poszczególnych składników. We wszystkich przypadkach rozpuszczalnik stanowiła sterylna woda destylowana, zaś jako spirulinę użyto 100% suszone rozpyłowo sinice *Arthrospira platensis* w postaci proszku (Ocean Star International, Inc. Snowville UT 84336 USA).

W celu uzyskania medium rozpuszczono w wodzie sacharozę lub/i laktulozę, po czym dodano spirulinę i uzupełniono wodą do 100, cały czas mieszając. Dane jakościowe i ilościowe zestawiono w Tabeli nr 1.

Tabela 1  
Skład medium liofilizacyjnego

Przykład	Spirulina [% w/v]	Sacharoza [% w/v]	Laktuloza [% w/v]
1	0,5	5	5
2	0,5	5	11
3	0,5	11	5
4	1,1	5	11
5	0,8	2,96	8
6	0,8	8	8
7	1,3	13	5,5
8	0,2	5	0
9	0,2	0	5

#### Przykład porównawczy I

Zbadano wpływ spiruliny na wzrost *Lb. rhamnosus* na podłożu minimalnym (MM) o składzie wodorofosforan potasu - 7 g/dm<sup>3</sup>, di wodorofosforan potasu - 3 g/dm<sup>3</sup>, cytrynian trisodowy x 3H<sub>2</sub>O - 0,5, siarczan magnezu x 7 H<sub>2</sub>O - 0,1 g/dm<sup>3</sup>, siarczan amonu - 1 g/dm<sup>3</sup> i glukoza 2 g/dm<sup>3</sup>. Składniki podłoża zawieszono w dejonizowanej wodzie i ustalono pH = 6,0 przy użyciu 0,1 M HCl, po czym poddano je sterylizacji w temperaturze 121°C przez 15 minut. Następnie pobrano i przygotowano cztery porcje: do pierwszej porcji dodano 0,2% w/v spiruliny, do drugiej 0,4% w/v spiruliny, do trzeciej dodano 0,6% w/v spiruliny, zaś do czwartej, kontrolnej nie dodano spiruliny. Po 24 godzinach hodowli *Lb. rhamnosus* stwierdzono ponad 100% wzrost biomasy w porcjach zawierających dodatek 0,4 i 0,6% spiruliny.

Świadczy to o działaniu stymulacyjnym spiruliny na komórki bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus*.

#### Przykład porównawczy II

Przeprowadzono ocenę przeżywalności *Lb. rhamnosus* po liofilizacji w zależności od składu medium liofilizacyjnego na tle medium handlowego (8% w/v mleko odtłuszczone i 6% w/v sacharoza) oraz na tle medium kontrolnego, to jest nie poddanego liofilizacji.

W celu oceny przeżywalności bakterii przeprowadzono hodowlę bakterii w bioreaktorze na podłożu optymalnym do produkcji biomasy w temperaturze 37°C przez 18 godzin. Uzyskaną biomasę odwirowano (12000 obrotów na minutę, przez 20 minut) i dwukrotnie przepłukano roztworem soli fizjologicznej. Tak uzyskane bakterie zawieszono w 20% w/v wodnym roztworze medium (dla każdego składu odrębnie), po czym zamrożono w minus 80°C i przeniesiono do liofilizatora (*Labconoco*), gdzie poddano je suszeniu sublimacyjnemu w temperaturze minus 50°C, przy ciśnieniu 0,24 Pa przez 18 godzin. W dalszym etapie komórki rehydratowano w wodzie sterylnej i określono ich przeżywalność metodą płytkową, w porównaniu z medium kontrolnym nie poddanym liofilizacji. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2

Rodzaj medium	Średnia przeżywalność [%]
1	2
Przykład 1	39,22
Przykład 2	29,54
Przykład 3	48,32
Przykład 4	42,6
Przykład 5	62,15
Przykład 6	59,25

cd. tabeli 2

1	2
Przykład 7	87,5
Przykład 8	78,1
Przykład 9	56,53
Medium handlowe (8% w/v mleko odtłuszczone i 6% w/v sacharoza)	16
Medium kontrolne (nie poddane liofilizacji)	100

### Zastrzeżenia patentowe

1. Medium liofilizacyjne dla bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus*, zawierające dwucukier oraz wodę, **znamiennie tym**, że zawiera do 3% spiruliny, zaś dwucukier stanowi sacharoza lub laktuloza, przy czym ilość jednego z nich nie przekracza 15% w/v, zaś ich łączna ilość nie przekracza 20% w/v oraz wodę do 100.

2. Preparat bakteryjny zawierający liofilizowane bakterie z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* oraz dwucukier, **znamiennie tym**, że zawiera spirulinę, zaś dwucukier stanowi sacharoza lub laktuloza, przy czym stosunek wagowy ilości spiruliny do ilości dwucukrów wynosi od 1:10 do 1:35.

