

# Plantaricín-produkujúci kmeň *Lactiplantibacillus plantarum* LP 17L/1, sľubné aditívum pre mliekarenské produkty

*Andrea Lauková<sup>1</sup>, Martin Tomáška<sup>2</sup>, Maroš Drončovský<sup>2</sup>, Eva Bino<sup>1</sup>,  
Emília Dvorožňáková<sup>3</sup>, Ľubica Chrastinová<sup>4</sup>, Monika Pogány Simonová<sup>1</sup>,  
Miroslav Kološta<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Centrum biovied SAV, v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice, SK*

<sup>2</sup>*Výskumný ústav mliekarenský, s.r. o. Žilina, SK*

<sup>3</sup>*Parazitologický ústav SAV, v.v.i. v Košiciach, SK*

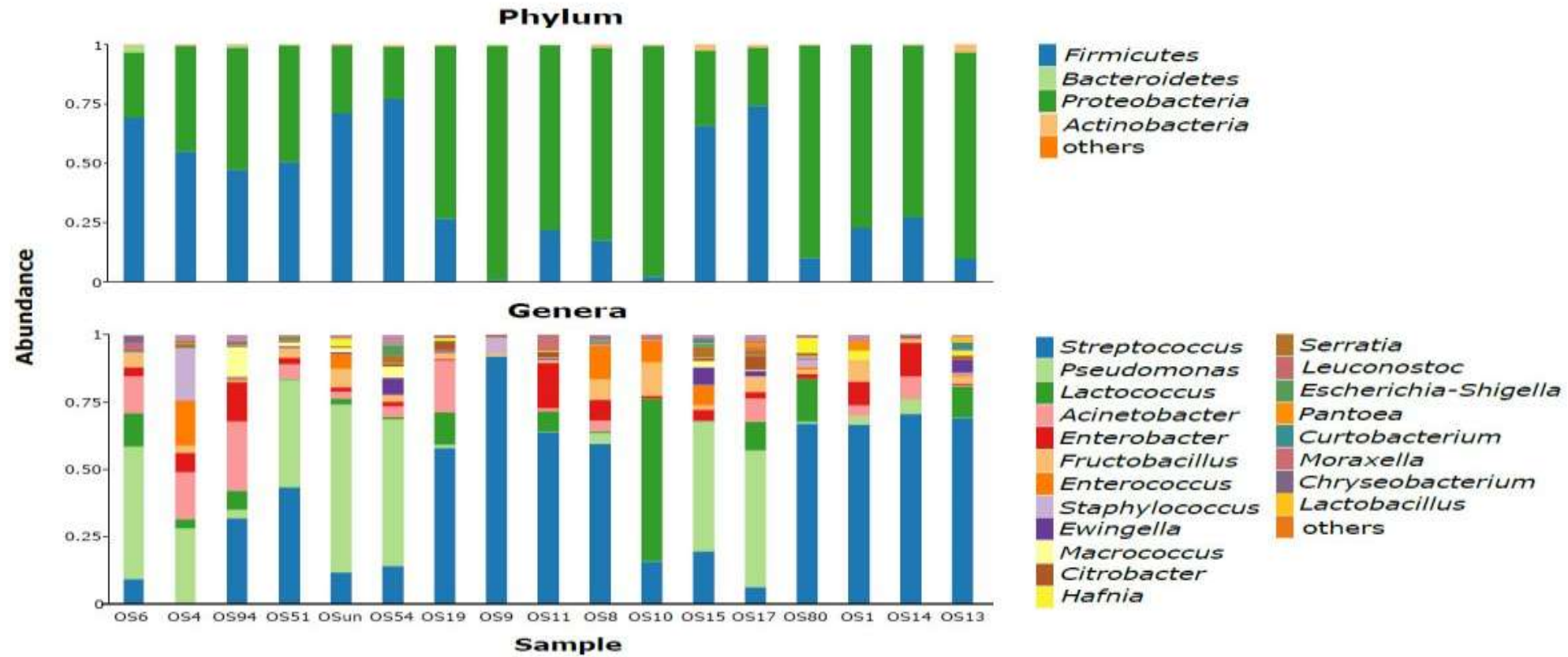
<sup>4</sup>*Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav živočíšnej výroby, Hlohovecká 2, 951 41 Nitra-Lužianky, SK*



- Mliekarenské produkty-obľúbené medzi spotrebiteľmi
- Inovácia-prospešné kmene, bakteriocín - produkujúce kmene (antimikrobiálne substancie bielkovinovej povahy s inhibičným efektom na viac či menej príbuzné baktérie) a s ďalšími účinkami
- Obohatenie produktu takým kmeňom-funkčná potravina
- Dôležitá je stabilita kmeňa v produkte a forma aplikácie



# Ovčí syr



Sekvenačná analýza (ngs) v spolupráci s Masarykovou univerzitou v Brne-Recetox, Dr. Lenka Kosečková Micenková

- Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1-ovčí syr



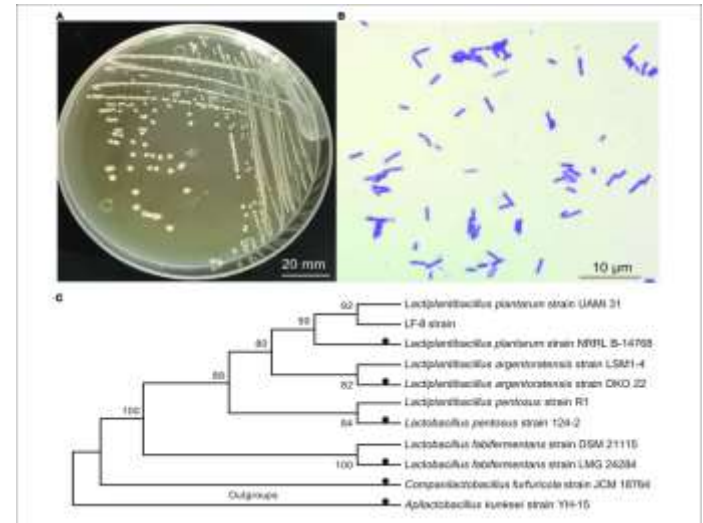
Phylum: **FIRMICUTES**

Trieda: Bacilli

Rád: Lactobacillales

Čeľaď: Lactobacillaceae

Rod: *Lactiplantibacillus*



1. Kmeň LP 17L/1 (ovčí syr) -identifikovaný ako *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*, Zheng et al. 2020), MALDI-TOF spektrometriou (skóre 2.387 zodpovedá rozsahu 2.300-3.000)
2. PCR (*L. pl.* CCM 4000)
3. Fenotypizácia
4. Sekvenácia (Blastn analýza 16S rRNA), zhoda nukleotidovej sekvencie s kmeňom v GenBanku MK611169.1.
5. Kmeň LP 17L/1 je uložený v GenBanku pod prístupovým číslom (access number) ON114094.
6. Deponovaný do CCM, Brno, ČR: CCM 9208

- 17. blank
- 16. *Str. gallolyticus*
- 15. *Lactiplantibacillus plantarum* 9208



## Vlastnosti kmeňa LP 17L/1:

- Bez hemolýzy ( $\alpha$ -hemolýza)
- Citlivý ku ATB
- Bez produkcie biofilmu
- Bez produkcie škodlivých enzýmov
- Produkcia  $\beta$ -galaktozidázy (10 nmol)
- Prítomnosť 10 *pln* génov (A-D, J,K,L, M, N, R)
- Produkuje diacetyl, tvorba plynu 0, lipol.0

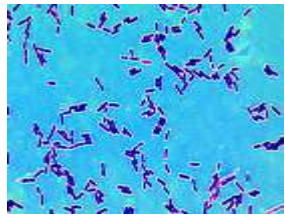
Kontrolný kmeň pre PCR: *L. plantarum* ATCC 8014T, 2035 a CCM 4000

Oxgal/žič 1%, pH 2,5: KTJ/ml

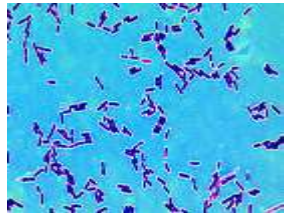
	0 h	24 h
LP17L/1-oxgal/žič	$5.6 \times 10^6$	$4.0 \times 10^5$
Kontrola	$9.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^6$
LP17L/1 pH	$4.5 \times 10^5$	$2.7 \times 10^4$
Kontrola	$3.8 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$

Inhibičná aktivita koncentrovanej substancie (KS) LP 17L/1 in AU/ml (pH 6,5)

Indicators	Cs 17L/1
<i>Listeria monocytogenes</i> 9/9	100-3 200 (P7223)
<i>S. aureus</i> 15/14	100-800
<i>E. mundtii</i> 11/11	100-200 AU/ml
<i>Str. pneumoniae</i> 9/6	100 AU/ml
<i>Str. pyogenes</i> 1/1	100 AU/ml
<i>L. lactis</i> 7/5	100
<i>Lactobacillus</i> sp. 7/5	100
<i>S. pseudintermedius</i> SPs948 1/1	100
<i>S. arlettae</i> 441/1	100
<i>S. schleiferi</i> KNsp31/1	400 AU/ml
<i>E. coli</i> 4/3	100
<i>Acinetobacter</i> sp. 2/2	100
<i>Yersinia</i> sp., <i>Serratia</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp. 3/0	0
<i>Citrobacter</i> spp. 1/1	100 AU/ml



- **LP17L/1** dostatočne rástol v MRS s koncentráciou NaCl 2%, čo z technologického hľadiska značí, že je schopný rásť aj v prostredí bežných syrov s typickým obsahom NaCl a tiež v kyslomliečnych fermentovaných dezertoch ochucovaných zeleninovou zložkou



- Optimálna teplota rastu (30-37°C), ale LP17L/1 rástol i pri teplote 20 °C, pri ktorej môže prebiehať zrenie syrov

- V odstredenom mlieku-klasická kultivácia pri 37 °C po 24 h: 11. 0; 12.0 KTJ/ml (log 10)

- V odstredenom mlieku v biofermentore BioSun 37 °C po 24h: 11. 34 KTJ/ml (log 10)



- V sójovom nápoji/mlieku dosiahol po 24 h pri 37 °C (klasická kultivácia) takmer  $10^9$  KTJ/ml
- Surové kozie mlieko – takmer  $10^7$ -  $10^8$  KTJ/ml (30, 33, 37° C)





# Bezpečnosť kmeňa –hybridné plemeno myši Balb/c

Myši pathogen-free Balb/c vek 8. týždňov, 18-20 g); Režim: 12 h svetlo/tma, 22°-24°C, vlhkosť vzduchu 56%; Diéta: komerčná; KS-15 myši, PS-17 myši, dávka **LP17L/1**- 100 µl/myš/deň 10<sup>9</sup> KTJ/ml, rifampicínom značený variant kmeňa počas 30 dní, Odbery: 0/1, 7. deň, 30. deň

## Mikrobiota-feces v KTJ/g (log 10)

Feces	LP17L/1	KMPB	Koliformné
Odber I d.0/1 (n=10)	nt	5.97 ± 2.34	3.42 ± 1.84
Odber II d.7, n=5 PS	3.63 ± 1.83	6.48 ± 2.54	3.60 ± 1.89
KS	nt	6.60 ± 2.56	3.08 ± 1.89
Odber III d.30, n=5 PS	1.21 ± 0.10	7.38 ± 2.71	3.60 ± 1.89
KS	nt	7.34 ± 2.71	5.52 ± 2.34



*Lbc. plantarum*

## Mikrobiota-jejenum v KTJ/g (log 10)

Jejunum	LP17L/1	KMPB	Koliformné
Odber I d.0/1 (n=10)	nt	4.98 ± 2.20	4.21 ± 2.05a
Odber II d.7, n=5 PS	2.07 ± 1.43	4.19 ± 2.04	1.50 ± 0.22b
KS	nt	3.31 ± 1.82	1.96 ± 0.40
Odber III d.30, n=5 PS	< 1.0	5.23 ± 2.28	1.15 ± 0.07c
KS	nt	4.23 ± 2.05	2.61 ± 2.71

Koliformné: 0/1:30d., 0/1:7d; abc, (rozdiel 2.71 log cyklu), 1.46 log cyklu, 30. deň, PS:KS

Koliformné: 30. deň, PS:KS, 2.12 log cyklu

# Bezpečnosť kmeňa – brojlerové králiky



Schéma experimentu: NPPC Lužianky – Nitra, do vody **LP17L/1- 500 µl/zviera/deň, 10<sup>9</sup> KTJ/ml**  
 24 brojlerových králikov (12/skupina, 2/klietka; obidve pohlavia, mäsové línie M91 a P91, vek 35 dní),  
 Diéta- zmes pre králikov, voda-*ad libitum*, **30 dní**, Odbery:0/1, 30. deň

## Mikrobiota-trus a cékum v KTJ/g log 10)

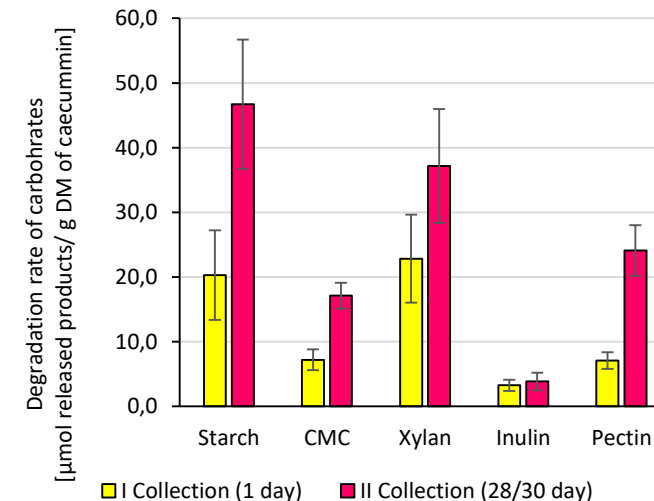
n=8	KMPB	LP17L/1	Enterococci	KoNS	KoPS	Amyl.str.	Koliformn é	Ps.-like
O/1 odber	2.34 ± 0.62 <sup>a</sup>	nt	2.19±0.58 <sup>a</sup>	3.12±0.27	2.44±0.45 <sup>a</sup>	5.82±0.41 <sup>a</sup>	1.27±0.72 <sup>a</sup>	3.63±0.19 <sup>a</sup>
n=6/30.d TP1-TP6	3.93 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.0	3.89 ± 0.59 <sup>b</sup>	3.93 ± 1.02	3.86 ± 0,98 <sup>b</sup>	7.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	4.61 ± 1.04 <sup>b</sup>	5.56 ± 0.99 <sup>b</sup>
TK1/1- TK/6	3.61 ± 0.20 <sup>c</sup>	nt	3.58 ± 0.31 <sup>c</sup>	3.84 ± 0.37	4.31 ± 0.33 <sup>c</sup>	7.09 ± 0.1 <sup>c</sup>	4.02 ± 0.47 <sup>c</sup>	5.39 ± 1.16 <sup>c</sup>

Enterokoky, 0/1:28P, 0/1:28K,ab,acP<0,001; KMPB, 0/1:28P, 0/1:28K,ab,acP<0,001; Amyl.str., 0/1:28P, 0/1:28K,ab,acP<0,001;  
 CoPS, 0/1:28P,abP<0,01; 0/1:28K acP<0,001; Ps.,ab,acP<0,01; Coliforms, ab,acP<0,001;

n=4	Enterococci	KoNS	Amyl.str.	KoPS	KMPB	LP17L/1	Koliformné	Ps.like
P/30	1.0 ± 0.2	4.07 ± 0.31	4.46 ± 0.69 <sup>a</sup>	3.89 ± 0.17	2.72 ± 0.51	0.9 ± 0.0	2.45 ± 0.35	4.60 ± 0.45
K/30	1.7 ± 0.27	3.12 ± 0.80	5.82 ± 0.57 <sup>b</sup>	3.56 ± 0.59	2.49 ± 0.37	nt	2.47 ± 0.19	4.55 ± 0.32

Amyl. str. ab,p<0.01= P28:K28

## Hydrolytic activity



## Fagocytárna aktivita

	K/30	P/30 (LP17L/1)
FA (%)	70.00 ± 1.41	70.67 ± 1.75
IFA	3.53 ± 0.15	3.63 ± 0.16





## Morfometrické parametre v jejunu

n=4	Obvod villi v $\mu\text{m}$	Plocha vilu v $\mu\text{m}^2$	Výška vilu v $\mu\text{m}$	Hĺbka klkov v $\mu\text{m}$	Vv:Hk
P/30	1584 $\pm$ 39.79	81705 $\pm$ 285.8	686 $\pm$ 26.19	175 $\pm$ 13.22	3.92
K/30	1580 $\pm$ 39.74	81546 $\pm$ 285.6	684 $\pm$ 26.15	179 $\pm$ 13.37	3.83

Chov bol bez výskytu oocýst *Eimeria* spp. počas trvania experimentu

Fyzikálno-chemické hodnoty v MLTL neboli negatívne ovplyvnené.



## Biochemické hodnoty

## Rastové parametre

n=12	Ž. hm. na 42. d. (g)	Pr. pr. na hm.	Konverzia (g/g)
P/30	2791.8 $\pm$ 52.83	44.67 $\pm$ 6.68	3.99 $\pm$ 0.99
K/30	2469.2 $\pm$ 49.69	37.24 $\pm$ 6.10	2.69 $\pm$ 0.64

n=8	P/30	K/30	p-value	Norma
CB g/l)	56.25 $\pm$ 3.49	55.16 $\pm$ 1.76	0.444 (NS)	53-85
Albumín g/l	39.49 $\pm$ 2.01	39.1 $\pm$ 1.40	0.6616 (NS)	26-46
Kreatinín $\mu\text{mol/l}$	50.58 $\pm$ 8.57	42.59 $\pm$ 4.44	0.0346 p<0.05	44-141
Glukóza mmol/l	8.09 $\pm$ 0.89	8.36 $\pm$ 0.56	0.4708 (NS)	5.5-8.6
Triglyceridy (mmol/l)	0.73 $\pm$ 0.29	0.98 $\pm$ 0.29	0.1238 (NS)	Do 1.44
Cholesterol mmol/l	1.123 $\pm$ 0.16	1.611 $\pm$ 0.36	0.0032 P<0.01	0.28-2.1
ALT $\mu\text{kat/l}$	0.386 $\pm$ 0.092	0.425 $\pm$ 0.16	0.4661	0.33-1.19
AST $\mu\text{kat/l}$	0.264 $\pm$ 0.075	0.234 $\pm$ 0.048	0.3563	0.23-0.93
ALP $\mu\text{kat/l}$	2.954 $\pm$ 0.74	2.653 $\pm$ 0.39	0.3291	0.3-2.13
Sodík-Na mmol/l	142.1 $\pm$ 3.52	1140.3 $\pm$ 3.19	0.2836	140-160
Draslík-K mmol/l	4.353 $\pm$ 0.16	4.683 $\pm$ 0.74	0.3808	4.3-5.8
Vápnik-Ca mmol/l	3.57 $\pm$ 0.72	4.66 $\pm$ 0.14	0.3144	2.2-4.2
Fosfor-P mmol/l	2.23 $\pm$ 0.40	2.37 $\pm$ 0.16	1.123 $\pm$ 0.16	1.2-2.4
Horčík-Mg mmol/l	0.96 $\pm$ 0.094	0.99 $\pm$ 0.043	0.3246 (NS)	0.8-1.20
Chloridy-Cl mmol/l	98.81 $\pm$ 3.65	95.68 $\pm$ 3.24	0.0821 (NS)	92-120

## Poloprevádzková výroba –VUM a.s. Žilina:



- kyslomliečny nápoj na báze kozieho pasterizovaného mlieka (naturálny obsah tuku)
- zákvas 1%: *L. lactis* MK1/3 a **LP17L/1**, 7:3 (12 l surové kozie mlieko, 90°C pasterizované, s dobou výdrže 5 min vo varnom pulte), kultivácia pri 30°, 33° a 37°C-18 h (počty v KTJ/ml/g)

	0h	18 h
<b>30°C</b>		
pH	6.42	4.23
Predpokladané /presumptívne laktokoky	6.77	8.80
laktobacily	6.81	4.66
<b>33°C</b>		
pH	6.39	4.32
laktokoky	6.83	8.80
laktobacily	6.86	8.77
<b>37°C</b>		
pH	6.44	4.43
laktokoky	7.08	8.78
laktobacily	7.08	8.73

Mlieko zrazené po 18 h fermentácie, s rastom T, rástlo aj pH koagulátu (mierne). Počty 10E9 KTJ/ml. Sensorika: **Najlepší nápoj fermentovaný pri T 33°C**; príjemná kyslomliečna chuť, vôňa typická pre kozie mlieko, koagulát bol homogénny, bez vyvstávania srvátky. Mierna trávová dochuť-špecifický znak použitého kmeňa. Doba úchovy 21 dní, počty klesli na 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> KTJ/ml/g. Hodnota pH koagulátu sa nemenila, ani vzhľad. Sensorické hodnotenie na 21. deň bolo porovnateľné s tým po ukončení kultivácie.

## Prevádzková výroba farma Bardy, s.r.o. Jasenové v spolupráci s VUM a.s. Žilina:

- kyslomliečny nápoj na báze kozieho pasterizovaného mlieka (naturálny obsah tuku)
- zúvas 1%: *L. lactis* MK1/3 a *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1 ,7:3 (12 l surové kozie mlieko, 90°C pasterizované, s dobou výdrže 5 min vo varnom pulte)
- kultivácia pri **33°C 18 h**

	0 h	18 h
33°C		
pH	6.42	4.35
Predpokladané /presumptívne laktokoky	6.30	8.62
laktobacily	6.39	8.12

Výrobok-fermentovaný nápoj na báze kozieho mlieka po ukončení fermentácie (18 h) mal pH 4,35. Sensorika: príjemná kyslomliečna chuť, s mierne trávou dochuťou dané špecificitou kmeňa LP17L/1. Laktokoky: 8, 62 (log 10) KTJ/g a laktobacily 8, 12 KTJ/ml (log 10). Doba úchovy 21 dní, počty viabilných kolónií klesli na  $10^6$ - $10^7$  KTJ/ml. Hodnota pH koagulátu sa nemenila, ani vzhľad. Sensorické hodnotenie na 21. deň bolo porovnateľné s tým po ukončení kultivácie.

**LP17L/1**, by rifampicin labeled variant, freeze dried=encapsulated in **ewes-goat milk yoghurt**, 145 g, white from market network (counts in log 10 CFU/g), in fridge (cca 4°C), 0.5 g

	pH	LP17L/1 (MRS+Rif)	LAB
E/24h	<b>4.10 ± 0.1</b>	<b>5.1 ± 0.0</b>	<b>6.1 ± 0.1</b>
C/24h	<b>4.10 ± 0.1</b>	<b>nt</b>	<b>5.0 ± 0.0</b>
E/7. day	<b>4.21 ± 0.2</b>	<b>4.60 ± 0.1</b>	<b>5.1 ± 0.0</b>
C/7. day	<b>4.05 ± 0.0</b>	<b>nt</b>	<b>5.1 ± 0.0</b>
P/14.day	<b>4.25 ± 0.1</b>	<b>1.90 ± 0.0</b>	<b>4.30 ± 0.1</b>
K/14.day	<b>4.20 ± 0.1</b>	<b>nt</b>	<b>4.50 ± 0.1</b>



The counts of LP17L/1 in freeze dried form-encapsulated- **10E7 CFU/g.**

**LP17L/1**, labeled by rifampicin, freeze dried=encapsulated, **cow milk yoghurt**, 145 g, white from market network (counts in CFU/g in log 10) , stored in fridge (cca 4°C)

	pH	LP17L/1 (MRS+Rif)	LAB
E/24h	nt	<b>2.88 ± 0.1</b>	<b>7.08 ± 0.3</b>
C/24h	nt	nt	<b>7.1 ± 0.1</b>
E/7. day	<b>3.81 ± 0.0</b>	<b>2.20 ± 0.0</b>	<b>10.1 ± 0.5</b>
C/7. day	<b>4.06 ± 0.0</b>	nt	<b>8.99 ± 0.5</b>
E/14. day	<b>3.95 ± 0.0</b>	<b>2.13 ± 0.0</b>	<b>8.56 ± 0.2</b>
C/14. day	<b>4.20 ± 0.1</b>	nt	<b>10.1 ± 0.5</b>



The counts of LP17L/1 in freeze dried form-encapsulated- **10E7 CFU/g.**

- Enkapsulované aplikované prospešné kmene vykázali dostatočné prežívanie a stabilitu v jogurtoch počas sledovaného obdobia.
- Stabilita a prežívanie sú ovplyvnené ako druhom aplikovaného kmeňa, tak aj druhom produktu (jogurtu) a môžu byť ovplyvnené aj formou aplikácie; avšak lyofilizácia sa javí ako vhodná forma aplikácie.



- Po aplikovaní kmeňa LP17L/1 – **signifikantný pokles počtu svalových lariev a signifikantný pokles novo narodených lariev** nematóda (80%)
- LP17L/1 aktivoval u myší metabolickú aktivitu makrofágov počas migrácie novonarodených lariev (od 5. do 25. dňa po infekcii) - **preukázal ochranný účinok proti infekcii T. spiralis** spojený so zvýšeným oxidačným metabolizmom peritoneálnych makrofágov
- Zvýšenie metabolickej aktivity makrofágov indukované podávaním kmeňa LP17L/1 v **črevnej fáze trichinelózy zvýšilo anti-parazitickú obranu hostiteľa** (poškodenie a usmrtenie novonarodených lariev reaktívnymi formami O<sub>2</sub> z makrofágov)

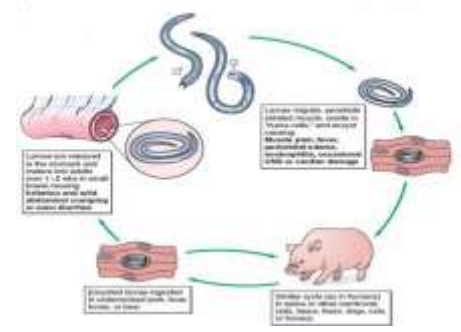


## Profylaktické podávanie kmeňa LP17L/1 pri infekcii *Trichinella spiralis* (PAU SAV, v.v.i, Košice)

Modelový experiment-myši Balb/c boli infikované nematódom *T. spiralis*

## Nová farmakologická stratégia boja proti infekcii *Trichinella spiralis* alebo jej prevencie

- Cez špecifickú aktiváciu hostiteľských črevných imuno-regulačných buniek (CD4+, CD8+, T lymfocyty)
- Pochopenie imunologických mechanizmov spojených s priaznivým účinkom prospešného kmeňa na infekciu *T. spiralis* je dôležité pre vypracovanie stratégie, ktorá **povedie ku zníženiu rizika infekcie parazitmi alebo umožní doplniť konvenčnú anti-parazitickú liečbu pri zníženej dávke anti-helmintík.**



PP 50021-2022:

LP17L/1 (CCM 9208)

spolu s kmeňom *L. lactis* MK1/3 (CCM 9209):  
*Kmene kyslomliečnych baktérií L. lactis MK1/3,*  
*Lactiplantibacillus plantarum LP17L/1, použitie*  
*uvedených*  
*kmeňov, spôsob výroby fermentovaného kozieho*  
*mlieka,*  
*výrobok vyrobený týmto spôsobom*  
*(9.12.2022 UPV SR) s VUM, a s. Žilina*

Healthy food-functional  
food

*Lactiplantibacillus plantarum* LP17/1  
safe

anti-parazitárne účinky  
(*Trichinella spiralis*)

plantaricín –  
anti-listeriálny a anti-stafylokový  
účinnok

enzým beta-galaktozidáza -  
laktózová intolerancia

Healthy people



Ďakujem za pozornosť 😊

